



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

“EFECTOS DE LA FRACCIÓN HIDROSOLUBLE DEL PETRÓLEO
SOBRE ALGUNOS ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA Y EL
METABOLISMO DE *Macrobrachium borellii* (CRUSTACEA:
DECAPODA)”

Tesis Doctoral
Sabrina María Luisa Lavarías

Director: Dr. Horacio Heras

Co-Director: Dr. Ricardo J. Pollero

2005

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales, se realizó en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, bajo la dirección del Prof. Dr. Horacio Heras y el Prof. Dr. Ricardo J. Pollero.

*En memoria de mis
padres y mi abuela*

Mi Reconocimiento:

Al Dr. Rodolfo R. Brenner por haberme brindado la oportunidad de comenzar el presente trabajo en las instalaciones del INIBIOLP, como su director.

A la actual directora del INIBIOLP, Prof. Dra. María J. Tacconi de Alaniz por permitirme completar este trabajo.

A la Universidad Nacional de la Plata por haber contribuido mediante sucesivas becas a la realización de este proyecto.

Mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. Horacio Heras por haber sido una guía importante en la realización de este trabajo, por su apoyo y dedicación en mi formación científica.

Al Prof. Dr. Ricardo J. Pollero por brindarme su confianza y comprensión.

Al Dr. Martín Ansaldo y Horacio Tournier por su colaboración en el tema de estrés oxidativo.

Al servicio de Virología de la Facultad de Veterinaria (UNLP) y al CENEXA por permitirme utilizar el microscopio de fluorescencia.

Al servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Veterinaria (UNLP) por el apoyo técnico.

Al Dr. Carlos Luquet por su asesoramiento en el estudio microscópico de las cáscaras embrionarias.

A mis compañeros del laboratorio 8-bis quienes compartieron tantas horas de trabajo: Marita, Mónica y Magalí, y en especial a Fernando por haberme ayudado con las técnicas de fluorescencia y a Marcos por su compañerismo y afecto.

A mis amigas Sandra y Alejandra por brindarme su cariño.

A los futuros biólogos Yanina, Natalie y Pablo.

A todos los integrantes del INIBIOLP, quienes de alguna u otra forma contribuyeron con la realización de este trabajo.

Publicaciones en revistas científicas periódicas derivadas de este trabajo de tesis:

Morphometric study of embryo development of *Macrobrachium borellii* (Arthropoda: Crustacea). Lavarías, S., Heras, H., Demichelis, S. Portiansky, E., y Pollero, R.J. *Invertebrate Reproduction and Development* (2002) 41: 157-163.

Toxicity, uptake and release of the water-soluble fraction of crude oil on different developing stages of *Macrobrachium borellii* (Arthropoda: Crustacea). Lavarías, S., Heras, H. y Pollero, R.J. *Arch. Environ. Con. Tox.* (2004) 47: 215-222.

Changes in phosphatidylcholine molecular species in the shrimp *Macrobrachium borellii* in response to water soluble fraction of petroleum. Lavarías, S., Heras,H., Dreon M. y Pollero, R. *Lipids* (enviado)

Evaluación de la presencia de hidrocarburos antropogénicos en el Arroyo El Pescado (Pcia. Bs As.). S. Lavarías, P. Demetrio, Y. Pasquevich, N. Arnal y H. Heras. *Acta Toxicológica Argentina* (enviado)

Resumen	I
Abreviaturas y símbolos	VI
Capítulo I. Introducción general	1
I.A. Consideraciones generales.....	2
I.B. Contaminación acuática.....	2
I.B.1. Contaminación por petróleo.....	4
I.B. 2. Efecto de contaminantes orgánicos sobre el metabolismo.....	6
I.B.3. Biomarcadores.....	10
I.C. <i>Macrobrachium borellii</i>	12
I.C.1. Elección como modelo.....	12
I.C.2. Clasificación sistemática.....	13
I.C.3. Distribución geográfica. Hábitat.....	13
I.C.4. Breve descripción anátomo-fisiológica.....	14
I.C.5. Ciclo de vida.....	15
I.C.6. Metabolismo.....	17
Objetivos	19
Capítulo II. Metodología de trabajo	21
II.A. Reactivos y drogas utilizadas.....	22
II.B. Área de muestreo.....	22
II.C. Obtención de las muestras	23
II.C.1. Sedimento.....	23
II.C.1.a. Determinación de % de humedad y contenido de materia orgánica.....	23
II.C.2. Agua.....	23
II.C.3. Animales.....	23
II.D. Extracción de hidrocarburos de diferentes matrices.....	24
II.D.1. Extracción de hidrocarburos del agua.....	24
II.D.2. Extracción de hidrocarburos de los tejidos.....	24
II.D.2.a. Destilación por arrastre.....	24
II.D.2.b. Método de Bligh y Dyer.....	25
II.D.2.c. Soxhlet	26
II.D.3. Extracción de HC de los sedimentos.....	26
II.D.3.a. Saponificación con KOH.....	26
II.D.3.b. Sonicación.....	27
II.D.3.c. Soxhlet.....	27
II.E. Análisis de los hidrocarburos mediante cromatografía gas-líquido.....	27
II.E.1. Purificación y separación preliminar de los extractos utilizando columnas de sílice.....	27
II.E.2. Separación por cromatografía gaseosa.....	28
II.E.3. Identificación y cuantificación.....	29
II.F. Estudio del desarrollo embrionario.....	29
II.F.1. Ensayo para determinar el tiempo y estadio de desarrollo.....	29
II.F.2. Análisis morfométrico.....	29
II.F.3. Estudio de las membranas embrionarias mediante microscopía electrónica.....	30
II.F.4. Ensayos de permeabilidad de la cáscara.....	31

II.F.5. Determinación del peso seco.....	31
II.G. Diseño de bioensayos.....	31
II.G.1. Preparación de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos.....	31
II.G.2. Extracción y análisis de hidrocarburos de la fracción hidrosoluble.....	32
II.G.3. Determinación de la concentración letal 50%.....	32
II.G.4. Cinética de bioacumulación y biodepuración de hidrocarburos.....	32
II.G.5. Exposición de camarones adultos y embriones a concentraciones subletales de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos.....	33
II.G.6. Disección de los adultos.....	33
II.G.6.a. Hepatopáncreas.....	34
II.G.6.b. Músculo.....	34
II.G.6.c. Branquias.....	34
II.G.6.d. Extracción de hemolinfa.....	34
II.G.7. Métodos empleados para la obtención y el análisis de lípidos y ácidos grasos.....	35
II.G.7.a. Extracción de lípidos	35
II.G.7.b. Separación por cromatografía en capa delgada.....	35
II.G.7.c. Análisis de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido.....	36
II.G.8. Medidas de la actividad enzimática.....	37
II.G.8.a. Obtención de las fracciones subcelulares.....	37
II.G.8.b. Sistema de β -oxidación.....	38
II.G.8.c. Palmitoil-CoA ligasa microsomal.....	38
II.G.8.d. Palmitoil-CoA ligasa mitocondrial.....	39
II.G.8.e. Triacilglicerol lipasa.....	39
II.G.8.f. Biosíntesis de acilgliceroles.....	40
II.G.9. Medidas fluorométricas.....	41
II.G.10. Métodos empleados para el estudio del sistema de defensa antioxidante.....	41
II.G.10.a. Preparación de las muestras.....	41
II.G.10.b. Medidas del sistema enzimático	41
II.G.10.b.1. Catalasa.....	42
II.G.10.b.2. Glutatión S- transferasa	42
II.G.10.c. Medidas de capacidad antioxidante total.....	42
II.G.10.c.1. Captación de radicales libres.....	43
II.G.10.c.2. Poder reductor del Fe^{+3}	43
II.H. Análisis estadístico.....	43

Capítulo III. Estudio de base del ambiente y el desarrollo embrionario

de <i>Macrobrachium borellii</i>	45
III.A. Introducción.....	46
III.B. Resultados.....	47
III.B.1. Estudio de línea de base.....	47
III.B.2. Estudio del desarrollo embrionario.....	50
III.B.2.a. Morfometría.....	50
III.B.2.b. Ultraestructura de la cáscara.....	57
III.C. Discusión.....	58

Capítulo IV. Bioacumulación y biodepuración de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos en diferentes estadios de desarrollo.....	63
IV.A. Introducción.....	64
IV.B. Resultados.....	65
IV.B.1. Determinación de la dosis letal 50%.....	67
IV.B.2. Efecto de la exposición crónica de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos sobre el desarrollo.....	70
IV.B.3. Acumulación y depuración de hidrocarburos en organismos adultos.....	73
IV.C. Discusión.....	77
Capítulo V. Efecto de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos sobre la composición y el catabolismo lipídico de camarones adultos y embriones.....	84
V.A. Introducción.....	85
V.B. Resultados.....	85
V.B.1. Composición de lípidos.....	85
V.B.1.a. Composición cuali-cuantitativa de lípidos.....	85
V.B.1.b. Composición cuali-cuantitativa de ácidos grasos.....	88
V.B.2. Catabolismo lipídico.....	90
V.B.2.a. Caracterización y actividad de Palmitoil-CoA ligasa mitocondrial.....	90
V.B.2.b. Actividad triacilglicerol lipasa.....	94
V.B.2.c. Sistema de β -oxidación.....	96
V.C. Discusión.....	98
Capítulo VI. Efecto de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos sobre el anabolismo lipídico de camarones adultos y embriones.....	104
VI.A. Introducción.....	105
VI.B. Resultados.....	106
VI.B.1. Actividad Palmitoil-CoA ligasa microsomal.....	106
VI.B.2. Síntesis de acilgliceroles.....	108
VI.B.3. Efecto de los hidrocarburos sobre propiedades físicas de membranas microsomales.....	111
VI.C. Discusión.....	113
Capítulo VII. Efecto de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos sobre el sistema de defensa antioxidante.....	117
VII.A. Introducción.....	118
VII.B. Resultados.....	119
VII.B.1. Sistema enzimático de defensa antioxidante.....	119
VII.B.2. Sistema no enzimático de defensa antioxidante.....	121
VII.C. Discusión.....	124
Conclusiones generales.....	128
Bibliografía.....	131
Summary.....	143

El impacto de los hidrocarburos (HC) de origen petrogénico en ecosistemas acuáticos puede afectar seriamente a la flora y fauna local. La fracción hidrosoluble del petróleo (WSF) es la responsable de los efectos tóxicos, sobre todo la fracción correspondiente a los HC aromáticos. Los organismos expuestos a concentraciones subletales de dichos compuestos pueden sufrir cambios fisiológicos, lo que resulta en un cambio neto de la energía disponible para el crecimiento y la reproducción. Es por ello que las medidas bioquímicas de respuestas biológicas subletales “biomarcador”, son particularmente valiosas para monitorear exposiciones a estos contaminantes. En este sentido, la franja costera sur del Río de La Plata es la región más contaminada del país por HC, debido a las actividades industriales y portuarias que operan en la zona, existiendo una marcada falta de información acerca de sus efectos en las especies de la comunidad. Para obtener información relevante, es preferible seleccionar organismos nativos; por tal motivo en este trabajo estudiamos los efectos toxicológicos del petróleo sobre un organismo acuático autóctono, el crustáceo decápodo *Macrobrachium borellii*. Se seleccionó este organismo debido a que es un representante de un nivel trófico elevado en la comunidad, a su proximidad taxonómica con otras especies de acuicultura económicamente importantes, fácil de capturar y mantener en el laboratorio y principalmente, a que se disponía de información sobre su biología y bioquímica.

El objetivo de este trabajo de tesis se focalizó en dos aspectos: por un lado, estudiar el efecto de la fracción hidrosoluble de HC del petróleo sobre diferentes parámetros biológicos, bioquímicos y biofísicos. Por otra parte, se pudo avanzar en el estudio del metabolismo de lípidos en muchos aspectos poco conocidos en los crustáceos en general, así como incursionar en su sistema de defensa antioxidante. Como generalmente los organismos acuáticos suelen presentar sensibilidad diferencial a los tóxicos de acuerdo al estadio del ciclo vital, los experimentos se realizaron en organismos adultos y embriones.

Se comenzaron los estudios determinando los niveles basales de HC en diferentes matrices en el área de muestreo. Para ello se muestreó en un curso de agua cercano a la localidad de La Plata, conocido como arroyo “El Pescado”, colectando durante 22 meses muestras de camarones, sedimento y agua. Complementariamente se midieron pH y temperatura en agua, y contenido de materia orgánica en sedimento.

Se compararon diferentes técnicas de extracción en las muestras de sedimento y en las de tejidos, seleccionando la técnica de sonicación para los sedimentos y la de

destilación por arrastre para las biológicas por ser las más eficientes para extraer los HC aromáticos. No se detectó la presencia de HC en muestras de agua y de tejidos. En las muestras de sedimentos se observó presencia de HC de la serie alifática, principalmente nC29, nC31 y nC33, y solo trazas de HC aromáticos, durante todo el período monitoreado. Para determinar el posible origen de esos HC alifáticos se emplearon índices de distribución observando que el sedimento contenía HC esencialmente de origen biogénico, provenientes de plantas superiores, estando por lo tanto libre de contaminación apreciable por HC petrogénicos en el sitio de muestreo. Estos resultados nos permitieron entonces utilizar a *M. borellii* de este hábitat como modelo de bioensayo para los estudios de laboratorio de acumulación, depuración y efectos metabólicos de hidrocarburos petrogénicos.

Antes de utilizar los embriones en los bioensayos, se realizó un estudio morfométrico del desarrollo desde el momento de la puesta hasta la eclosión. El desarrollo embrionario se estudió bajo condiciones controladas de laboratorio y se identificaron 7 estadios de acuerdo a las características morfológicas más relevantes. Este camarón es lecitotrófico y tiene un tipo de desarrollo muy abreviado y eclosiona como zoea luego de 39 ± 2 días a $24 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sus huevos son ovalados con un diámetro máximo que varió de 1,5 a 2,0 mm desde la oviposición hasta la eclosión. El contenido de agua y el tamaño se incrementó a lo largo del desarrollo. El vitelo se fue consumiendo; representando más del 95 % del huevo al momento de la oviposición, llegó al 22 % al momento de la eclosión. El mayor descenso del área del vitelo se observó entre los estadios 4 y 5, coincidentemente con marcados cambios metabólicos. Empleando la redondez y el diámetro máximo de la cáscara, el vitelo y ojo, se optimizó un método no invasivo que permite identificar el estadio de desarrollo con una precisión del 70 al 100 %. Este método podría ser utilizado para clasificar otras especies que posean también una cáscara transparente.

También se estudió la estructura de las cáscaras de los huevos por microscopía electrónica. Las observaciones microscópicas mostraron que la cáscara de los embriones es semejante a la de otros Palaemónidos y está compuesta por múltiples capas.

Una vez determinado que el área de muestreo estaba libre de HC petrogénicos y finalizada la descripción morfométrica del desarrollo, se comenzaron los ensayos *in vitro*. Se expusieron camarones adultos, larvas y embriones a 5 diluciones de la WSF para establecer la LC50-96h. No se observaron diferencias significativas en la sensibilidad

frente a la WSF entre las larvas y los adultos (LC50 1,41 y 1,56 mg/l, respectivamente). Inesperadamente no se pudo determinar la LC50 en los embriones, aunque en ensayos crónicos el tratamiento con WSF provocó un incremento significativo de la mortalidad de los embriones y una ampliación en el tiempo de eclosión en comparación al grupo control. Para investigar si la resistencia que presentan los embriones a los tóxicos se debe al efecto protector de la cáscara del huevo, se realizaron ensayos de permeabilidad de la cáscara en diferentes estadios de desarrollo utilizando el fluoróforo DPH. Se observó que dicha molécula atravesó la cáscara en los embriones expuestos demostrando de esta manera que la cáscara es permeable a los HC especialmente al final del desarrollo, sugiriendo que existe además algún otro mecanismo de protección.

Se estudió a continuación la cinética de bioconcentración y biodepuración de la WSF en camarones adultos expuestos durante 96 h a una concentración subletal de WSF. Luego algunos lotes fueron transferidos a agua sin WSF y depurados durante 10 días. Los HC se acumularon rápidamente y luego de 24 h la bioconcentración en el camarón llegó a un equilibrio con el medio. La concentración de los diferentes HC en los tejidos aumentó con la sustitución y el número de anillos aromáticos, en diferente proporción con respecto al medio. La velocidad de depuración es inversamente proporcional al peso molecular, grado de sustitución del anillo y el *Kow* de los HC, determinándose que la depuración de los HC se realizaría en dos fases: casi el 70 % de los HC se eliminan en las primeras 12 h (especialmente aromáticos livianos), y entre las 24 y 96 h, se elimina casi todo el resto. Luego de 10 días de depuración, solo se observaron cantidades apreciables de los HC de mayor PM; especialmente los metilnaftalenos se conservaron en un 40 %.

Posteriormente se estudió el efecto de concentraciones subletales de la WSF sobre el contenido lipídico, las clases de lípidos y los ácidos grasos (AG) en músculo y hepatopáncreas (HP) de camarones adultos y embriones. Luego de 21 días de exposición a la WSF se observó una disminución significativa de los lípidos totales de adultos aunque no se pudieron detectar diferencias significativas en el contenido lipídico de músculo, HP y huevos. Los cocientes triacilglicerol/fosfolípidos se incrementaron en HP y disminuyeron en huevos de los organismos expuestos a la WSF, sugiriendo una alteración en la movilización de los triacilgliceroles a los fosfolípidos o en el balance energético. En músculo la única clase de lípidos que mostró un cambio significativo fue la de las astaxantinas. Con respecto a la composición de AG se observó que el 20:5 n-3 (EPA) y el

18:1 n-9 fueron los predominantes en HP mientras que en músculo el EPA representó más del 18 %. En huevos controles los principales AG fueron el 18:1 n-9 y el 16:0. Se comprobó que la WSF no afecta notoriamente la composición de AG.

A continuación se evaluó el efecto de concentraciones subletales de la WSF sobre el catabolismo lipídico de adultos y embriones en estadios 4 y 5. Luego de 7 días de exposición se obtuvieron las fracciones mitocondrial, microsomal y citosólica de los HP y embriones. En estas fracciones se determinaron las actividades enzimáticas de: sistema de β -oxidación, palmitoil-CoA ligasa mitocondrial y TAG-lipasa, respectivamente. Como no existían antecedentes de estudios de la actividad palmitoil-CoA ligasa mitocondrial en crustáceos, previamente a estos estudios hubo que estandarizar las condiciones de los ensayos.

En HP y huevos en estadio 5, la actividad enzimática en los organismos expuestos a la WSF resultó más elevada con respecto a los controles tanto para el sistema de β -oxidación, como para palmitoil-CoA ligasa mitocondrial y TAG-lipasa. Por el contrario, los huevos en estadio 4 presentaron un incremento significativo solamente en la actividad lipasa.

Los resultados señalaron que existe un incremento de las vías catabólicas de los lípidos como respuesta a la exposición a los hidrocarburos contaminantes; posiblemente debido a la necesidad de un aporte energético para inducir mecanismos de defensa. Debido a su sensibilidad, estos cambios de actividad enzimática podrían utilizarse como biomarcadores tempranos de contaminación, como alternativa a las medidas bioquímicas clásicas de estrés oxidativo.

Asimismo se estudió el efecto de la WSF sobre la palmitoil-CoA ligasa microsomal y síntesis de acilglicerol; enzimas microsomales relacionadas con el anabolismo lipídico. Luego de una semana de exposición a la WSF, los organismos mostraron un aumento significativo en la actividad de la palmitoil-CoA ligasa microsomal tanto en el HP de los adultos, como en embriones en estadio 4 y 5.

También la actividad de síntesis de acilglicerol totales se incrementó significativamente en el HP y en los embriones en estadio 5 expuestos a la WSF, mientras que los embriones en estadio 4 no mostraron diferencias significativas. Con respecto a la síntesis de las diferentes clases de lípidos, los adultos expuestos a la WSF mostraron un aumento significativo en la fracción correspondiente a los triacilglicéridos. Por lo tanto, los procesos del catabolismo y anabolismo lipídico son afectados por la WSF, reflejando el

principal rol energético de los lípidos en el camarón. Para determinar si el incremento en la actividad de las enzimas microsomales se debía a modificaciones de esta membrana, se evaluó el efecto de la WSF sobre la fluidez de la misma. Se observó que los microsomas de los HP de camarones controles y expuestos a la WSF, incubados con el fluoróforo liposoluble DPH, no mostraron diferencias significativas en su fluidez. Sin embargo, cuando se incubaron microsomas controles con WSF *in vitro* se observó un aumento significativo de la fluidez dependiente de la temperatura y la concentración de la WSF.

De los resultados de estos experimentos podemos inferir que, si bien la exposición *in vivo* de camarones adultos a la WSF aumenta la actividad de las enzimas microsomales ensayadas, este cambio no se debería a una alteración directa de la fluidez de la membrana, y posiblemente exista una inducción de la síntesis de estas enzimas o algún mecanismo modulador de la actividad. Los HC provocan una alteración en la fluidez solo a altas concentraciones, factibles de encontrar en el ambiente solo inmediatamente después de un derrame.

En vista de la importancia del sistema de defensa antioxidante (SDA) en organismos sujetos a estrés se determinó el efecto de la WSF sobre algunos parámetros del SDA en HP, branquias y hemolinfa de adultos, así como en las últimas etapas de la embriogénesis.

La actividad de glutatión-S-transferasa (GsT) mostró un incremento significativo con respecto a los controles en branquias y HP, mientras que la catalasa (CAT) solo aumentó su actividad en HP. La capacidad antioxidante no enzimática de hemolinfa del grupo tratado no mostró diferencias con relación al grupo control. Los huevos mostraron una elevada actividad basal GsT y CAT comparado a los adultos controles, aunque no fueron afectadas por el tratamiento con la WSF. Con respecto a los resultados de los ensayos de capacidad antioxidante no enzimática en huevos, se observó que los expuestos a WSF mostraron valores significativamente más bajos que los controles. Es decir, que en las condiciones estudiadas la WSF aumenta la actividad de enzimas involucradas en el SDA tanto en HP como en branquias de individuos adultos, mientras que provoca una disminución de la capacidad antioxidante no enzimática en huevos.

Varios de los mecanismos descritos en este trabajo podrían ser utilizados como biomarcadores de contaminación por petróleo.

"Effect of hydrocarbon pollution on the biology and metabolism of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii*".

Aquatic pollution by oil spills is especially critical in rivers and coastal waters such as La Plata River estuary in Argentina. In this region there is an urgent need to evaluate the ecotoxicological effects of hydrocarbons in species of the community as the area is exposed to several xenobiotics and is the most contaminated region of the country in terms of hydrocarbons. Although the most visible of an oil spill is the surface slick or mousse, the fraction really responsible for the toxic effects is the water-soluble hydrocarbon fraction (WSF). These hydrophobic compounds would preferentially accumulate in membranes and other lipid stores of cells, so lipid levels, composition and dynamics are critical factors controlling the uptake, bioaccumulation and toxicity. When choosing a parameter to evaluate pollution, biochemical responses to sublethal exposures (**biomarkers**) are particularly valuable to monitor contaminant levels. It is also important to assess the impact of oil spills using local species particularly their early life stages (ELS), which are usually the most sensitive. One such species, representative of the benthic community of the area, is the autochthonous freshwater shrimp *Macrobrachium borellii* whose adults, larvae and embryos were selected as a model.

This work has focused on two aspects: (a) the study of the effect of the WSF on several biological, biochemical and biophysical parameters, evaluating the potential of *M. borellii* as a pollution biomarker and (b) increase our knowledge on aspects of crustacean lipid metabolism and perform the first description of its antioxidant defense system.

Studies started determining the baseline levels of hydrocarbons (HC) in different matrix of the sampling area. Samples of water, sediment and biota were obtained over 22 month on the "Arroyo El Pescado" stream, near La Plata City. Water pH, temperature, conductivity and organic matter of the sediment were also determined. Dissolved HC were extracted from water by serial extraction with hexane. Several extraction methods were assayed for sediment and tissue samples, selecting sonication in hexane for sediment and steam distillation for the later. HC were then analyzed by capillary gas chromatography showing the presence of aliphatic HC mainly nC29, nC31 and nC33, and no aromatics in the sediment samples. To determine the origin of these HC, 7 distribution indexes were employed; all indicating that sediment HC were of biogenic origin, especially from higher

plants. As no petrogenic HC were detected in the water and shrimp either, **we were able to establish a valuable baseline level of reference for monitoring the pollution status of this environment**, and therefore we always performed sampling in this area free from anthropic HC contamination, that we nevertheless checked throughout the study period every 2-3 month.

Before beginning the studies, we also needed to develop a non-invasive technique to identify the developing stage of embryos. We therefore studied morphometry from just-laid eggs until hatching under controlled laboratory condition. Embryos were kept in the laboratory and development divided into 7 stages according to major morphological characteristics. This lecithotrophic, freshwater shrimp has a highly abbreviated type of development hatching after 39 ± 2 days as zoea larvae at 24 C.

Eggs are ovoid with a maximum diameter that varies from the moment of oviposition to the time of hatching from 1.5 to 2.0 mm, respectively. Water content and egg size increase along development, whereas egg shape only varies just before hatching when the egg becomes strongly ovoid. Yolk represents more than 95% of the egg at the time of oviposition falling to 22% by the time of hatching. The major yolk area decrease was observed between stages 4 and 5 which is coincident with a marked increase in catabolism.

Using only egg coat, yolk and eye shape and maximum diameter, **we were able to straightforwardly identify an embryo developing stage with an accuracy ranging from 70 to 100 %**. This tool may be employed in other species provided they have transparent chorion.

Being now confident that the area, and shrimp were not contaminated, and having developed an accurate embryo staging method, we proceeded with the laboratory bioassays of bioaccumulation, biodepuration and metabolic effects of WSF from crude oil.

First we evaluated the effect of the WSF on *M. borellii* exposed at three life stages. Adults, larvae and embryos were exposed to five levels of WSF for 96-h. At 48 h and 72-h larvae were significantly more sensitive to WSF than adults, though **values for 96-h LC50 were not significantly different (1.56 mg/L and 1.41 mg/L for adults and larvae respectively)**. Unexpectedly, mortality was never high enough to allow LC50 calculation in embryos, but **chronic exposure to WSF increased embryo mortality near hatching, and significantly decreased larval survival** compared to the control group. To investigate if the resistance of embryos was due to a protecting effect of the eggshell, we

studied its permeability using the fluorophore 2,6-diphenylhexatriene (DPH). We observed by fluorescence microscopy that **eggshell was permeable to these hydrophobic compounds**, especially at the end of development, suggesting that there is some other protection mechanism involved. We also studied the egg structure by electron microscopy, and observed that eggshell is similar to other Palaemonidae eggs, composed of multiple layers, the outer one possibly of maternal origin, and the 4 inner ones synthesized by the embryo.

The uptake, accumulation and depuration of WSF were evaluated in adult prawns (lipid content 1.5% wet wt) exposed to a sublethal concentration for 96 h followed by a 10 d depuration period. Hydrocarbons were rapidly taken up, and after 24 h most of them reached an equilibrium concentration. **Increases in the number and alkylation of the aromatic HC rings enhanced both their accumulation and retention in shrimp tissues**. When returned to clean freshwater, levels of lighter aromatics dropped rapidly over 12 h. From these studies we conclude that early life stages of *M. borellii* are not very vulnerable to WSF toxicity, while **adults have a rapid uptake and release of most of the contaminating hydrocarbons**, probably due to their lipid levels.

We therefore turned into the effect of WSF on the lipid content, lipid classes and fatty acids was studied in high-phospholipid (hepatopancreas, HP) and low-phospholipid (eggs). After a 21-day exposure to sublethal concentration of WSF, a significant decrease in shrimp total lipids was observed, though no alterations could be detected in HP or egg lipid content. **Triacylglycerol/phospholipid ratios increased in HP and decreased in eggs by WSF exposure, suggesting alterations either in the mobilization of triacylglycerols to phospholipid pools or in the energy balance**. The fatty acid composition of phospholipids in HP and eggs was dominated by polyunsaturated fatty acids (PUFA), while the **n-3/n-6 fatty acid ratio was not affected by WSF exposure**, though there was a significant increase in HP oleic fatty acid (18:1n-9).

This study was extended to determine, for the first time in crustaceans, the effect of WSF on the enzymatic systems involved in the activation and degradation of fatty acids, and in the synthesis of triacylglycerols and phospholipids. To this end we analyzed subcellular fractions of eggs and hepatopancreas after a 7-day exposure so sublethal concentrations of WSF. **Mitochondrial palmitoyl-CoA ligase was characterized for the first time in a crustacean**. Its activity was significantly increased in exposed HP and stage 5 eggs, together with β -oxidation and triacylglycerol lipase activities, suggesting there

is an increase in the catabolic pathways as a response to WSF, probably because of the need of more energy to cope with the contaminant.

Due to their sensitivity, these **enzymes of lipid metabolism could potentially be employed as early pollution biomarkers**, as an alternative or complement to classic oxidative stress ones. Microsomal palmitoyl-CoA ligase also increased its activity in eggs and adult HP, while an increase in the synthesis of triacylglycerols was observed in HP of exposed organisms, opposed to an active phospholipid synthesis all along embryo development.

We conclude that both the **anabolic and catabolic processes concerning lipid metabolism are affected by WSF, reflecting the major role of lipids in shrimp energetics**. In embryos, highest alteration of lipid synthesis-hydrolysis took place at stage V when embryos are under active organogenesis. To determine if the increase of membrane enzymes was due to membrane alteration, their membrane fluidity was in isolated microsomes from exposed and control shrimp. Fluorescence anisotropy of DPH showed no modification of membrane fluidity by WSF exposure, but when control microsomes were incubated *in vitro* with WSF a significant fluidity increase dependent on WSF concentration and temperature was observed. Thus, **increase of membrane enzyme activity by WSF do not depend on membrane properties, suggesting an induction of enzyme synthesis. HC only altered shrimp membrane fluidity at concentrations that could be found in the water column immediately following and oil spill.**

The antioxidant defense system (ADS) is of vital importance in organisms subjected to stress. We therefore explored for the first time some aspects of the ADS of *M. borellii* adults and embryos at late stages of development. The exposure to WSF showed an increase in gills' glutathion-S-transferase (GsT) and HP catalase, while hemolymph total non-enzymatic antioxidant capacity was not significantly affected by HC exposure. Egg showed high basal levels of catalase and GsT activities compared to adults and were not affected by WSF treatment, but non-enzymatic antioxidant capacity was lowered. Overall, **WSF increased the activity of ADS enzymes in adults while decreased the non-enzymatic antioxidant capacity of eggs.**

Some of the mechanisms described in the present work for *M. borellii* could be employed as early biomarkers of hydrocarbon pollution.

AG:	ácidos grasos
ATP:	adenosíntrifosfato
ASX:	astaxantina
CAT:	catalasa
Ci:	curie (2.22 10 ¹² desintegraciones por minuto)
CoA:	coenzima A
COL:	colesterol
DCM:	diclorometano
DAG:	diacilgliceroles
DPH:	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
dpm:	desintegraciones por minuto
EC:	ésteres de colesterol
EDTA:	ácido etilendiaminotetracético
EMAG:	ésteres metílicos de ácidos grasos
FAD:	flavina adenina dinucleótido
GLC:	cromatografía gas-líquido
GsT:	glutación S-transferasa
HC:	hidrocarburos
HP:	hepatopáncreas
Kow:	coeficiente de reparto octanol/ agua
L:	larvas
LC50:	concentración letal 50%
μCi :	microcuries (10 ⁻⁶ curies)
μg:	microgramos (10 ⁻⁶ gramos)
μl:	microlitros (10 ⁻⁶ litros)
MO:	materia orgánica
MOPS:	3-(N-morfolino)-propano-ácido sulfúrico
N:	normal
NAD ⁺ :	nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
nm:	nanometros (10 ⁻⁹ metros)
PAH:	hidrocarburos poliaromáticos
PC:	fosfatidilcolina
PE:	fosfatidiletanolamina
PL:	fosfolípidos
ppb:	partes por billón
ppm:	partes por millón
Rf:	distancia recorrida por el soluto/ distancia recorrida por el solvente
rs:	anisotropía del estado estacionario
SDA:	sistema de defensa antioxidante
SM:	esfingomielina
TAG:	triacilgliceroles
TLC:	cromatografía en capa fina
WSF:	fracción soluble de hidrocarburos

Capítulo I

Introducción general

I.A. Consideraciones generales

La contaminación ambiental es responsable de gran variedad de problemas que incluyen efectos nocivos tanto sobre la salud humana como sobre el ecosistema, y es causa de serios perjuicios económicos. La contaminación del ambiente puede ocurrir como consecuencia tanto de factores naturales como por la actividad humana. Puede manifestarse por exposiciones a concentraciones relativamente pequeñas de tóxicos durante períodos largos afectando crónicamente a los organismos, o bien puede manifestarse intensamente de modo agudo en los accidentes catastróficos que ocurren cada vez con mayor frecuencia. Es importante tener en cuenta las consecuencias de estos hechos y un factor que influye notablemente es el contexto donde estos tienen lugar, que en muchos casos puede ser más importante que las meras consideraciones sobre la magnitud absoluta de los mismos.

Históricamente, el "paradigma de la dilución" que sostenía que "la solución a la contaminación es la dilución", fue lentamente reemplazado por el paradigma del "boomerang": "todo lo que arrojes puede volver y dañarte", dadas las consecuencias inaceptables para la salud humana y la integridad ecológica. En este sentido, el rápido desarrollo de la ecotoxicología es fundamental para nuestro bienestar, ya que permite determinar los costos y beneficios de las innumerables decisiones tecnológicas e industriales que afectan nuestra vida (Newman y Unger, 2003a). Es fundamental para conservar el ambiente dentro de los límites normales de los sistemas naturales conocer cómo funcionan, asegurar que la información esté disponible para la toma de decisiones así como el desarrollo de las herramientas y la integración multidisciplinaria para asegurar el mantenimiento de la biodiversidad.

I.B. Contaminación acuática

El ambiente acuático es complejo y diverso, incluye ríos, arroyos, lagos, lagunas de agua dulce, estuarios, costas marinas y aguas profundas de océanos, cada uno con componentes bióticos y abióticos con características únicas. Los componentes bióticos comprenden las asociaciones de plantas, animales, y microorganismos que habitan un nicho ecológico específico dentro de cada ecosistema. El componente abiótico incluye el ambiente físico como por ejemplo el agua, el sedimento sustrato y el material particulado

en suspensión que se encuentre dentro del límite del ecosistema. Cada ecosistema acuático es por lo tanto un producto dinámico de interacciones complejas entre los componentes vivos y no vivos con características constantes y cambiantes en tiempo y espacio (Rand y col. 1995).

Los cuerpos de agua son el último destino de las sustancias tóxicas liberadas al medio por la actividad antrópica. El control y manejo de estas descargas es difícil puesto que ingresan al medio desde fuentes múltiples y difusas. Cuando las sustancias ingresan al ecosistema, se producen una variedad de reacciones fisicoquímicas y biológicas que determinan su capacidad para “tolerar” una determinada carga de contaminante, pero cuando los niveles de contaminantes exceden la capacidad de asimilación, estos pueden afectar la supervivencia, desarrollo, crecimiento, reproducción, o comportamiento de los organismos (Cooney, 1995).

La toxicología acuática estudia el efecto de químicos manufacturados y otros materiales y actividades antropogénicos sobre organismos acuáticos a diferentes niveles de organización, desde el subcelular o bioquímico pasando por los organismos individuales, hasta el estudio de comunidades y ecosistemas. Los efectos pueden causar desviaciones con respecto a las situaciones previas. La toxicología acuática centra su atención principalmente sobre aquellas desviaciones adversas para el ambiente y sobre los procesos de recuperación de la biota que pueden ocurrir cuando las exposiciones a sustancias tóxicas disminuyen. Los principales efectos adversos a nivel de organismos, que incluyen tanto los de corto como los de largo plazo, son la letalidad, y los efectos subletales como por ejemplo los cambios en el comportamiento, crecimiento, desarrollo, reproducción, acumulación y detoxificación, y estructura tisular. A nivel de sub-organismos los efectos adversos incluyen inducción o inhibición de enzimas o sistemas enzimáticos, y por ende alteraciones metabólicas. A nivel supra-organismos se consideran los efectos adversos sobre los cambios en el genotipo y/o fenotipo, como también cambios en el número, abundancia relativa, y condiciones fisiológicas de las especies típicas halladas dentro de una comunidad tipo (Rand y col. 1995).

Debido a que los agentes tóxicos pueden encontrarse dentro del ambiente acuático tanto en el agua como en sedimentos y alimento, el conocimiento de su cantidad, concentración y biodisponibilidad en estos compartimientos es de importancia primaria. Es necesario entonces cuantificar los efectos a diferentes niveles de organización por medio de varios criterios como por ejemplo, la supervivencia, el éxito reproductivo, condiciones

del organismo, número y abundancia de especies en una comunidad. Es indispensable asimismo conocer los factores químicos, físicos y biológicos que afectan las concentraciones de los contaminantes en el ambiente, para poder determinar cómo actúan sobre este y cómo el ambiente actúa sobre los contaminantes, para estimar la exposición sobre los organismos acuáticos. En definitiva, un conocimiento integrado de la ecología acuática, la fisiología, la bioquímica, la histología, el comportamiento y la química ambiental, se requieren para entender los efectos de los contaminantes sobre los organismos acuáticos.

I.B.1. Contaminación por petróleo

Considerando las numerosas formas de contaminación ambiental, el impacto de los hidrocarburos (HC) petrogénicos, tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres, probablemente sea el de mayor repercusión pública (Mendes Da Silva y col., 1997). La contaminación aguda por petróleo en ambientes acuáticos ocurre frecuentemente en forma de derrames ya sea por accidentes de buques tanques o descargas de industrias petroquímicas. Los derrames producidos por accidentes y fugas naturales causan el ingreso concentrado de hidrocarburos dentro del ambiente acuático, generalmente en un muy corto período de tiempo, lo que puede afectar seriamente la flora y fauna locales. La gravedad de un derrame depende de varios factores, incluyendo volumen derramado, tipo de petróleo, su destino final y factores ambientales tales como clima y época del año. Los HC solubles en el agua son responsables de los efectos tóxicos del petróleo, sobre todo la fracción correspondiente a los hidrocarburos aromáticos (GESAMP, 1993). Si bien lo más visible del petróleo en el agua es la capa en la superficie, la fracción que realmente es responsable de los efectos tóxicos es la hidrosoluble (WSF). La composición de la WSF es semejante a la del diesel o los combustibles domésticos (Ackman y col., 1997). La toxicidad es en general mayor en compuestos que tienen alto peso molecular, pero en el agua los más solubles son los de menor peso molecular y quienes tienen los mayores efectos tóxicos. Debido a esto y a otras consideraciones fisicoquímicas, existen diferencias en las toxicidades de diferentes tipos de petróleo (GESAMP, 1993). Luego de ocurrido un derrame, numerosos procesos físicos, químicos y biológicos interactúan causando cambios en las propiedades del petróleo. Los procesos de alteración de los HC más importantes incluyen la evaporación, disolución, dispersión dentro de la columna de

agua, formación de emulsiones, oxidación fotoquímica, degradación microbiana, adsorción al material particulado en suspensión, y la acumulación en el sedimento (Neff y col., 2000).

La contaminación acuática por derrames de petróleo es especialmente crítica en ríos y costas aunque esto depende del tipo de ecosistema que se esté considerando. Los derrames de petróleo en aguas dulces son frecuentemente complicados por su proximidad a las riberas, corrientes de agua fuertes, pequeños volúmenes de agua, flujos unidireccionales y potencialmente mayores por las inundaciones, que los derrames que ocurren en el ambiente marino (Walker y col., 1995). El petróleo es generalmente más retenido en ambientes de baja energía que en las costas marinas barridas por el oleaje (Bhattacharyya y col., 2003). El estuario del Río de La Plata es una región que necesita una urgente evaluación de los efectos ecotoxicológicos de los HC. El área está expuesta a numerosos contaminantes debido a las actividades industriales y portuarias que operan en la zona (AGOSBA-OSN-SHN, 1992). Es la región más contaminada del país en términos de hidrocarburos poliaromáticos (PAH) y alcanos (FCS, 1994) habiéndose informado por ejemplo concentraciones de HC 0,7 mg/l en el agua superficial de áreas puntuales (Colombo y col., 1989), siendo las concentraciones más bajas en otras regiones del Río de La Plata y más elevadas en las cercanías de emisarios cloacales o el Riachuelo. Como ocurre en otros cuerpos de agua, la mayor fuente de ingreso de petróleo son las descargas domésticas e industriales tanto como los accidentes ocurridos durante el transporte (SHN-SOHMA 1989). Sin embargo los derrames por accidentes de buques petroleros en el Río de La Plata, son los que han tenido mayor repercusión pública tales como el del “San Jorge” sucedido en Febrero de 1997 o dos años después el “Estrella Pampeana” ocurrido en Enero de 1999 en las costas del Río de La Plata. Seis meses después de ocurrido un derrame, estudios de monitoreo revelaron la presencia de HC en aguas costeras, sedimentos y biota en niveles de 1-3 ordenes de magnitud mayores a las concentraciones de línea de base (Colombo y col., 2004). En general, la velocidad de recuperación depende entre otros factores de la ubicación geográfica, energía del ambiente y el clima. Por ejemplo en el caso del derrame de Magdalena, la abundante energía del Río de La Plata en forma de sudestadas, relativamente elevada temperatura e intensa erosión costera han permitido la recuperación rápida (3-4 años).

Numerosos trabajos han descrito los efectos causados por este tipo de contaminantes sobre los organismos. Por ejemplo, luego del derrame del petrolero *Exxon*

Valdez en Alaska, se encontraron deformidades morfológicas y anomalías citogenéticas en larvas de arenque *Clupea payáís* (Hose y col., 1996). En larvas de crustáceos como *Eurypanopeus depressus* el efecto tóxico de concentraciones subletales del petróleo produjo un incremento en los períodos de intermudas y anomalías morfológicas (Cucci y Epitafio, 1979), y en *Lithodes santolla* y *Paralomis granulosa* provocaron una disminución en la proporción de mudas y fallas en la natación (Amin y Comoglio, 2002). También, se ha observado que el petróleo puede inducir cambios en el comportamiento e influir en la alimentación, como presentaron las estrellas de mar *Coscinasterias muricata* y *Evasterias troschelii* cuando fueron expuestas a la WSF (Temara y col., 1999; O'Clair y Rice, 1985). HC del petróleo pueden alterar la capacidad reproductiva, tal es el caso del efecto del naftaleno sobre el decápodo *Procambarus clarkii* que presentó atresia ovárica con una notable degeneración de los oocitos previtelogénicos y vitelogénicos (Sarojini y col., 1995), o los efectos citotóxicos en células del hepatopáncreas (HP) de este decápodo (Sarojini y col., 1993). En condiciones de elevado estrés también se ha relacionado a la contaminación por petróleo con el desarrollo de infecciones virales latentes en moluscos e inmunosupresión en peces (Sindermann, 1982). Los efectos biológicos de los HC del petróleo en organismos acuáticos dependen de la habilidad de los organismos para acumularlos y metabolizarlos, y de la interferencia que produzcan en los procesos metabólicos normales que puedan alterar las chances de supervivencia y reproducción de los organismos (Capuzzo, 1985). Se ha observado también que los organismos expuestos a concentraciones subletales de HC, pueden sufrir cambios fisiológicos resultando en una disminución neta de la energía disponible para el crecimiento y la reproducción (Tatem, 1977; Capuzzo y col., 1984; Johns y Pechenik, 1980).

I.B.2. Efecto de contaminantes orgánicos sobre el metabolismo

La intensidad del daño producido por un tóxico depende de la cantidad y de las velocidades de absorción, distribución, metabolismo y excreción del mismo en cada organismo (Figura I.1). Una vez que los tóxicos han sido absorbidos, se distribuyen por el sistema circulatorio a los diferentes tejidos de acuerdo a factores tales como, la lipo o hidrosolubilidad, las posibles interacciones con macromoléculas y el pH del medio (Figura

I.1). Posteriormente, los procesos de detoxificación originan compuestos que pueden ser más o menos activos que el original (Díaz de Toranzo, 1990).

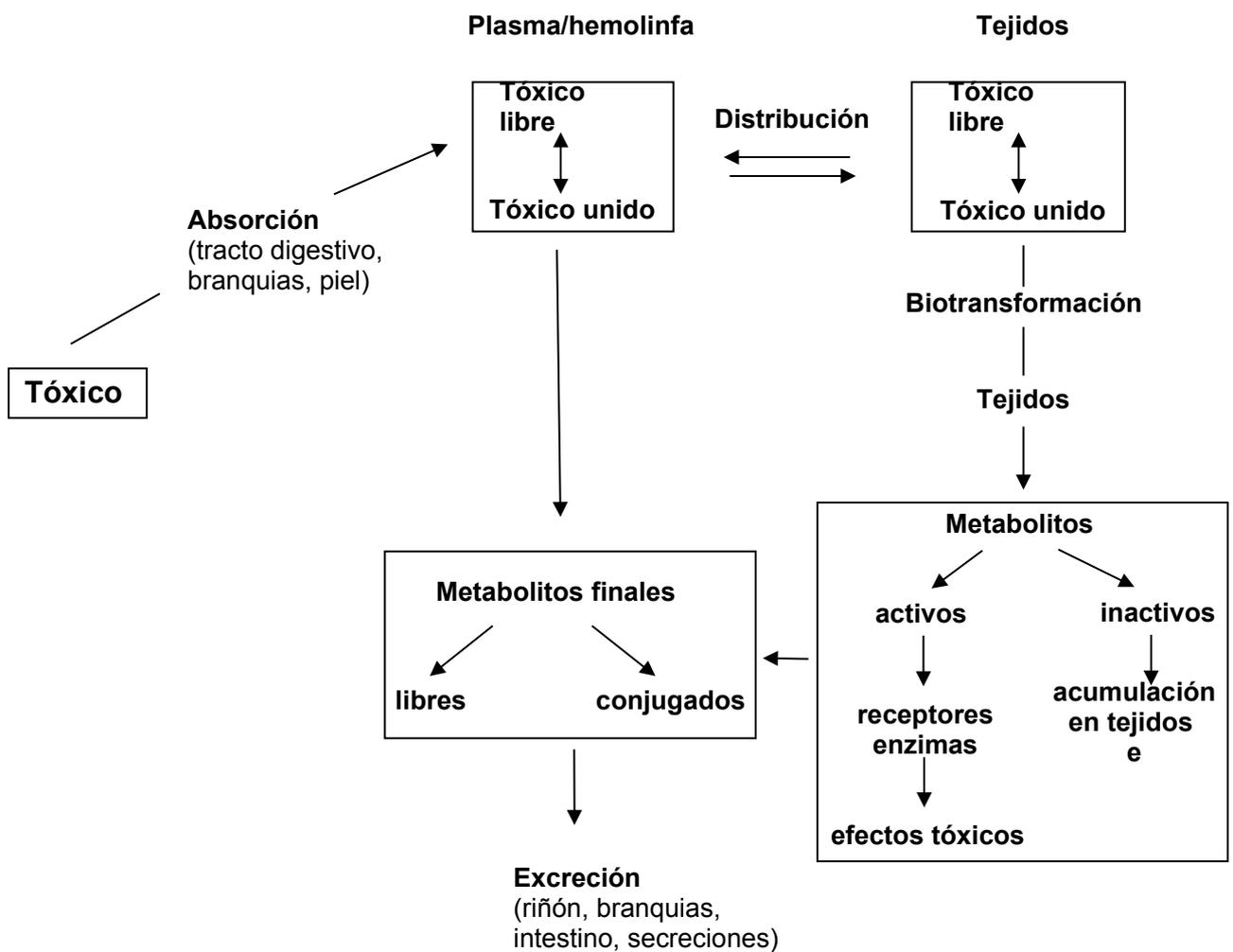


Figura I.1. Rutas de un tóxico dentro de un organismo.

La mayoría de los contaminantes orgánicos son lipofílicos (como los HC) y son absorbidos pasivamente a través de las membranas lipídicas de las branquias, piel, y el tracto digestivo. Luego de la absorción, el efecto de estos compuestos depende de su susceptibilidad a la biotransformación (Di Giulio y col., 1995). Compuestos que son recalcitrantes al metabolismo, tienden a acumularse en tejidos ricos en lípidos como los depósitos de triacilglicéridos (TAG). Aquellos que están sujetos a transformación, pueden ser convertidos en metabolitos hidrosolubles mucho más fáciles de eliminar que los compuestos parentales (Di Giulio y col., 1995).

Todos los organismos poseen sistemas enzimáticos involucrados en la biotransformación y detoxificación de contaminantes orgánicos que se suelen agrupar para su estudio en: (a) “metabolismo de Fase I” donde se producen reacciones de oxidación, reducción, hidratación e hidrólisis que introducen o modifican un grupo funcional (HO^- , HCOO^- , NO_2^- , etc.) dentro del tóxico, y (b) “metabolismo de Fase II” donde las conjugasas u otras enzimas introducen un grupo de mayor polaridad (Livingstone, 1998).

El metabolismo de Fase I comprende las enzimas oxidativas de la familia de las citocromo P-450 (CYP1A) monooxigenasas. Estas se inducen por la presencia de contaminantes orgánicos como los PAH, bifenilos policlorados, dibenzodioxinas, y dibenzofuranos. Como observaron Stagg y col. (1998), los PAH acumulados en sedimentos luego del derrame del petrolero Braer indujeron la actividad del citocromo P-450 en *Salmo salar* y dicha actividad estuvo relacionada directamente con la concentración de PAH. También las monooxigenasas están involucradas en el metabolismo normal de ácidos grasos, colesterol y hormonas esteroideas. Estas enzimas se localizan en retículo endoplasmático, principalmente en hígado de vertebrados, en hepatopáncreas de crustáceos y en glándula digestiva de moluscos (Livingstone, 1998).

Muchos contaminantes orgánicos inducen a través de los procesos oxidativos de la Fase I, daño oxidativo por la formación de metabolitos intermedios que son responsables de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^*) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La producción de ROS puede incrementarse por el metabolismo de compuestos endógenos naturales, por contaminantes pro-oxidantes o por cambios de la tensión de

oxígeno (Arun y Subramanian, 1998). Las ROS pueden reaccionar indiscriminadamente con casi todos los compuestos orgánicos, incluyendo macromoléculas, posiblemente produciendo degradación proteica e inactivación enzimática, peroxidación lipídica, daño de los ácidos nucleicos y por último, muerte celular. Los organismos han desarrollado defensas antioxidantes contra las ROS, las cuales se pueden clasificar en: (a) mecanismos no enzimáticos dentro de los que se incluyen a los reductores hidrosolubles como el glutatión, el ascorbato (vitamina C), y el ácido úrico; secuestradores de radicales liposolubles como el tocoferol (vitamina E) y el β -caroteno (vitamina A); (b) y mecanismos enzimáticos entre los cuales se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD) que remueve los radicales libres superóxido, la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSX) que actúan sobre el peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos (Figura I.2).

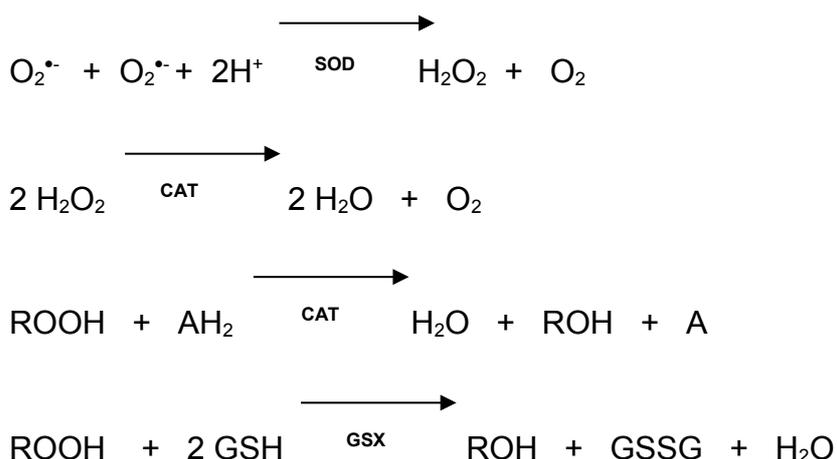


Figura. I.2. Acción de las principales enzimas del sistema de defensa antioxidante enzimático. Para las referencias ver texto.

En definitiva, el daño oxidativo refleja un desbalance entre la producción de compuestos oxidantes y la remoción y captación de los mismos por los mecanismos moleculares mencionados anteriormente (Winston y Di Giulio, 1991).

Las enzimas de Fase II intervienen en reacciones biosintéticas, donde el tóxico o el metabolito originado por los procesos oxidativos de la Fase I, es unido covalentemente a grupos generalmente polares como los derivados de carbohidratos (ácido glucurónico),

aminoácidos (glutati6n, GSH), o sulfatos (Di Giulio y col., 1995). Dentro de este grupo se encuentran las enzimas glutati6n S- transferasas (GST), una familia de enzimas de biotransformaci6n que catalizan la adici6n nucleof6lica del tripeptido GSH a una amplia variedad de compuestos electrof6licos. Estas enzimas tambi6n est6n involucradas en el transporte citoplasm6tico de compuestos lipof6licos end6genos o ex6genos a los sitios de metabolismo de Fase I. Adem6s, son capaces de unirse covalentemente a ep6xidos previniendo la uni6n de estas especies activas a macromol6culas como los 6cidos nucleicos (Di Giulio y col., 1995).

Como se ver6 en la secci6n siguiente, las respuestas enzim6ticas son frecuentemente usadas para detectar efectos de concentraciones subletales de t6xicos sobre el metabolismo de los organismos indicadores (De Coen y Janssen, 1997). Por ejemplo, si consideramos el efecto de la WSF en la biota acu6tica, Chambers y col. (1978) observaron en el camar6n *Penaeus sp.* que el petr6leo crudo alter6 el metabolismo proteico, increment6 el metabolismo energ6tico anaer6bico, y produjo cambios en el ret6culo endoplasm6tico. En branquias de salm6n (*Salmo salar*), la WSF caus6 una reducci6n de la actividad del metabolismo aer6bico y anaer6bico (Gagnon y Holdway, 1999). Estudios del metabolismo de carbohidratos realizados en el cangrejo *Silla serrata* mostraron que el naftaleno disminuy6 el nivel de gl6cidos afectando la vitelog6nesis (Elumalai y Balasubramanian, 1997). Mientras que la WSF fue responsable de inducir una repuesta endocrina aumentando el cortisol y hormonas tiroideas en larvas y juveniles del pez *Scophthalmus maximus* (Stephens y col., 1997).

I.B.3. Biomarcadores

Como ya se mencionara, los contaminantes pueden causar cambios en todos los niveles biol6gicos de organizaci6n. Actualmente se reconoce que si solo se focalizan los estudios de los efectos de contaminantes sobre los cambios a nivel de la comunidad, muchos efectos biol6gicos leves o cr6nicos no detectables podr6an resultar en cambios irreversibles a largo plazo, que podr6an ocurrir en ecosistemas aparentemente sanos, y no ser inicialmente detectados en estudios a este nivel (Hyne y Maher, 2003).

Aunque el ecosistema, la comunidad, y la poblaci6n son niveles sobre los cuales se monitorean habitualmente los efectos t6xicos, impulsado especialmente por las normas de

regulación del manejo y la gestión ambiental, los efectos tóxicos se manifiestan primero a nivel molecular-subcelular provocando deterioro en las funciones biológicas.

Hay que tener en cuenta dos importantes conceptos: (a) todos los efectos tóxicos comienzan por la interacción con biomoléculas, (b) los efectos se transmiten a través de la "cascada" de los niveles de organización:

bioquímico → subcelular → celular → tisular → órgano → individuo → población → comunidad → ecosistema → biosfera

Como consecuencia, el entendimiento de los efectos a nivel bioquímico puede proveer el conocimiento de los efectos a niveles elevados dentro de la ruta. También, la comprensión de los mecanismos bioquímicos podría predecir mejor los efectos de los contaminantes no ensayados, basándose en la similitud del modo de acción de contaminantes bien estudiados. Además, si varios contaminantes están presentes, cambios bioquímicos específicos pueden proveer pistas valiosas acerca de qué contaminante está causando el efecto (Newman y Unger, 2003b). La definición de biomarcador se ha ido modificando y actualmente el término es usado en un sentido más restringido, refiriéndose a "los cambios bioquímicos subletales que resultan de la exposición a los contaminantes" (Hyne y Maher, 2003). Este será el sentido con que se lo empleará en este trabajo.

Los cambios a nivel bioquímico ofrecen ventajas como biomarcadores ya que las alteraciones moleculares son usualmente las primeras en detectarse, y pueden servir como indicadores de exposición y efecto. Entre los cambios bioquímicos clásicamente utilizados como biomarcadores se encuentran: la inducción de citocromo P-450 y otras enzimas de Fase I y II, inhibición de acetilcolinesterasa por insecticidas organofosforados, la formación de aductos de ADN derivados de productos intermedios del metabolismo oxidativo de compuestos orgánicos como los HC aromáticos, aumento de metalotioneínas que intervienen en la homeostasis de los metales y la inducción de proteínas de estrés tales como las del choque térmico (Segel, 1998).

Los estudios sobre los biomarcadores bioquímicos son generalmente llevados a cabo en organismos expuestos a contaminantes específicos bajo condiciones controladas de laboratorio. Estos estudios pueden ayudar a establecer las causas y los efectos relacionados, y pueden ser aplicados para predecir efectos de contaminantes específicos sobre comunidades naturales en el ambiente (Clements, 2000). Hay que tener presente,

de todas maneras, que los numerosos factores bióticos y abióticos mencionados en el punto I.B pueden influir en la extrapolación de los biomarcadores individuales al monitoreo del efecto de los contaminantes en el ambiente a niveles de población y comunidad. Las relaciones entre las respuestas de los biomarcadores y las estructuras de la población o comunidad son complicadas debido a los mecanismos de compensación que regulan la dinámica poblacional en los sistemas naturales (Newman y Unger, 2003b).

La elección de un biomarcador apropiado para monitorear la exposición en el ambiente, requiere el conocimiento de varios factores. Género, estatus reproductivo, edad y dieta son algunos de los factores que pueden influir en la respuesta de los biomarcadores en invertebrados. Los biomarcadores enzimáticos pueden variar también en forma, localización, y actividad dentro de las especies. Por ejemplo, hay evidencia que múltiples formas de una misma enzima biomarcadora están presentes en insectos e invertebrados acuáticos (Newman y Unger, 2003b). Cada isoforma puede variar en su sensibilidad al contaminante en estudio, siendo por lo tanto útil el estudio de las mismas por separado.

No solo existen diferencias en la actividad de una enzima biomarcadora entre organismos, sino que la concentración o actividad de un biomarcador en un tejido, también puede variar en respuesta al estadio de desarrollo del organismo y a la edad dentro de un estadio de desarrollo particular. Esto tiene especial importancia en la identificación de biomarcadores en invertebrados donde los estadios inmaduros generalmente presentan numerosos estados de desarrollo. Es por lo tanto crítico para poder predecir la toxicidad a partir de cambios en los biomarcadores bioquímicos en respuesta a la exposición a un contaminante, utilizar un material biológico bien definido, donde la variación en la actividad bioquímica con el desarrollo, edad, y tejidos en un organismo sea conocida.

Debido a estos atributos, las medidas de los biomarcadores en organismos de sitios que se sospechan contaminados, son un componente importante e informativo en programas de monitoreo ambiental donde las respuestas de los biomarcadores en plantas o animales de los ambientes contaminados, son comparadas con aquellas mismas especies colectadas en sitios prístinos de referencia. Idealmente estos sitios de referencia deberían ser ecológicamente idénticos a los presuntamente contaminados excepto por la presencia del contaminante (McCarty y Shugart, 1990).

Los macroinvertebrados acuáticos son comúnmente usados en programas de monitoreo biológico, pero su uso en estudios de biomarcadores ha sido limitado (Hyne y Maher, 2003).

I.C. *Macrobrachium borellii*

I.C.1. Elección como modelo

En los estudios ecotoxicológicos, se emplean generalmente los invertebrados, seleccionando aquellos que (a) estén ampliamente distribuidos, (b) sean abundantes durante todo el año, (c) que sean de fácil captura y mantenimiento bajo condiciones controladas de laboratorio, (d) que tengan ciclos de vida relativamente cortos y de los que se disponga de suficientes datos sobre su biología y preferentemente también su ecología.

Para estos estudios se seleccionó al crustáceo decápodo palemónido *Macrobrachium borellii* como modelo, debido a que cumplía con todas las características arriba mencionadas además de ser un representante de un nivel trófico elevado en la comunidad rioplatense, y a su proximidad taxonómica con especies de acuicultura económicamente importantes. Por otra parte se contaba con numerosos antecedentes sobre su bioquímica (ver I.C.6). Asimismo, otros representantes del género, como *M. malcolmsonii* y *M. nipponense*, han sido propuestos para la utilización de biomarcadores en estudios ecotoxicológicos (Saravana Bhavan y Geraldine, 2001; Gerhardt y col., 2002). Teniendo en cuenta que los organismos suelen presentar diferente sensibilidad a los tóxicos de acuerdo al estadio del ciclo vital (Rice y col., 1977), los estudios incluyeron organismos adultos, embriones y larvas.

I.C.2. Clasificación sistemática

Subfilum: Crustacea
Clase: Malacostraca
Subclase: Eumalacostraca
Superorden: Eucaridea
Orden: Decapoda

Suborden: Pleocyemata
Infraorden: Caridea
Familia: Palaemonidae
Género: Macrobrachium
Especie: *Macrobrachium borellii*

I.C.3. Distribución geográfica. Hábitat

Macrobrachium borellii (Nobili) es un camarón de agua dulce con un desarrollo larval abreviado (Jalihal y col., 1993), es uno de los macrocrustáceos más comunes y ampliamente distribuidos en la cuenca del Río de la Plata, norte de Argentina, Paraguay y sur de Brasil (Morrone y Lopretto, 1995). Viven en cursos de agua turbia y templada, en cuencas cerradas, pequeños ríos, lagos y embalses. En muchos ambientes, ha sido introducida y ha prosperado con facilidad. Particularmente en la provincia de Buenos Aires es una especie abundante (Boschi, 1981).

I.C.4. Breve descripción anátomo-fisiológica

Las características morfológicas de los decápodos caridea, grupo al que pertenece *M. borellii*, destacan la forma típica de los camarones. Están cubiertos por un exoesqueleto que es una estructura compuesta básicamente de proteína y quitina, endurecida por la deposición de sales de calcio. El cuerpo se divide en diferentes tagmata: cefalon, pereion y pleon (Figura I.3). En las hembras, durante la época de reproducción, los pleópodos se modifican para formar la cámara de incubación donde se alojan los huevos.

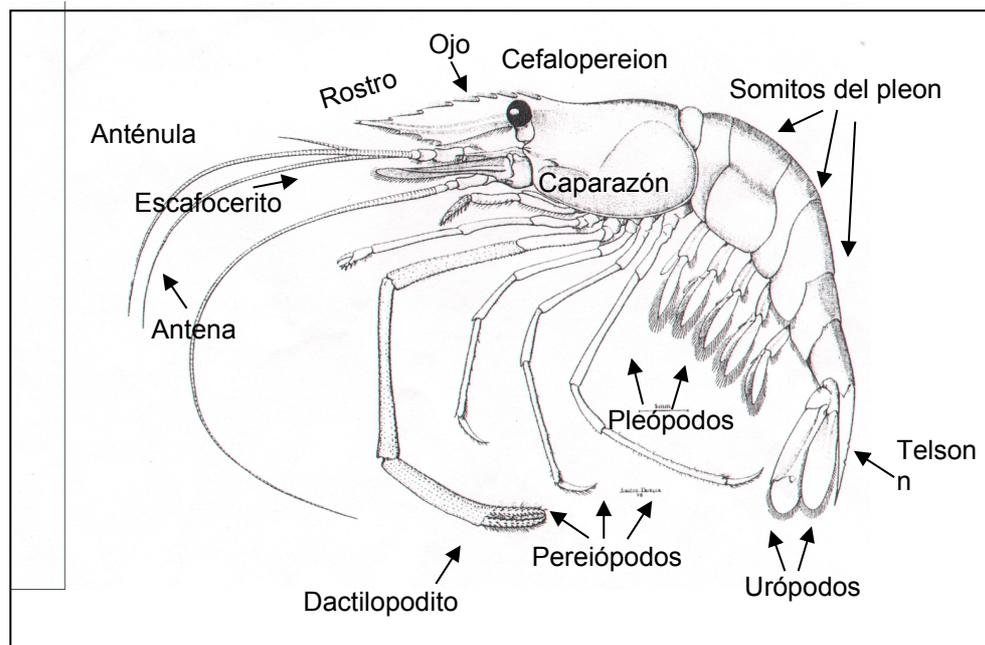


Figura I.3. Esquema de un ejemplar adulto macho de *Macrobrachium borellii*.

Los palemónidos, son organismos bentónicos que se alimentan de pequeños invertebrados y restos de animales muertos, ayudados por las maxilas, maxilípedos y pereiópodos quelados y trituran el alimento con sus poderosas mandíbulas.

Sobre la región pilórica se encuentra un órgano anexo al sistema digestivo, denominado hepatopáncreas (HP) (divertículo digestivo), que universalmente en los crustáceos está presente como glándula de diferentes formas y tamaños. Esta glándula produce enzimas; absorbe, digiere y reserva nutrientes, y excreta el material de desecho (Al-Mohanna y col., 1986). Específicamente contiene enzimas que actúan en el metabolismo de purinas, proteínas, glucógeno y lípidos, e incluye la secreción de ácidos biliares. Así, el HP cumple en gran medida el rol que tienen el hígado y el páncreas en los vertebrados. Las branquias, además de la respiración cumplen un papel importante en la excreción, osmoregulación y balance iónico de la superficie permeable.

El sistema circulatorio de los crustáceos es del tipo abierto constituido por el corazón, pericardio, arterias y venas. La hemolinfa cumple la función de transportar nutrientes entre los diferentes órganos y desde el tracto digestivo, y la de transportar en forma soluble, el pigmento respiratorio hemocianina.

El sistema reproductor está compuesto de un par de ovarios y sus correspondientes conductos anexos en la hembra, o un par de testículos y conductos anexos en el macho. En los carideos, cuando el ovario se encuentra en plena madurez sexual, ocupa gran parte de la región dorsal anterior del cefalotórax. El ovario de *Macrobrachium borellii* con los óvulos maduros se distingue por transparencia del caparazón debido al color verde oscuro que presenta. Los testículos se encuentran en la misma región que los ovarios, formando un pequeño ovillo.

I.C.5. Ciclo de vida

Son organismos bentónicos, omnívoro-carnívoros con largo corporal de 5–6 cm (Collins y Paggi, 1998) que puede llegar hasta 10 cm en casos excepcionales (observación personal). Una de las principales razones del éxito reproductivo de los crustáceos está relacionada con el hecho de que transportan sus huevos hasta la eclosión, garantizando de esta manera una elevada supervivencia de la progenie (Giese y Pearse, 1974; Charniaux Cotton y col., 1992).

El ciclo vital de los camarones de agua dulce comprende un período de reproducción, que implica el desarrollo de los huevos y un período del desarrollo larval, cuya extensión depende de las especies y el crecimiento de las larvas hasta llegar a juvenil y luego a adulto (Figura I.4). En esta última etapa se produce la maduración de las gónadas y comienza el ciclo reproductivo que es anual.

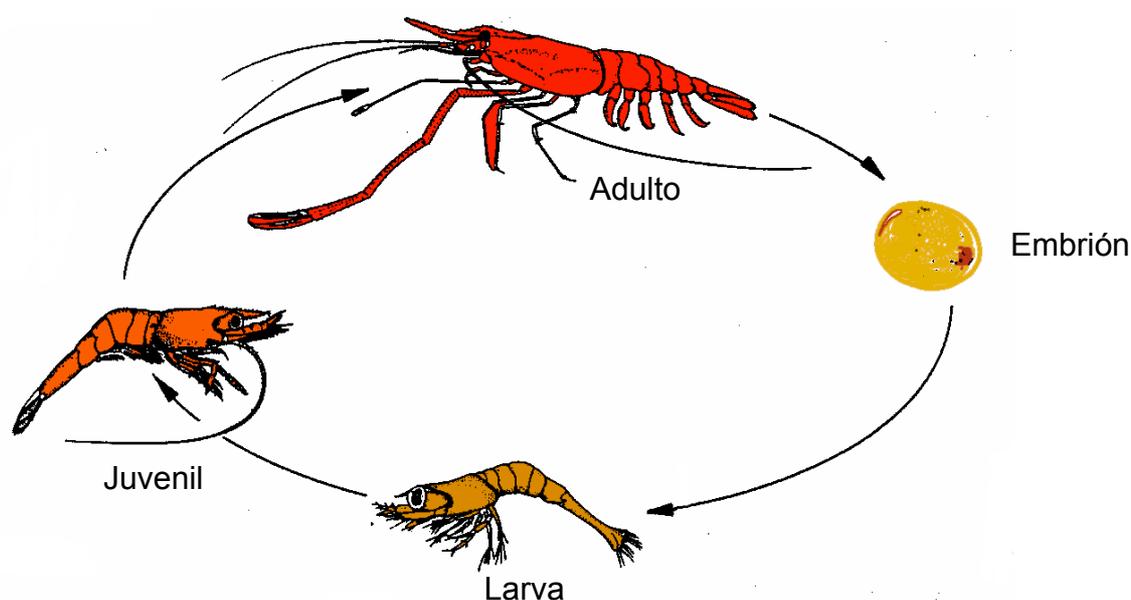


Figura I.4. Diferentes etapas del ciclo vital de *Macrobrachium borellii*.

En *Macrobrachium borellii* la temporada de reproducción abarca desde Noviembre hasta Febrero. Las hembras desarrollan el ovario al inicio de la época de reproducción, el que se puede observar por transparencia a través del caparazón (Boschi, 1963).

Una vez producida la fecundación, en las horas siguientes la hembra traspasa los huevos a los pleópodos y comienza el desarrollo embrionario.

Las hembras crían huevos con abundante vitelo, los que están cementados en los pleópodos formando la cámara de incubación (Boschi, 1981). Sollaud (1923) describió tres tipos de desarrollo larval en el género *Macrobrachium* basándose en el número y el tamaño de los huevos y en la temprana historia de vida: (1) tipo típico, con un elevado número de pequeños huevos y numerosos estadios de zoea, algunos de ellos son nadadores libres como por ejemplo *M. rosenbergii*. (2) tipo semi- abreviado con camadas mas pequeñas, huevos de mayor tamaño y menos estadios de zoea muchos de ellos son también nadadores libres (3) tipo muy abreviado, con una completa supresión de los estadios de zoea nadadores libres, donde el primer estadio de zoea carece de exopoditos, posee pleópodos bi-ramosos, y una antena flagelar larga. De acuerdo a esta clasificación, *M. borellii* se ubicaría dentro de este ultimo tipo, eclosionando como un estadio de zoea muy avanzado con algunas características de juveniles (Boschi, 1981). Las camadas son pequeñas de 30 a 100 huevos transparentes. Normalmente, una hembra produce dos

camadas de huevos al año, siendo la primera más numerosa. En condiciones naturales con temperaturas de entre 20 a 30 °C, el desarrollo de los huevos se completa en aproximadamente 50 días y las larvas recién eclosionadas son de 5–6 mm de largo con hábitos bentónicos y omnívoros (Boschi, 1981).

I.C.6. Metabolismo.

Estudios realizados en nuestro laboratorio, han aportado información sobre la dinámica y la compartimentalización de los lípidos en camarones adultos y embriones de *M. borellii*. El análisis de los lípidos de tejidos de camarones adultos mostró que el HP y las gónadas femeninas son los órganos con los mayores porcentajes de lípidos siendo en ambos casos los TAG los mayoritarios y con importantes variaciones relacionadas con el ciclo anual (González-Baró y Pollero, 1988). El ácido oleico (18:1) es el principal ácido graso en TAG mientras que en los fosfolípidos (PL) existe además un importante aporte de ácido eicosapentaenoico (20:5), especialmente en músculo. Este ácido graso junto con el ácido araquidónico (20:4) parecen ser esenciales en este crustáceo y por lo tanto deben ser componentes de la dieta (González-Baró y Pollero, 1998). En el caso de los embriones, se determinó que los lípidos, seguidos por las proteínas, son la principal fuente de energía disponible en el vitelo durante la embriogénesis (Heras y col., 2000). En particular los TAG del vitelo son activamente consumidos por el embrión y muestran una marcada disminución a lo largo del desarrollo embrionario. Los TAG constituyen la principal reserva energética del embrión de *M. borellii*, mientras que los lípidos estructurales y el pigmento astaxantina (ASX) se conserva selectivamente durante el desarrollo (Heras y col., 2000). El elevado contenido de lípidos es una característica muy frecuente en los huevos de crustáceos, aunque se han reportado casos dentro del género *Macrobrachium*, (como por ejemplo en *M. idella*), cuyo vitelo está compuesto principalmente de proteínas (Holland, 1978). Asimismo, los procesos catabólicos y anabólicos del metabolismo lipídico en embriones durante el desarrollo son muy activos y similares a los descritos en HP de adultos, en especial en lo que respecta a las actividades de palmitoil-CoA ligasa microsomal, sistema de β -oxidación y síntesis de acilgliceroles (González-Baró y col., 1990; Irazú y col., 1992; González-Baró y Pollero, 1993; González-Baró y col., 2000).

Recientemente se ha estudiado el efecto de un plaguicida fosforado sobre lipoproteínas circulantes y vitelínicas de esta especie observándose que este organofosforado provoca una rigidización principalmente de la zona interna y que su efecto depende de la composición lipídica de la partícula (García y col., 2002; 2004). Se demostró cómo el plaguicida modifica las estructuras de las lipoproteínas lo que alteró su función biológica.

El efecto del ayuno y la temperatura fue estudiado observándose que el HP disminuye casi en un tercio sus lípidos tanto neutros como polares luego de 4 semanas de ayuno. El incremento de la temperatura también aumenta el consumo de lípidos pero principalmente en el pool de lípidos neutros no afectando significativamente los PL (Pollero y col., 1991). Adicionalmente, se observó que la temperatura aumenta la β -oxidación mitocondrial (Irazú y col., 1992).

Objetivos

El estudio llevado a cabo se basó en las siguientes hipótesis principales:

1° Dada la afinidad de los hidrocarburos por compartimientos hidrofóbicos, su cinética de bioacumulación y biodepuración estará principalmente influenciada por las propiedades fisicoquímicas de estos y la composición bioquímica del organismo.

2° Frente a la presencia de hidrocarburos contaminantes los animales pueden incrementar la demanda energética. Siendo los lípidos la principal fuente de energía de *M. borellii*, deberían observarse cambios en su composición y metabolismo.

3° La presencia de contaminantes promueve mecanismos de defensa antioxidante reflejados en alteraciones enzimáticas y no enzimáticas en los tejidos.

4° Los organismos presentan diferente sensibilidad a los contaminantes según su estado de desarrollo, siendo generalmente los estadios tempranos los más susceptibles.

Se plantearon los siguientes objetivos generales relacionados con las hipótesis arriba señaladas:

Por una parte estudiar el efecto de la fracción hidrosoluble de HC del petróleo sobre diferentes parámetros biológicos, bioquímicos y biofísicos de *M. borellii*, ampliando la información en un área de la ecotoxicología poco desarrollada en el país. Por otra parte avanzar en el estudio de algunos aspectos del metabolismo de lípidos poco conocidos en los crustáceos en general, así como incursionar en su sistema de defensa antioxidante. Además, fue también de interés incluir un estudio morfométrico durante la embriogénesis para definir diferentes estadios de desarrollo y relacionarlos con el efecto de los HC.

Dentro de este lineamiento general se buscó alcanzar los siguientes objetivos particulares:

- 1- Describir la morfometría de la embriogénesis optimizando un método que permitiera distinguir etapas del desarrollo de manera no invasiva.
- 2- Describir la ultraestructura de las envolturas embrionarias y evaluar si están involucradas en la resistencia de los embriones a la WSF.
- 3- Determinar los niveles de HC de la zona seleccionada para la recolección de las muestras identificando su origen.
- 4- Determinar la toxicidad de la WSF sobre diferentes estadios del ciclo vital de *M. borellii*.
- 5- Determinar en organismos adultos la cinética de bioacumulación y biodepuración de hidrocarburos.
- 6- Estudiar las posibles alteraciones de la composición bioquímica de lípidos y ácidos grasos por efecto de la WSF.
- 7- Evaluar las posibles alteraciones de la actividad de las enzimas o sistemas enzimáticos clave del metabolismo lipídico en embriones y adultos por acción de la WSF.
- 8- Estudiar el efecto de la WSF sobre algunas propiedades físicas de membrana, en particular membranas microsomales de branquias y de hepatopáncreas.
- 9- Evaluar en organismos adultos y embriones el sistema de defensa antioxidante y la sensibilidad al estrés oxidativo inducido por la exposición a la WSF.

Capítulo II

Metodología de trabajo

II.A. Reactivos y drogas utilizadas

Los reactivos, cofactores y solventes fueron de grado analítico o para análisis de plaguicidas (Merk, SIGMA, Carlo Erba y Mallinckrodt). Los sustratos radiactivos fueron suministrados por New England Nuclear Corp. Los estándares de HC y de lípidos fueron adquiridos de SIGMA, Alltech y Supelco.

Todos los materiales de laboratorio utilizados fueron lavados y enjuagados con agua destilada. Los empleados para los ensayos de exposición a los HC adicionalmente se los enjuagó con acetona, luego con hexano y finalmente fueron secados en estufa.

II.B. Área de muestreo

El material de estudio provino de un curso de agua que desemboca en el Río de La Plata, conocido como arroyo El Pescado y la zona de muestreo seleccionada fue la intersección con la ruta provincial N° 11 (Km 15 en el partido de La Plata) (Figura II.1).

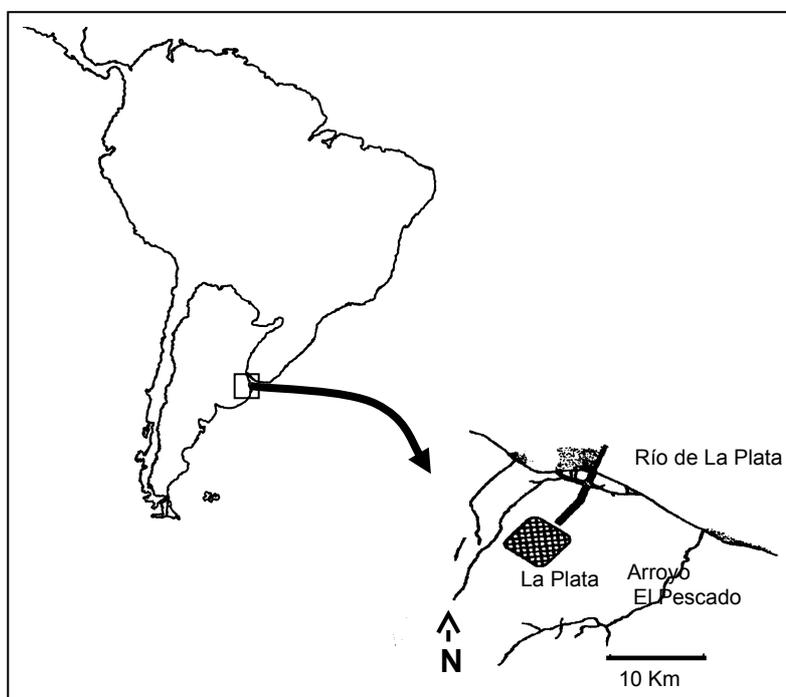


Figura II.1. Mapa de la ubicación del arroyo El Pescado.

II.C. Obtención de muestras

II.C.1. Sedimento

Las muestras de sedimento se tomaron con un core metálico de 5 cm de diámetro el que se clavó a una distancia de 1 m de la orilla y a una profundidad de entre 15-20 cm. Las muestras se guardaron en papel aluminio y se congelaron a -20 °C hasta el momento de procesarlas.

II.C.1.a. Determinación de porcentaje de humedad y contenido de materia orgánica

Para determinar el contenido de humedad se pesaron alrededor de 40 g de las muestras de sedimento en vasos de precipitado y se secaron en estufa a 100 °C durante 24 h hasta peso constante. Se pesaron alrededor de 5 g del sedimento secado que se incineró en una mufla (Dalvo) a 450 °C durante 24 h hasta peso constante. El contenido de materia orgánica se calculó por diferencia de peso (Jüngwirth, 1979).

II.C.2. Agua

Se midió la temperatura y el pH del agua en el arroyo y se recolectaron las muestras en botellas de 4 l con cierre hermético y tapa de teflón a una profundidad de 40 cm de la superficie. Una vez en el laboratorio, se almacenaron en una cámara fría a 4 °C y se procesaron dentro de los 2 días de recolección para determinar el contenido de HC.

II.C.3. Animales

Se capturaron con un copo camarones de ambos sexos y se transportaron hasta el laboratorio donde se aclimataron en acuarios con agua de clorinada, filtrada, con aireación y fotoperíodo 14 h luz/10 h oscuridad. Se mantuvieron en un sistema de circulación continua hasta el momento de los experimentos y fueron alimentados *ad-libitum* con alimento comercial. Periódicamente los acuarios se limpiaron y se controló la temperatura y el pH del agua.

II.D. Extracción de hidrocarburos de diferentes matrices

II.D.1. Extracción de hidrocarburos del agua

Se extrajeron los hidrocarburos (HC) disueltos por el método del embudo de separación (ampollas de decantación) (UNESCO, 1984), esencialmente una extracción seriada con hexano. Se procesaron 1 ½ l de agua dentro de las 48 h de recolectada. Por cada litro de muestra, se dividió por la mitad y se colocaron 500 ml en una ampolla de decantación agregando 12,5 ml de hexano, se agitó con fuerza durante 2 min y se dejaron separar las fases. Se vertió la fase acuosa en un segundo embudo al que se agregaron otros 12,5 ml de hexano, repitiéndose el proceso de extracción. Luego se descartó el agua y se procedió de igual manera con los 500 ml restantes, extrayéndolas con el mismo hexano que quedó en ambos embudos. Se reunieron los extractos y se añadieron unas gotas de metanol para romper cualquier emulsión. Por último, se filtraron en un embudo con papel de filtro (Whatman) conteniendo unos gramos de Na₂SO₄ anhidro previamente limpiado con hexano y el extracto final se colectó en un tubo de vidrio con tapa esmerilada. Por último se redujo el volumen a unos de 0,5 ml con una corriente suave de N₂. Las muestras extraídas se limpiaron utilizando columnas de sílice (ver II.E.1).

II.D.2. Extracción de hidrocarburos de los tejidos

II.D.2.a. Destilación por arrastre

Los tejidos pesados se homogeneizaron con un homogeneizador Ultra-Turrax, y luego se extrajeron los HC mediante destilación por arrastre con vapor según el procedimiento de Ackman y Noble (1972) modificado por Ackman y col. (1997) de acuerdo al siguiente esquema:

a) Limpieza del sistema: en un balón de 250 ml se agregaron 40 ml de H₂O bidestilada, 12 g de sulfato de sodio y un agitador magnético, se conectó a un colector tipo "Barret" de 10 ml de capacidad y este a su vez a un sistema refrigerante. Se calentó hasta lograr destilar a un flujo de 1 ml/min. Luego de los primeros 5 ml de destilado se agregó 1 ml de diclorometano (DCM) al colector desde la parte superior del condensador para enjuagar las paredes del mismo, e inmediatamente al final de la destilación se

agregó otro ml de DCM. Se dejó enfriar el balón a temperatura ambiente, se descartó todo el volumen del colector y se enjuagó el colector con 1 ml de DCM.

b) Extracción: en el balón se agregaron 5 g de tejido previamente homogeneizado y 1 ml de DCM. Se mezcló con el agitador magnético por 3-5 min para dispersar el tejido en la solución antes de comenzar la destilación. Se destilaron 10 ml, luego se apagó el manto calefactor y se agregó 1 ml de DCM para lavar el condensador. Una vez que llegó a temperatura ambiente se colectó todo el volumen en un tubo de centrifuga de 15 ml. Por último se lavó el colector con 1 ml de DCM y se reunió con el destilado en el tubo. Se centrifugó 5 min a 500 g, se descartó la fase acuosa y se colectó la fase inferior de DCM empleando un jeringa de vidrio con aguja larga (o una pipeta Pasteur) en un frasco de 4 ml. Alícuotas de 3 μ l de muestra se analizaron por cromatografía gas-líquido (GLC) (ver II.E.) y el resto se guardó a -20 °C.

II.D.2.b. Método de Bligh y Dyer

Las muestras se procesaron según el método descrito por Bligh y Dyer (1959). A 5 g de tejido contenido en un vaso de precipitado se le agregaron 12,5 ml de metanol y se homogeneizó con un Homogeneizador Ultra-Turrax. Se añadieron 6,25 ml de cloroformo y se continuó homogeneizando en vortex, obteniéndose de esta manera un sistema monofásico. La suspensión se filtró en Kitasato con papel de filtro (Whatman), se agregaron otros 6,25 ml de cloroformo al filtrado y 15 μ g de octadeceno (18:1) como estándar interno. Al filtrado se adicionaron 11,25 ml de una solución acuosa de 1,8 % de NaCl llegando a una relación cloroformo: metanol: agua de 1:1:0,9 (v/v/v). Luego se trasvasó todo el filtrado a una probeta de 50 ml, y se separaron las fases a 4 °C durante una noche. Se continuó con el protocolo de extracción colectando la fase inferior que se pasó a un tubo cónico de 15 ml con tapa esmerilada y se concentró hasta un volumen de 0,5 ml con rotavapor o N_2 . Se agregaron 10 ml de hexano y 0,5 ml de H_2SO_4 para oxidar la materia orgánica, luego se agitó en vortex durante 1 min y se dejó reposar 1 h. Por último se centrifugó durante 6 min a 500 g y se trasvasó la fase hexano a un tubo cónico de 15 ml con tapa esmerilada. El resto se enjuagó con 2 ml de hexano y se agruparon ambas fases, luego se concentró a 0,5 ml con N_2 y guardó a -20 °C hasta la purificación por cromatografía en columna de sílice (ver II.E.1).

II.D.2.c. Soxhlet

Se armó el sistema de extracción empleando un equipo soxhlet de 100 ml al cual se le colocó un cartucho de papel de filtro del diámetro del soxhlet (7 x 22 cm) conteniendo 5 g de SO_4Na_2 . Luego de lavar el sistema con una mezcla DCM/ hexano (1:1; v/v), se dejó enfriar y se agregaron 5 g de tejido. Se mezcló y se extrajeron los HC con la misma mezcla de solventes durante 40 ciclos. La muestra se trasvasó a un balón y se concentró hasta un volumen de 0,5 ml. Se continuó el protocolo según el método de Bligh y Dyer descrito en II.D.2.b.

II.D.3. Extracción de hidrocarburos de los sedimentos

Las muestras de sedimentos se descongelaron, y se secaron alícuotas de 50 g durante 24-48 h en estufa a 37 °C. Luego se homogeneizaron en mortero y se agregaron 15 µg de C 18:1 como estándar interno. Los HC se extrajeron mediante las técnicas que se describen a continuación.

II.D.3.a. Saponificación con KOH

De acuerdo al método descrito por la UNESCO (1982), las muestras se colocaron en balones de 250 ml conectados a un refrigerante y se agregaron 50 ml de metanol y 1,5 g de KOH. Se saponificó manteniendo a reflujo durante 1:30 h utilizando un manto de calentamiento. Luego se dejó decantar y enfriar a temperatura ambiente. El metanol se trasvasó a una ampolla de decantación de 250 ml y se extrajeron los HC con 25 ml de pentano. Una vez separadas las fases, se trasvasó el metanol a otra ampolla realizándose una segunda extracción con otros 25 ml de pentano. Se agruparon ambos extractos y se filtraron con papel de filtro (Whatman) conteniendo 1 g de Na_2SO_4 previamente extraído. La muestra se colectó en un tubo cónico esmerilado y se concentró con corriente de aire filtrado.

II.D.3.b. Sonicación

Los 50 g de muestra se dividieron en 2 tubos redondos con tapón esmerilado de 25 ml y se extrajeron cuatro veces con 30 ml (15 ml/tubo) de DCM/ hexano (1:1; v/v). Se agitaron con vortex y se sonicaron 10 min usando un ultrasonificador (Branson 5210). Se separó la fase orgánica luego de centrifugar 5 min, y cada uno de los extractos se recolectó en un balón de 250 ml. El extracto se filtró como se detalló en II.D.3.a y se concentró disolviéndolo en hexano.

II.D.3.c. Soxhlet

Se realizó la extracción de los HC siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para las muestras de tejidos (ver II.D.2.c).

II.E. Análisis de los hidrocarburos mediante cromatografía gas-líquido

II.E.1. Purificación y separación preliminar de los extractos utilizando columnas de sílice

Los extractos de las muestras de agua, organismos (excepto las obtenidas por destilación por arrastre) y sedimento, se purificaron por cromatografía en columnas de sílice para eliminar los contaminantes no HC. Para ello se pesaron 40 g de sílice en un frasco con tapa esmerilada, al que se agregó hexano, se agitó y dejó decantar. Se descartó la parte superior con sílice en suspensión, debido a que las partículas pequeñas enlentecen el flujo de la columna. Se realizó un segundo lavado y se activó a 130 °C durante 1 h. Las columnas se armaron en jeringas de 5 ml a las que se les agregó 3 cm “lineales” de sílice que se compactó con el émbolo. Una vez armada la columna se humectó con 3 ml de hexano. La muestra se agregó en un volumen de 1 ml y se eluyó primero con 6 ml de hexano para extraer los HC alifáticos, y luego se extrajeron los HC aromáticos con 6 ml de la mezcla: hexano/ DCM en una relación 4:1 (v/v). Los extractos se colectaron en un tubo cónico con tapón esmerilado y se concentraron en hexano con corriente de aire.

Por otra parte se hicieron estudios de recuperación de HC de la matriz utilizando mezclas estándares conocidas (Tabla II.1). Tanto las muestras de sedimentos una vez secadas a 37 °C como las de organismos, fueron suplementadas con una masa total de 1150 µg de la mezcla de estándares de HC. Si bien algunos de los HC de la mezcla no se encontrarían en los sedimentos luego de secarlos, se decidió utilizar la misma mezcla de estándares para todas las matrices. Los valores de eficiencia de recuperación obtenidos se combinaron al factor de respuesta del detector del GLC en un “factor de recuperación”.

Tabla II.1. Mezcla de hidrocarburos empleada en los ensayos comparativos de técnicas de extracción de muestras biológicas y sedimento.

HC aromáticos	Benceno, Tolueno, Naftaleno, Etilbenceno, o-Xileno, m-Xileno, n-propilbenceno, isopropilbenceno, 1,2,3-trimetilbenceno, 1,2,4-trimetilbenceno, 1,2,3,4-tetrametilbenceno, o-Dietilbenceno, m-Dietilbenceno, p-Dietilbenceno,
HC alifáticos	Serie par en el rango nC10-C22

II.E.2. Separación por cromatografía gaseosa

Los HC extraídos se analizaron por cromatografía gaseosa en columna capilar con detector de ionización de llama (GLC-FID) en un equipo Hewlett Packard HP 6890 con una columna DB-1 (60 m x 0,25 µm) empleando el siguiente programa: 45 °C 15 min, rampa de 12 °C/ min hasta 280 °C y manteniendo durante 20 min la temperatura a 280 °C. Los datos se colectaron y procesaron empleando el programa HP Chemstation Rev.06.03 (Hewlett Packard).

Como en las muestras de sedimentos se observó la presencia de HC de la serie alifática y ausencia de HC aromáticos de bajo PM, se modificó el programa de análisis de HC para estas muestras para una mejor identificación de la siguiente manera: temperatura inicial 120 °C por 3 min, rampa de 10 °C/ min hasta una temperatura final de 300 °C, manteniendo esta temperatura durante 40 min.

II.E.3. Identificación y cuantificación

Los componentes fueron identificados por comparación de los tiempos de retención con los de estándares externos y con los de una fracción hidrosoluble de HC identificada por GLC-MS (Heras y col., 1992). Se calculó la concentración de los HC en las muestras biológicas y de agua con respecto al estándar interno n-eicosano (nC₂₁) y en las de sedimento con respecto al C 18:1 y se corrigió con la respuesta del GLC combinada con la eficiencia de recuperación de la técnica, descontando los picos de los blancos.

II.F. Estudio del desarrollo embrionario

II.F.1. Ensayo para determinar el tiempo y estadio de desarrollo

Hembras ovígeras se recolectaron durante los meses de noviembre-enero y los huevos se separaron de los pleópodos con pinzas de punta fina. Se midió el largo del cuerpo de las hembras desde el extremo del rostro hasta el extremo del telson, con un calibre y se contabilizaron los huevos desovados por las mismas. Huevos recién fecundados provenientes de tres puestas fueron colocados en placas estériles para cultivos de tejidos (Corning) de 24 pocillos, con un volumen de 2 ml de agua filtrada en cada uno y un huevo por pocillo (Rayburn y col., 1996). Las placas fueron incubadas a 24 °C en un baño termostatzado y cada dos días se realizaron observaciones con un microscopio estereoscópico (ZEISS), prestando atención a los cambios morfológicos durante todo el desarrollo hasta la eclosión.

II.F.2. Análisis morfométrico

Los huevos se colocaron en una placa para Elisa de 96 pocillos (un huevo por pocillo) en un volumen de 50 µl de H₂O y se observaron a la lupa estereoscópica (Olympus SZ40). Se grabaron imágenes de treinta embriones por estadio de desarrollo utilizando una cámara analógica Sony DXC-151 A RGB CCD conectada a la lupa. La señal de la cámara se adquirió con una PC empleando una placa digitalizadora (Flash Point, 128 Integral Technologies). Las imágenes se procesaron para su análisis

morfométrico con el programa “Image-Pro Plus”. Se analizaron los parámetros del saco embrionario, cáscara y ojos. Las variables medidas se definen en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Descripción de las variables medidas en los embriones de *Macrobrachium borellii* durante el desarrollo.

VARIABLE	DESCRIPCIÓN
Área	medida del área de cada objeto menos los huecos
Diámetro máximo	medida del largo de la línea mas larga unidos por dos puntos de la línea externa que pasa por el centro
Diámetro mínimo	medida del largo de la línea mas corta unidos por dos puntos de la línea externa que pasa por el centro
Diámetro promedio	promedio del largo de los diámetros medidos con intervalos de dos grados
Perímetro	medida del largo de la línea externa de cada objeto
Redondez	determinado por la formula: $\text{perímetro}^2 / (4 \times \pi \times \text{área})$
Eje máximo	medida del largo del eje principal de la elipse equivalente al objeto
Eje mínimo	medida del largo del eje menor de la elipse equivalente al objeto
Eje promedio	razón entre el eje principal y el eje menor
Densidad promedio	promedio de la densidad óptica del objeto
IOD	promedio intensidad/densidad de cada objeto
Radio máximo	medida de la máxima distancia entre el centro de cada objeto y el perímetro
Radio mínimo	medida de la mínima distancia entre el centro de cada objeto y el perímetro
Radio promedio	razón entre el radio máximo y el radio mínimo

II.F.3. Estudio de las membranas embrionarias mediante microscopía electrónica

Se tomaron muestras de huevos en diferentes estadios de desarrollo y se fijaron con glutaraldehído al 4 %. Se realizaron 3 lavados con buffer conteniendo sacarosa al 5 % y luego se incluyeron en resina Spur. Se realizaron cortes con micrótopo y por último se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL, JEM-1200 EXII).

II.F.4. Ensayos de permeabilidad de la cáscara

Para estudiar la permeabilidad de la envoltura de los huevos se seleccionó al fluoróforo hidrocarbonado 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) cuya λ de excitación es de 361 nm.

Embriones controles en diferentes estadios de desarrollo se expusieron a una concentración de 10,8 μM de DPH, en un volumen final de 300 μl con agua filtrada. Se incubaron durante 24 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Se realizaron las observaciones en un microscopio de fluorescencia (ZEISS, Axiolab) acoplado a una cámara fotográfica con la que se llevó el registro de los ensayos.

II.F.5. Determinación del peso seco

Los pesos húmedo y seco fueron obtenidos a partir de masas de huevos de cada estadio de desarrollo según el método de la IAFMM (1979). Las muestras fueron estudiadas por triplicado y cada réplica compuesta por 3 ó 4 posturas.

II.G. Diseño de bioensayos

II.G.1. Preparación de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos

Petróleo crudo liviano Punta Loyola de la provincia de Santa Cruz, se mezcló con agua en una relación 1:100 (v/v) con agitación permanente a bajas revoluciones (60 rpm) durante 24 h. Posteriormente se dejó reposar 48 h y se colectó la fase inferior conteniendo la fracción hidrosoluble de petróleo (WSF). Esta se analizó por cromatografía gaseosa (ver II.E) para estimar su concentración de HC la que se denominó WSF 100 %. A partir de ésta se realizaron diluciones con agua para los ensayos individuales. La WSF se preparó inmediatamente antes de comenzar cada serie de ensayos.

II.G.2. Extracción y análisis de hidrocarburos de la fracción hidrosoluble

Se extrajeron 500 ml de WSF con 1 ml de hexano según la técnica descrita en Heras y col. (1992). Se empleó un matraz al que se le soldó un capilar de vidrio que permite coleccionar el hexano con una jeringa para inyectar directamente en el GLC, sin necesidad de concentrarla. Se agitó vigorosamente durante 1 min, se colectó la fase hexano en el capilar y se analizó inmediatamente por cromatografía tal como se describe en II.E.

II.G.3. Determinación de la concentración letal 50 %

Se realizaron diluciones a partir de una serie geométrica partiendo de la WSF 100 %. Se realizaron 3 réplicas de cada ensayo con lotes de 12 individuos por concentración. El rango de edades ensayadas abarcó adultos, larvas de 1-4 días y embriones en diferentes estadios de desarrollo. Los adultos se colocaron en frascos de vidrio de 750 ml con un volumen de líquido de 600 ml para dejar libre una cámara de aire. Las larvas se colocaron en frascos de vidrio de 250 ml con un volumen de líquido de 200 ml cerrados herméticamente. En cambio para los embriones se procedió de acuerdo a las modificaciones en los ensayos de toxicidad que se describen en Rayburn y col. (1996) empleando placas estériles para cultivos de tejidos (Corning) de 24 pocillos, con un volumen de 2 ml de solución en cada uno. La WSF de cada ensayo se recambió cada 24 h (flujo iterativo) y se registró la mortalidad diariamente. Los organismos se expusieron durante 96 h. Como control negativo se utilizó agua sin WSF. Se mantuvieron la temperatura y salinidad constantes. A partir de los datos obtenidos, se calculó la LC50 por el método PROBIT.

II.G.4. Cinética de bioacumulación y biodepuración de hidrocarburos

Lotes de organismos adultos se expusieron a una concentración subletal de WSF determinada a partir de la LC50, y se sacrificaron luego de 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 h de exposición. Luego de 96 h de exposición otros lotes se transfirieron a un medio sin el contaminante y se sacrificaron luego de diferentes tiempos de depuración. En cada grupo se analizó la composición de HC por GLC como se describe en II.D.2 y II.E.

II.G.5. Exposición de camarones adultos y embriones a concentraciones subletales de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos

Lotes de 10 camarones adultos y de 4 hembras ovígeras portando embriones en estadio 5 (determinado a partir del estudio descrito en II.F), se expusieron a una concentración subletal nominal de WSF de 0,6 mg/l. A los correspondientes lotes control se les agregó agua no contaminada, y todos fueron colocados en frascos de vidrio en las mismas condiciones que para los ensayos anteriores. Para la evaluación del efecto de la WSF sobre el contenido lipídico, los organismos fueron expuestos durante 21 días a la WSF, mientras que para el estudio del efecto sobre la actividad enzimática se expusieron durante 7 días. Durante este período de exposición se les renovó el agua diariamente, se controló la temperatura y el pH y se los ayunó o alimentó de acuerdo al diseño del experimento. En el caso en que fueron alimentados, los adultos se ayunaron durante las 24 h previas al procesamiento de las muestras.

Teniendo en cuenta que la toxicidad de estos contaminantes está ligada al contenido de lípidos, el cual puede estar asociado a otros factores como sexo, estado reproductivo, edad y estación climática, se colectaron solo camarones adultos con una talla mayor de 40 mm durante la época de reproducción (Diciembre- Marzo). No fueron discriminados por sexo ya que estudios previos no mostraron diferencias en el contenido lipídico de HP y músculo (González- Baró y Pollero, 1988).

II.G.6. Disección de camarones adultos

Antes de realizar las disecciones, los animales fueron anestesiados con hielo durante aproximadamente 5 min.

II.G.6.a. Hepatopáncreas

Se realizaron dos cortes a ambos lados del cefalopereion y se extrajo el hepatopáncreas (HP) con una pinza de punta fina. Se colocaron inmediatamente en frío en la solución correspondiente al ensayo a realizar (ver II.G.7.a, II.G.8.a y II.G.10.a).

II.G.6.b. Músculo

Se cortó la zona del pleon y se descartó el telson, se retiró el exoesqueleto y los pleópodos quedando la masa muscular que se colocó en un recipiente en frío con metanol para continuar con el procedimiento de extracción de lípidos (ver II.G.7.a).

II.G.6.c. Branquias

Una vez removido el HP, se extrajeron las branquias de ambos lados de la zona del cefalopereion con pinza de punta fina bajo observación en un microscopio estereoscópico. Las branquias se colocaron en frío en la solución buffer para la preparación de las muestras para determinar capacidad antioxidante (ver II.G.10.a).

II.G.6.d. Extracción de hemolinfa

A los camarones se les extrajo la hemolinfa por punción del seno hemolinfático dorsal utilizando una jeringa Hamilton de 50 μ l perforando en la parte posterior del cefalopereion e ingresando hasta la altura del primer somito torácico. Las muestras se agruparon en pools de 2 individuos y se agregó inmediatamente 1:10 del volumen de citrato de sodio 0,01 N como anticoagulante (Karim-Malka y col., 1983). Se realizó una centrifugación de 10 min a 7500 g para remover hemocitos y se almacenó el sobrenadante plasmático a -70 °C hasta su procesado.

II.G.7. Métodos empleados para la obtención y el análisis de lípidos y ácidos grasos

II.G.7.a. Extracción de lípidos

Se agruparon los HP y músculos provenientes de 7-10 camarones adultos, así como las camadas de huevos provenientes de 3 puestas, tanto para los lotes controles como para los lotes expuestos a la WSF. Los HP y las camadas de huevos se colocaron en un homogenizador de teflón tipo Potter de 5 ml, mientras que los músculos se homogenizaron con un homogenizador Ultraturrax en vaso de precipitado. Durante el proceso de extracción, las muestras se mantuvieron en frío. La extracción de lípidos se realizó con una mezcla de: cloroformo / metanol (2:1; v/v) de acuerdo al método de Folch (1957) en una relación de 1: 20 peso de tejido/ volumen de solvente, formando un sistema monofásico. Luego de agitar vigorosamente durante 1 min se dejó a 4 °C durante al menos 1 h. La muestra se filtró con papel de filtro y se agregó un 20 % en volumen de una solución de ClNa 1,8 %. Luego de agitar vigorosamente se dejó separar las fases toda la noche a 4 °C. A continuación se descartó la fase acuosa por aspiración y se concentró la fase orgánica con corriente de N₂; la cantidad de lípidos se determinó por gravimetría en una alícuota del extracto.

II.G.7.b. Separación por cromatografía en capa delgada

Se separaron los lípidos neutros de los fosfolípidos utilizando placas preparativas HP-TLC (Merck, Darmstadt) desarrolladas con el sistema de solventes hexano/éter etílico/ácido acético (80:20:1,5; v/v/v). Los triacilgliceroles y fosfolípidos (TAG y PL) se identificaron con estándares sembrados en calles adyacentes a las muestras. Una vez desarrollada la cromatografía, los estándares se revelaron con yodo y las manchas de lípidos se rasparon de las placas. Los TAG se eluyeron con cloroformo: hexano (1:1; v/v) y los PL con cloroformo: metanol (2:1; v/v).

Las clases de lípidos se cuantificaron por cromatografía en capa fina (TLC) con un detector de ionización de llama (TLC-FID), de acuerdo a la técnica de Ackman y Heras (1997) en un equipo Iatroscan TH10 (Iatroscan Laboratories, Tokio) conectado a un integrador (Hewlett-Packard 3396A). Se sembraron 15 µg de lípidos totales en un volumen de 1 µl en varillas Chromarod-SIII y se analizó cada muestra por triplicado utilizando lignocerol como estándar interno. La separación se realizó usando como primer sistema de solventes la mezcla: hexano /acetato de etilo/éter etílico/ácido fórmico (91:6:3:1; v/v/v/v) para lípidos neutros. Luego de quemar parcialmente las varillas se efectuó un desarrollo con acetona para separar principalmente carotenoides. El tercer sistema de

solventes comprendió la mezcla: cloroformo/metanol/ácido fórmico/agua (50:30:4:2; v/v/v/v) para analizar los lípidos polares. Los lípidos fueron identificados por comparación de sus R_f con los correspondientes estándares corridos en las mismas condiciones. Se realizaron las curvas de calibración para ésteres de colesterol (EC), TAG, diacilgliceroles (DG), colesterol (COL), ácidos grasos libres (AGL), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM) (las clases de lípidos más representativas de esta especie). Cada curva se calibró con cinco concentraciones diferentes, cada una analizada por quintuplicado.

II.G.7.c. Análisis de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido

Para la identificación de los ácidos grasos por GLC estos deben ser previamente derivatizados a sus ésteres metílicos. La razón de esta modificación se debe a que los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) son mas volátiles que sus correspondientes ácidos grasos libres, por la disminución de la polaridad al formarse el éster y además son más estables que los ácidos grasos originales.

a) Preparación de los ésteres metílicos mediante trifluoruro de boro: los ácidos grasos fueron derivatizados empleando BF₃/metanol siguiendo el procedimiento descrito por Morrison y Smith (1964). Primero se saponificaron las muestras de lípidos para obtener los ácidos grasos libres. Para ello, alícuotas de 150 µg de lípidos totales se evaporaron a seco, se agregaron 2 ml de una solución de KOH 10 % (p/v) en etanol, se gasearon los tubos con N₂ para evitar oxidaciones y se cerraron herméticamente. Luego de calentar las muestras en un block durante 1 h a 80 °C, se dejaron enfriar y se agregaron 1 ml de H₂O destilada y 2 ml de hexano, se gasearon con N₂, se agitaron en vortex y se dejaron separar las fases. Se descartó la fase orgánica superior (insaponificable) y se acidificó con HCl concentrado, luego se agregaron 2 ml de hexano y se repitió el procedimiento anterior. Una vez que se separaron las fases, se recolectó la fase orgánica superior conteniendo los ácidos grasos, en tubos redondos con tapa a rosca y se evaporaron a seco para continuar con la esterificación. Para ello se les agregó 1,5 ml de benceno y 1,5 ml de una solución de BF₃ al 8 % en etanol, se gasearon con N₂, se agitaron en vortex y se calentaron durante 1h a 100 °C. Luego se enfriaron a temperatura ambiente y se agregó 1 ml de hexano y 2 ml de H₂O, se gasearon con N₂, se agitaron en

vortex y se dejó separar las fases. Se colectó la fase orgánica conteniendo los EMAG, que se analizaron por GLC.

b) Preparación de ésteres metílicos mediante metóxido de sodio: Los ésteres metílicos de ácidos grasos de TAG y PL se prepararon de acuerdo al procedimiento descrito por Christie (1982). Se disolvieron los lípidos TAG y PL en 500 μ l de éter etílico, 20 μ l de acetato de metilo y 20 μ l de metóxido de sodio 1 M en metanol, se agitó y dejó 5 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 2 μ l de ácido acético, luego se evaporó el solvente con N_2 , se agregó 1 ml de hexano, se agitó y centrifugó 5 min a 1500 g y luego de concentrar la muestra con N_2 se analizó por GLC.

c) Análisis e identificación por cromatografía gas-líquido: se utilizó una columna capilar omegawax 250 (30 m x 250 μ m x 0,25 mm i.d.) con detector de ionización de llama y helio como gas portador con un flujo de 0,7 ml/ min. El programa empleado fue: 175 °C 3 min, rampa de 3 °C/ min hasta 230 °C y manteniendo esta temperatura final durante 19 min. Los datos se colectaron y procesaron en una Chemstation empleando el programa HP Chemstation Rev.06.03 (Hewlett Packard).

Los picos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención con los de una mezcla estándar de EMAG de aceite de menhaden identificado por GLC/MS.

II.G.8. Medidas de actividad enzimática

II.G.8.a. Obtención de fracciones subcelulares

Muestras de HP y huevos se pesaron y se homogeneizaron en sacarosa 0,25 M conteniendo N- acetil cisteína 1,4 mM, ClK 0,15 M, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 0,4 mM y buffer fosfato 62 mM pH 7,4 usando un homogenizador de tipo Potter con vástago de teflón. Se realizó una primera centrifugación del homogenato a 600 g en una centrífuga refrigerada durante 7 min a 4 °C para separar restos de tejido y células enteras. El sobrenadante se filtró con gasa triple y se centrifugó a 10.000 g a 4 °C durante 20 min. El pellet correspondiente a la fracción enriquecida en mitocondrias se lavó con 200 μ l de la solución buffer, luego se resuspendió en un volumen de 500 μ l y se empleó en los ensayos de β -oxidación y palmitoil-CoA ligasa. El sobrenadante se filtró con gasa triple y se centrifugó en una ultracentrífuga a 100.0000 g (Beckman L8M) a 4°C durante 50 min recolectándose el sobrenadante y pellet correspondientes a las fracciones citosólica y

microsomal, respectivamente. La fracción citosólica se utilizó para el ensayo de lipasa y la fracción microsomal para los ensayos de palmitoil-CoA ligasa, biosíntesis de acilglicérols y en estudios del efecto de la WSF sobre la biofísica de membranas. A todas las muestras se les determinó la cantidad de proteína total por el método de Bradford (1976) usando como estándar albúmina bovina.

II.G.8.b. Sistema de β -oxidación

La β -oxidación de ácidos grasos se ensayó empleando ácido palmítico radioactivo (16:0 ^{14}C) como precursor, midiendo la cantidad de acetato marcado formado, según el procedimiento previamente desarrollado en el laboratorio (Irazú y col., 1992). 10 μl de sustrato (4×10^5 dpm 0,18 μCi / tubo) disuelto en propilenglicol se agregaron a 360 μl de una solución de incubación compuesta por: MOPS 20 mM, KCl 30 mM, MgCl_2 5 mM, ATP 10 mM, NAD^+ 0,25 mM, CoASH 0,08 mM, FAD 0,17 mM, L- Carnitina 2,5 mM, L- (-) Mállico 0,43 mM a pH 7,8. Luego de agregadas las mitocondrias, se incubó en un baño a 32 °C con agitación (Vicking). Se detuvo la reacción agregando 1,25 ml de 6 % KOH en etanol. Las muestras se saponificaron a 80 °C durante 1 h en un block de calentamiento. Las proteínas desnaturalizadas se removieron por centrifugación. Se trasvasaron 1,4 ml de sobrenadante a un tubo con tapa esmerilado y se agregaron 200 μl de HCl 7,4 N. Los ácidos grasos libres se removieron agregando 2 ml de cloroformo, se tomaron 200 μl de la fase acuosa superior y se midió el acetato radiactivo formado mediante espectrofotometría de centelleo.

II.G.8.c. Palmitoil-CoA ligasa microsomal

Se utilizó como sustrato 16:0 ^{14}C (4×10^5 dpm 0,18 μCi / tubo disuelto en 10 μl de propilenglicol) midiéndose la cantidad de palmitoil-CoA formado según el procedimiento optimizado en nuestro laboratorio (González-Baró y col., 1990). Se empleó una solución de incubación conteniendo KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, TX-100 (0,05 %), MOPS 30 mM, ATP 10 mM, CoASH 50 μM , DTT 0,5 mM a pH 7,8. La reacción comenzó con el agregado de la proteína microsomal en un volumen final de 500 μl por tubo y se incubó en baño termostatizado a 32°C. Se detuvo la reacción agregando 2,5 ml de reactivo de Dole (isopropanol/ heptano/ H_2SO_4 ; 2000: 500: 50; v/v/v). Se agregaron 1,6 ml de heptano y 0,9

de H₂O al sobrenadante y se mezcló con vortex. La fase acuosa se lavó dos veces con 1,6 ml de heptano para eliminar el ácido 16:0 no esterificado. Una alícuota de 200 µl se mezcló con 3 ml de solución de centelleo y el palmitoil-CoA formado se midió por espectrofotometría de centelleo.

II.G.8.d. Palmitoil-CoA ligasa mitocondrial

Como no existían antecedentes de medidas de la actividad de esta enzima en mitocondrias de crustáceos, se realizó el estudio de diversos parámetros cinéticos para determinar las condiciones óptimas de medida. Se realizaron ensayos para evaluar el efecto de la concentración de proteínas, tiempo de incubación, pH, temperatura y concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. Para ello se diseñaron los ensayos basándose en el protocolo utilizado para la enzima microsomal (ver II.G.8.c).

II.G.8.e. Triacilglicerol lipasa

La actividad TAG lipasa citosólica fue ensayada de acuerdo al método desarrollado en nuestro laboratorio (González-Baró y col., 2000, modificado a partir de Arrese y Wells, 1994). En este caso se empleó como sustrato trioleína ¹⁴C disuelta en Tritón X100 (1,73 µM / ml de TAG ¹⁴C y 5,64 µM / ml de TAG frío en 10 µl de Tritón). A 300 µl de la mezcla de reacción (Tris-Cl, 20 mM, NaCl 0,5 M, albúmina desengrasada 0,02 %, pH 7,5) se agregó la proteína citosólica y se incubó en un baño termostatzado a 30 °C con agitación. Para detener la reacción se agregaron 2,5 ml de solución de Folch (cloroformo/ metanol; 2:1; v/v) y se descartó la fase acuosa. Los lípidos se separaron por cromatografía en capa fina en placas de silicagel G (Whatman) con una mezcla de éter de petróleo/ éter etílico/ ácido acético (80:20:1,5; v/v/v). Se cuantificó la radiactividad asociada con cada clase de lípido mediante conteo proporcional de barrido en un radioscanner (Berthold) y se expresaron los resultados como % de hidrólisis sobre la base de la cantidad de ácido graso formado.

II.G.8.f. Biosíntesis de acilgliceroles

La actividad de biosíntesis de acilgliceroles se determinó empleando un método optimizado previamente en nuestro laboratorio para este crustáceo (González-Baró y Pollero, 1993). Se incubaron 10 nmoles (0,56 μ ci/ tubo) de ácido palmítico ^{14}C con la proteína microsomal en un baño con agitación a 32 °C. La solución de incubación contenía buffer fosfato 50 mM pH 7,4, MgCl_2 2 mM, D-glicerol fosfato 20 mM, N acetil-cisteína 5 mM, ATP 5 mM y CoASH 0,2 mM en un volumen final de 350 μ l. La reacción se detuvo agregando 2 ml de solución de Folch. Luego de centrifugar se descartó la fase superior. Los lípidos se separaron por cromatografía en capa fina en placas de silicagel G (Whatman) empleando éter de petróleo, éter etílico y ácido acético (80:20:1,5; v/v/v) con doble desarrollo. La radiactividad asociada con cada clase de lípido se cuantificó por conteo proporcional de barrido en un radioscanner.

Si bien los sistemas enzimáticos fueron ensayados siguiendo las técnicas adaptadas a este camarón en nuestro laboratorio, previo a los ensayos con WSF en camarones adultos y en embriones, se realizaron repeticiones de las curvas de actividad versus tiempo y concentración de proteína. Cabe señalar también que en los ensayos con huevos, se seleccionó el estadio 5 de desarrollo por ser el período con mayor actividad para dichas enzimas, coincidiendo con una etapa de activa organogénesis (González-Baró y col., 2000).

La cinética de todas las enzimas se estudió a concentraciones de proteína y tiempo de incubación dentro del rango lineal manteniendo condiciones óptimas de temperatura y pH. Cabe destacar que en los ensayos de los sistemas enzimáticos en los que se utilizaron ácidos grasos como sustratos, no se trabajó a concentraciones saturantes de los mismos debido al efecto detergente que estos ejercen sobre las membranas.

II.G.9. Medidas fluorométricas

Las muestras de microsomas (ver II.G.8.a) se resuspendieron en 3 ml de buffer fosfato 50 mM a pH 7,4 con 2 μ M del fluoróforo 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) y diferentes concentraciones de HC. Las muestras se

incubaron en un baño termostático a 20 °C con agitación en la oscuridad por 2 h para permitir al DPH equilibrarse con los lípidos microsomales. Las medidas se realizaron en un espectrofluorómetro (Aminco) con accesorios de polarización y se determinó la anisotropía del estado estacionario de acuerdo al método descrito por Lakowicz y col. (1979) con modificaciones (Triccerri, y col., 1994; Garda, y col., 1994 a y b). La longitud de onda de excitación fue de 361 nm y la luz emitida se filtró para eliminar las longitudes de onda por debajo de 389 nm ya que la λ de emisión para el DPH es de 430 nm.

II.G.10. Métodos empleados para el estudio del sistema de defensa antioxidante

II.G.10.a. Preparación de las muestras

Las branquias y los HP disecados de camarones adultos (ver II.G.6) y camadas de huevos fueron pesados y procesados individualmente. Las muestras se homogenizaron en sacarosa 500 mM conteniendo buffer Tris-base 20 mM pH 7,6; EDTA 1 mM; ClK 150 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM en una relación muestra/ buffer (1:9; p/v) utilizando un homogenizador manual para tubos eppendorf (Thomas Scientific). Los homogenatos se centrifugaron durante 10 min a 14.000 g a 4 °C, colectando el sobrenadante. Se realizó la determinación de proteínas por el método de Lowry y col. (1951) empleando albúmina bovina como estándar.

II.G.10.b. Medidas del sistema enzimático

Las medidas de las enzimas del sistema de defensa antioxidante se realizaron en homogenatos totales de HP, branquias y huevos (en estadios 5-6). Los buffers se termostataron previamente a 30 °C.

II.G.10.b.1. Catalasa

La incubación para determinar la actividad catalasa se realizó en buffer fosfato 50 mM pH 7,2 Tritón X100 (20 % p/v) conteniendo la muestra. La reacción comenzó con el

La técnica consiste en medir la capacidad de la hemolinfa para captar radicales libres utilizando el reactivo ABTS⁺ formado por oxidación de ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzothiazoline-6 ácido sulfúrico) (Rice-Evans y Miller, 1997). La actividad antioxidante se mide por supresión de la absorbancia a 730 nm, que es la máxima del radical, y es directamente proporcional a la capacidad antioxidante de la hemolinfa.

II.G.10.c.2. Poder reductor del Fe⁺³

Se realizó mediante la técnica de FRAP ("Ferric reducing activity of plasma") que mide la capacidad de reducir Fe⁺³ – tripiridil triazina a Fe⁺² – tripiridil triazina, un producto coloreado que presenta una absorbancia máxima a 593 nm (Benzie y Strain, 1996). La capacidad antioxidante o reductora de la hemolinfa está directamente relacionada con la aparición de color.

II.H. Análisis estadístico

Para el análisis morfométrico del desarrollo embrionario de *M. Borellii*, la normalidad y homocedacea de cada variable fueron determinadas por los análisis de Kolmogorv-Smirnov y Barlett, respectivamente. Luego de estudiar las diferencias entre los estadios definidos previamente, se diseñaron ANOVAs de las variables medidas en cáscara, ojo y vitelo (Tukey HSD, $p < 0,05$). Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre todas las variables para eliminar aquellas que presentarían un alto índice de correlación. También se llevó a cabo un análisis de componente principal para reducir las 14 variables analizadas, seleccionando aquellas variables que mejor definieron los grupos. Por último se hizo un análisis discriminante teniendo en cuenta los estadios definidos, para elegir las variables seleccionadas que permitieran discriminar entre los diferentes grupos y así clasificar las muestras dentro de los grupos anteriormente mencionados. Los datos se transformaron usando la fórmula: $(X-SD) / X$. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Statistica 4.5 (Statsoft Inc., USA).

En los ensayos de toxicidad para determinar la LC50, los resultados se analizaron con el método de PROBIT usando el programa Toxdat (USA, EPA) con un 95 % de límite de confianza.

Se usó el análisis de varianza para determinar las diferencias entre los grupos en los diferentes tratamientos usando el programa Instat 2.0 y se consideraron significativas a un nivel del 5 %.

Capítulo III

Estudio de base del ambiente y el desarrollo embrionario de
Macrobrachium borellii

III.A. Introducción

Se entiende por impacto ambiental cualquier alteración física, química o biológica causada por alguna actividad o factor humano. El estudio del impacto ambiental comprende un conjunto de estudios técnico-científicos, sistemáticos e interrelacionados entre sí, cuyo objetivo es la identificación, predicción y evaluación de los efectos positivos o negativos que puede producir una o un conjunto de acciones de origen antrópico sobre el ambiente (CONAMA, 1994). Dentro de estos estudios, los referidos a la línea de base tienen por finalidad analizar el estado del área de influencia del proyecto que se pretende desarrollar, en forma previa a su ejecución. En nuestro caso se seleccionó como área de muestreo el arroyo El Pescado (ver mapa sección II.B) en la que se evaluó la presencia de HC de origen petrogénico en muestras de agua, sedimento y camarones para determinar las cantidades basales en los mismos.

En estudios dedicados al impacto de contaminantes en el ambiente, es deseable la utilización de especies autóctonas, y en varios casos, como en el presente trabajo, se han empleado camarones para biomonitorizar la calidad ambiental (Shigehisa y Shiraishi, 1998; Morales y col., 2000). Si bien las bondades de *M. borellii* como modelo ya han sido mencionadas en la introducción general, cabe destacar aquí que, al igual que otros palaemónidos, posee huevos grandes y macizos (Nazzari y col., 2000), permitiendo seguir el desarrollo embrionario a través del corion transparente (Sandeman y Sandeman, 1990; Odinetz-Collart y Rabelo, 1996).

Los arroyos cercanos a la ciudad de La Plata se caracterizan por su alto nivel de eutrofización (Bauer y col., 2002). Estas condiciones son desfavorables para algunos de los organismos comúnmente usados en ensayos toxicológicos, ya que suelen ser poco resistentes a pequeños incrementos en nutrientes y a la menor disponibilidad de oxígeno disuelto, por ello los resultados de bioensayos en ambientes pampeanos empleando invertebrados originarios de áreas oligotróficas, pueden ser cuestionables para determinar el estado de contaminación en esta zona (Graça y col., 2002). Este factor también se tuvo en cuenta en la elección de *M. borellii* como modelo.

Dado que no existían descripciones básicas de la embriogénesis de *M. borellii* en la que basar los estudios ecotoxicológicos y metabólicos, se realizó un estudio de morfometría del desarrollo embrionario desde la puesta hasta la eclosión de los huevos.

III.B. Resultados

III.B.1. Estudio de línea de base

Inicialmente se realizó la comparación de tres técnicas de extracción de HC en muestras biológicas y de sedimentos. Para la extracción de HC de muestras de sedimentos, las técnicas utilizadas fueron: saponificación con KOH, sonicación y soxhlet (ver II.D.3). Se observó que la técnica de sonicación resultó ser la más eficiente en extraer los HC aromáticos, mientras que el método por soxhlet extrajo mejor los HC alifáticos (Tabla III.1). Debido a esto se seleccionó el método de sonicación para la evaluación de las muestras de campo ya que si bien la extracción de los alifáticos fue algo menor que con el método de soxhlet, nuestro interés era lograr el máximo de recuperación de los HC aromáticos. La técnica de saponificación resultó ser la de menor % de recuperación.

Con respecto a las muestras biológicas las técnicas de extracción que se compararon fueron: destilación por arrastre, el método de Bligh y Dyer y soxhlet (ver II.D.2). Para compararlas, también se les agregó la misma mezcla de estándares que a los sedimentos. En este caso la técnica de destilación fue con la que se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación de los HC aromáticos, a diferencia del método de Bligh y Dyer que extrajo más eficientemente los HC alifáticos. Para estudiar el nivel basal de HC en los camarones colectados para los bioensayos y los posteriores estudios del efecto de la WSF, se empleó entonces el método de destilación por arrastre con DCM debido a que los HC aromáticos son los principales responsables del efecto tóxico de los HC en los organismos (GESAMP, 1993).

Tabla III.1. Porcentajes de recuperación de hidrocarburos empleando diferentes técnicas de extracción en muestras de sedimento y biológicas.

	HC	Sonicación	Saponificación	Soxhlet
Sedimentos	Aromáticos	45,76	14,53	40,9
	Alifáticos	51,71	33,42	62,37
	HC	Soxhlet	Destilación	Bligh & Dyer
Biológicas	Aromáticos	36,22	41,07	31,72
	Alifáticos	32,88	14,65	47,48

Los valores de pH del agua del área de muestreo se encontraron entre 6,7- 6,9, mientras que la temperatura varió entre una media de 10 °C en invierno y 25 °C en verano.

Con las técnicas empleadas no se detectaron HC en las muestras de agua (sin filtrar) y en camarones, lo que demostró que los animales empleados para los experimentos no estaban siendo expuestos a HC de origen petrogénico en el ambiente seleccionado para su recolección.

En la Tabla III.2 se muestra la composición de HC alifáticos de las muestras extraídas por el método de sonicación. Estos datos se procesaron de manera tal de poder determinar el posible origen de los HC del sedimento para lo cual se utilizaron los siguientes índices: (1) El índice bajo/alto peso molecular de HC es el cociente de la suma de los n-alcános $\leq C_{20}$ y la suma de los n-alcános $\geq C_{21}$. Este cociente es generalmente cercano a 1 para algas, plancton y petróleo crudo, mientras que las bacterias sedimentarias, animales marinos, plantas superiores y sedimentos no contaminados presentan valores < 1 , como se observó en las muestras analizadas. (2) El origen de los HC de estas series también se puede inferir del cociente entre la suma de todos los n-alcános y el C16, este valor es alto en muestras biogénicas debido a la dominancia de los n-alcános impares (> 50) y bajo en muestras contaminadas con petróleo (< 15). (3) El índice preferido de carbono (IPC) está dado por la razón entre: $2(C_{27} + C_{29}) / (C_{26} + 2C_{28} + C_{30})$. En este caso los HC petrogénicos muestran un valor cercano a 1, mientras que las plantas vasculares y sedimentos no contaminados presentan un rango entre 3 a 6. Los otros tres índices, (4) Alcanos / Isoalcanos ($\Sigma C_{14}-C_{18} / \Sigma$ isoprenoides), (5) C17 / Pristano y (6) C18 / Fitano evalúan la presencia de petróleo y la biodegradación de n-alcános. Valores bajos (< 1) de estos índices sugieren la presencia de petróleo biodegradado, mientras que valores altos corresponden a baja biodegradación (Colombo y col., 1989). La aplicación de estos índices indicó en todos los casos que los HC alifáticos predominantes en las muestras de sedimento son de origen biológico (Tabla III.3). También se calculó el contenido de materia orgánica (MO) de los sedimentos siendo el valor promedio de las muestras recolectadas de 2,6 % de sedimento seco.

Tabla III.2. Concentración de hidrocarburos alifáticos de las muestras de sedimento recolectadas en el arroyo El Pescado durante un período de 22 meses.

HC	13/06/01	12/09/01	19/01/02	15/02/02	04/04/02	19/07/02	16/08/02	06/09/02	17/01/03	13/02/03	04/04/03
nC10	0,26	1,66	1,34	1,54	1,73	0,65	1,46	0,87	1,34	2,38	0,50
nC11	0,12	0,87	0,83	1,33	0,88	0,42	Tr	0,55	Tr	1,72	0,33
nC12	0,18	0,52	0,52	1,30	0,60	0,36	0,76	0,44	0,70	0,72	0,17
nC13	0,68	3,64	0,58	2,37	0,60	0,38	1,19	0,47	1,09	5,52	Tr
Isoprenoide	0,27	0,52	0,43	Tr	Tr	Tr	Tr	0,35	Tr	0,87	0,46
nC14	0,71	0,41	1,10	1,77	1,30	1,18	1,81	0,70	1,65	3,10	0,38
Isoprenoide	0,27	Tr	0,87	1,25	0,26	0,22	0,90	4,87	0,82	1,12	Tr
nC15	Tr	Tr	0,36	1,24	0,80	0,55	0,31	1,06	0,28	0,42	Tr
nC16	1,51	0,68	1,60	3,38	1,91	2,27	2,52	1,04	2,31	5,37	0,93
Isoprenoide	0,28	Tr	0,29	0,42	0,17	0,22	0,17	1,03	0,16	0,55	Tr
nC17	1,34	0,28	1,54	2,14	1,25	0,99	1,53	1,48	1,40	3,71	0,44
Pristane	0,88	0,45	0,91	0,41	0,87	0,65	1,08	0,44	0,98	1,29	0,49
nC18	1,34	0,93	1,60	3,13	1,52	2,36	2,37	1,26	2,17	4,55	1,23
Phytane	0,47	0,42	0,10	0,34	0,20	0,15	0,31	0,60	0,29	0,10	0,59
nC19	0,32	0,17	0,54	0,57	0,31	0,34	0,44	0,67	0,40	0,83	0,31
nC20	0,40	0,47	0,55	1,13	0,78	1,39	1,23	1,02	1,12	2,23	0,67
nC21	0,13	0,10	0,27	0,32	0,19	0,23	0,39	0,73	0,36	0,67	0,42
nC22	0,32	0,51	0,44	0,65	0,71	1,18	1,05	1,07	0,96	1,74	0,60
nC23	0,22	0,24	0,54	0,73	0,47	0,74	1,13	1,33	1,04	1,60	1,04
nC24	0,36	0,62	0,53	0,86	0,72	1,05	1,14	0,83	1,04	1,83	1,11
nC25	0,62	0,69	1,54	1,67	1,26	1,74	2,88	2,52	2,63	4,31	3,01
nC26	0,40	0,52	0,77	0,74	0,80	1,05	2,21	0,89	2,02	1,55	1,37
nC27	1,06	1,06	2,34	2,68	2,48	2,76	4,85	3,91	4,44	4,79	4,41
nC28	0,62	0,58	0,93	1,12	1,39	0,98	2,84	1,13	2,60	2,20	2,15
nC29	2,49	2,01	4,59	5,69	5,93	5,02	10,25	7,87	9,39	9,31	8,90
nc30	0,44	0,54	1,10	1,31	1,24	1,03	2,11	1,07	1,94	1,54	1,61
nC31	3,34	3,15	7,75	14,89	10,83	10,82	15,80	11,45	14,47	14,48	16,12
nC32	0,33	0,33	0,93	0,84	1,09	0,91	1,24	1,37	1,13	1,37	1,36
nc33	2,57	2,26	5,08	9,14	8,86	7,51	10,59	8,94	9,70	9,63	11,44
nC34	0,31	0,00	0,42	0,43	0,52	0,42	0,55	0,46	0,50	0,62	Tr
nC35	0,68	0,00	1,20	2,14	2,89	1,95	2,64	3,12	2,42	2,08	2,73
Total identificados	22,91	23,63	42,18	65,49	52,55	49,54	75,74	63,55	69,35	93,22	62,76
ΣCNI	22,88	5,77	32,64	29,64	23,44	20,24	57,67	48,93	52,81	64,79	16,65
Total	45,79	29,41	74,82	95,14	75,98	69,78	133,41	112,48	122,16	158,02	79,40

Concentración expresada en ng HC/g sedimento seco

ΣCNI: Sumatoria de compuestos no identificados.

Tr: trazas

Tabla III.3. Valores de los índices utilizados para determinar el origen de hidrocarburos alifáticos de las muestras de sedimentos recolectadas en el arroyo El Pescado durante un período de 22 meses.

Índices	13/06/01	12/09/01	19/01/02	15/02/02	04/04/02	19/07/02	16/08/02	06/09/02	17/01/03	13/02/03	04/04/03
bajo/alto	0.65	0.87	0.46	0.52	0.33	0.32	0.27	0.36	0.27	0.60	0.12
n-alcanos/C16	12.74	31.66	23.38	17.68	25.73	20.23	28.08	52.93	28.08	15.45	64.51
IPC	3.40	2.78	3.71	3.91	3.49	3.85	3.02	5.58	3.02	3.76	3.66
Alcano/isopreno	5.99	4.43	3.89	6.99	15.79	16.36	7.97	0.89	7.97	6.75	6.54
C17/Pristano	1.51	0.63	1.70	5.27	1.44	1.52	1.42	3.35	1.42	2.86	0.90
C18/Fitano	2.86	2.24	16.00	9.32	7.56	15.78	7.55	2.09	7.55	45.53	2.10
% MO	2,27	2,34	2,19	2,24	3,19	2,47	2,43	2,55	2,64	2,75	3,56

Para descripción y definición de los índices ver texto, pag. 50.

III.B.2. Estudio del desarrollo embrionario

III.B.2.a. Morfometría

Durante la época de reproducción en la primera temporada de estudio, hembras ovígeras portando la primera camada con huevos en estadios iniciales, fueron medidas y se contaron sus huevos. Se calculó la correlación entre estos dos parámetros y se observó que a medida que aumenta la talla de las hembras, se incrementa el tamaño de la camada (Figura III.1).

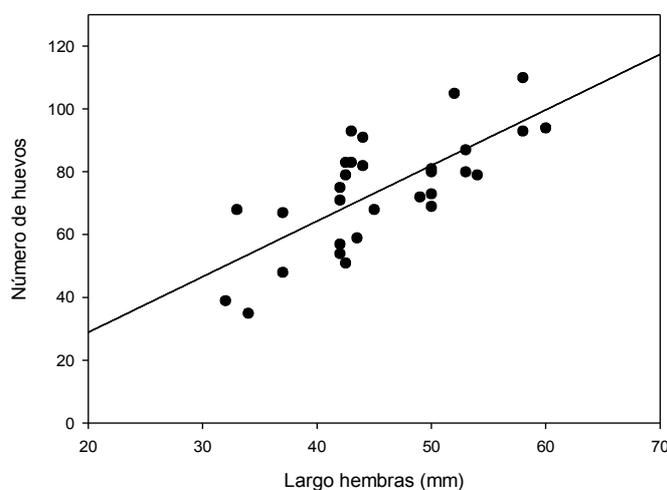
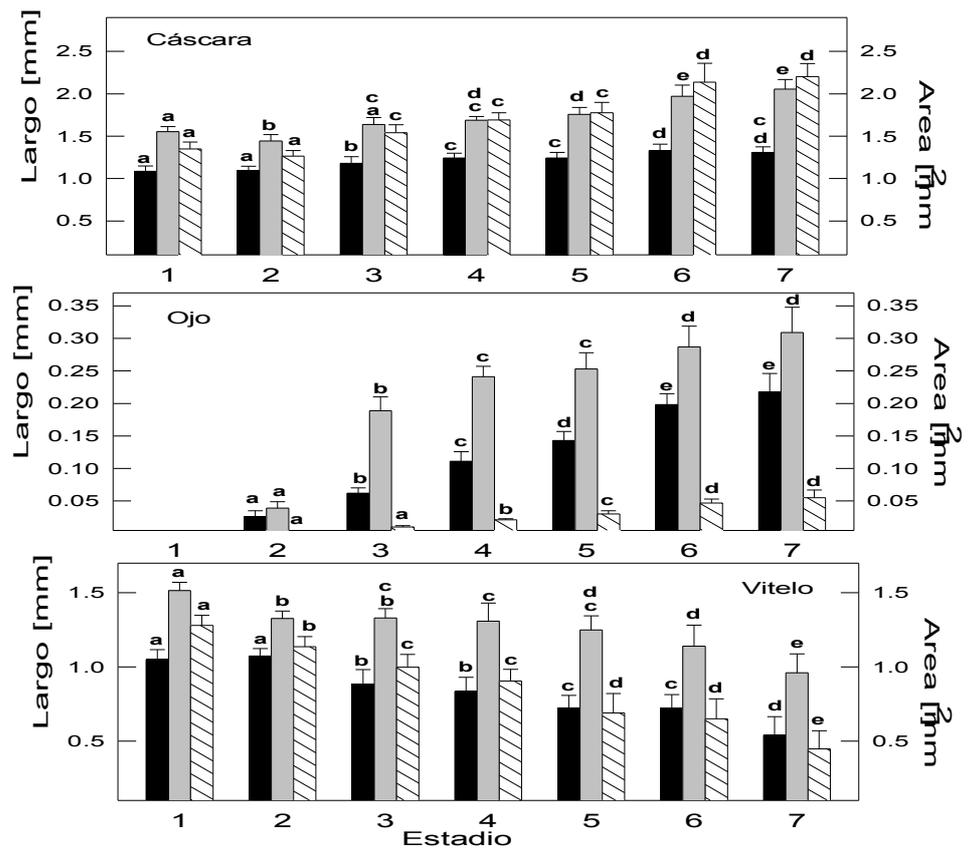


Figura III.1. Relación entre el largo del cuerpo de las hembras ovígeras y el tamaño de las camadas. N= 30; Coeficiente de correlación $r^2 = 0,73$

Bajo condiciones controladas de laboratorio, los huevos de *M. borellii* eclosionaron luego de aproximadamente 39 días. En este experimento piloto se separó el desarrollo embrionario en siete estadios como lo muestra la Figura III.2. El estadio 1 (de 0-7 días) comprende los embriones desde mórula (4 células) hasta gástrula con un alto contenido en vitelo que ocupa la mayor parte del huevo. En el estadio 2, que abarca embriones con 8-15 días de desarrollo, el vitelo comienza a disminuir y se hace visible un casquete transparente en el polo animal que corresponde al embrión (la región clara del huevo en la Figura III.2). En el estadio 3 los embriones con 15-21 días de desarrollo ya presentan ojos incipientes visibles. Durante el estadio 4, que corresponde a los embriones con 21-29 días de desarrollo, el vitelo es englobado por el embrión y la masa del vitelo se divide en cuatro lóbulos; los ojos aumentan de tamaño y son elongados. En estadio 5 (29-32 días), la forma de los ojos se va redondeando, la pigmentación rojiza de la cutícula se hace evidente y el embrión muestra activa organogénesis. El estadio 6 comprende los embriones que tienen 32-37 días de desarrollo, el azul de la hemocianina se torna visible y el vitelo está ya incorporado dentro del sistema digestivo del embrión. En el estadio 7 el embrión (de 37-40 días) presenta todas las características de la larva y está listo para eclosionar. En general, el vitelo decrece su viscosidad a lo largo del desarrollo.

El estudio morfométrico de *M. Borellii* se llevó a cabo en estos presuntos 7 estadios midiendo las 14 variables descriptas en materiales y métodos (ver II.F) las cuales se analizaron estadísticamente para seleccionar aquellas que mejor definieran los estadios y al mismo tiempo fueran más fáciles de medir. Para ello se siguieron los principales eventos morfológicos durante el desarrollo en la cáscara (C), el ojo (O) y el vitelo (V).

Figura III.2. Morfología típica de los huevos de *M. borellii* a diferentes estadios de desarrollo.



Stage

Stage

Figura III. 3. Cambios en la cáscara, vitelo y ojo durante el desarrollo.

■ Diámetro mínimo; ▨ Área.; ■ Diámetro máximo

Los valores representan las medias ± 1 SD, N= 160.

Las diferencias observadas para cada uno de los parámetros entre los estadios ($p < 0,05$) están indicadas por diferentes letras.

Se observó un incremento progresivo del tamaño del huevo variando el diámetro máximo desde 1,5 a 2,0 mm (Figura III.3). Este aumento en el tamaño fue coincidente con el incremento del contenido de agua el cual es estadísticamente significativo entre el estadio 1 y los últimos tres estadios (Tabla III.4). A pesar del aumento significativo en el tamaño del huevo, la redondez se conserva a lo largo del desarrollo excepto en los dos últimos estadios donde la forma del huevo se hace mas ovoide (Figura III.2, Tabla III.5). La Figura III.3 muestra el análisis de varianza de las variables morfológicas más relevantes seleccionadas a partir del análisis de correlación de Pearson. Las variables con alta dispersión fueron descartadas. Cuando se encontraron dos variables con alta correlación entre ellas, se seleccionó aquella que fuera más fácil de medir. De esta manera se eligieron finalmente las variables área (a), diámetro máximo (x), diámetro mínimo (m), redondez (r) y en algunos casos perímetro (p). Cuando se analizaron estas variables en cáscara y ojo se encontró un incremento significativo a lo largo del desarrollo, mientras que todas las variables del vitelo disminuyeron. El contenido en vitelo disminuyó del 95 al 35 % presentando una correlación negativa con el aumento del tamaño del huevo. El consumo del vitelo como fuente de energía se correlacionó con la disminución del peso seco observado (Tabla III.4). La redondez del vitelo también disminuyó notoriamente durante el desarrollo (Tabla III.5), mientras que las características anatómicas que cambiaron en mayor medida fueron los ojos.

Tabla III.4. Peso seco de los huevos en diferentes estadios de desarrollo.

Estadio	Peso seco
	% (p/p)
1	48,8 ±2,5 ^a
2	44,9 ±1,6 ^{a,b}
3	44,2 ±3,5 ^{a,b}
4	41,5 ±3,5 ^{a,b}
5	39,9 ±2,0 ^b
6	37,5 ±4,0 ^b
7	38,5 ±4,0 ^b

Las diferencias observadas entre los estadios ($p < 0,05$) están indicadas por diferentes letras. Los valores son la media de $N = 3 \pm 1$ SD.

Tabla III.5. Variación de la redondez de la cáscara, ojo y vitelo durante el desarrollo.

Estadio	Cáscara	Ojo	Vitelo
1	1,07 ± 0,05 ^{a,b}	nd	1,12 ± 0,05 ^{a,b}
2	1,04 ± 0,02 ^{a,b}	1,02 ± 0,04 ^{a,d,f}	1,07 ± 0,05 ^a
3	1,05 ± 0,02 ^{a,b}	1,49 ± 0,10 ^b	1,20 ± 0,14 ^{b,c}
4	1,04 ± 0,01 ^{a,b}	1,28 ± 0,10 ^c	1,24 ± 0,16 ^{c,d}
5	1,08 ± 0,02 ^{b,c}	1,20 ± 0,09 ^{c,d,e}	1,22 ± 0,10 ^{c,d}
6	1,09 ± 0,02 ^{c,d}	1,07 ± 0,04 ^f	1,20 ± 0,08 ^{b,d}
7	1,09 ± 0,02 ^d	1,13 ± 0,15 ^{e,f}	1,37 ± 0,16 ^e

Las diferencias observadas entre los estadios ($p < 0,05$) están indicadas por diferentes letras.

nd: no detectable.

Para estudiar la covarianza de las variables y el agrupamiento de las muestras, se realizó un análisis de componente principal. La Figura III.4 muestra las variables originales (vectores) y los datos agrupados (números). Los vectores que están cerca unos de otros están positivamente correlacionados, mientras que los vectores opuestos indican una correlación negativa.

Solamente los dos primeros componentes, componente principal 1 (PC1) y el 2 (PC2) fueron empleados en este estudio ya que juntos explican el 92 % de la variabilidad. El PC1 estuvo principalmente determinado por la contribución del vitelo Va, Vx y Vm (-PC1) y la cáscara Cm, Cx, Ca, Cp, tanto como el ojo Oa, Om, Ox, Op, y el vitelo Vp (+PC1). PC2 presentó una fuerte contribución de Or y en menor medida Ox (+PC2), y Cr (-PC2). Ambos componentes discriminaron los grupos de acuerdo al estadio de desarrollo, los primeros estadios fueron mejor definidos por el contenido de vitelo del huevo, estadios 3 y 4 por la forma del ojo, y los últimos estadios por el incremento del tamaño del huevo, la forma así como también el área del ojo (0 a 0,05 mm²) y el tamaño (0,04 a 0,30 mm diámetro máximo). La Figura III.2 muestra otros rasgos que separan los estadios entre si como el notable color azul de la hemolinfa debido al pigmento respiratorio de la hemocianina que se comienza a observar a partir del estadio 5 como pequeños puntos. Esta variable no fue incluida en este estudio porque dado que la densidad óptica está fuertemente influenciada por la luz, el análisis de esta variable mostró una elevada varianza.

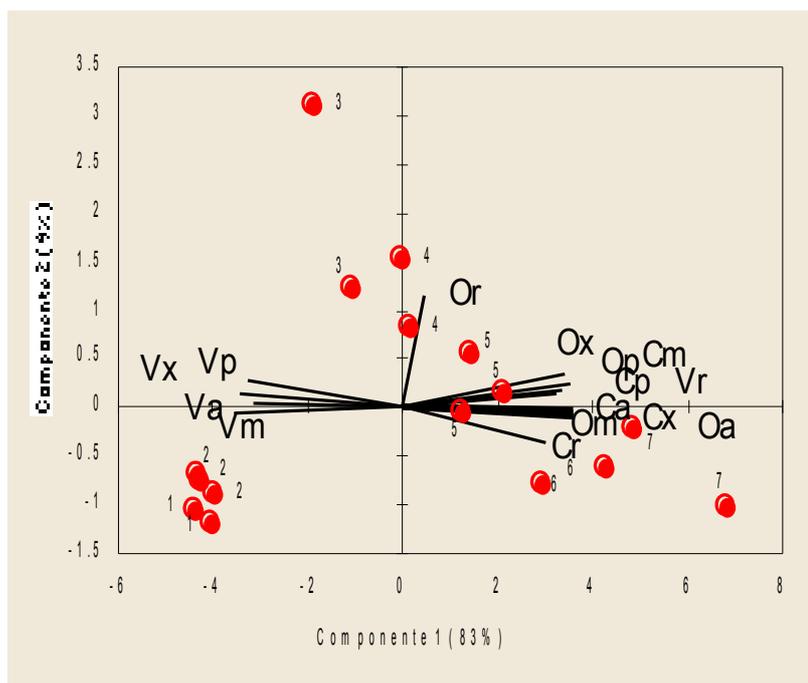


Figura III.4. Diagrama de los dos primeros componentes del análisis de componente principal (PCA).

Los datos agrupados están representados por los círculos y la contribución relativa de las 14 variables se muestra en el plano. Los vectores corresponden a cada variable. 1 a 7: estadios de desarrollo. Las referencias de los parámetros se encuentran en la Tabla II.2 pag. 33.

Mediante un análisis discriminante se seleccionaron aquellas variables que al mismo tiempo fueran fácilmente medibles y con una baja correlación entre ellas. Las variables fueron probadas con todo el set de datos para evaluar su habilidad para discriminar entre los grupos naturales y predecir el grupo al que pertenece cada huevo. La Tabla III.6 muestra las 4 variables (cáscara-redondez, cáscara-diámetro máximo, vitelo-redondez y vitelo- diámetro máximo) que fueron capaces de agrupar los estadios asignados previamente (1 a 7) con un alto poder predictivo de clasificación, excepto para los estadios 3 y 4 donde estas variables no resultaron suficientes. Por lo tanto en este caso se incluyeron las variables del ojo (redondez y diámetro máximo) donde el estadio 1 no fue analizado porque no los presenta. De esta forma aumentó con un alto grado de confianza el poder de predicción del análisis para estos estadios (100 y 73 % respectivamente).

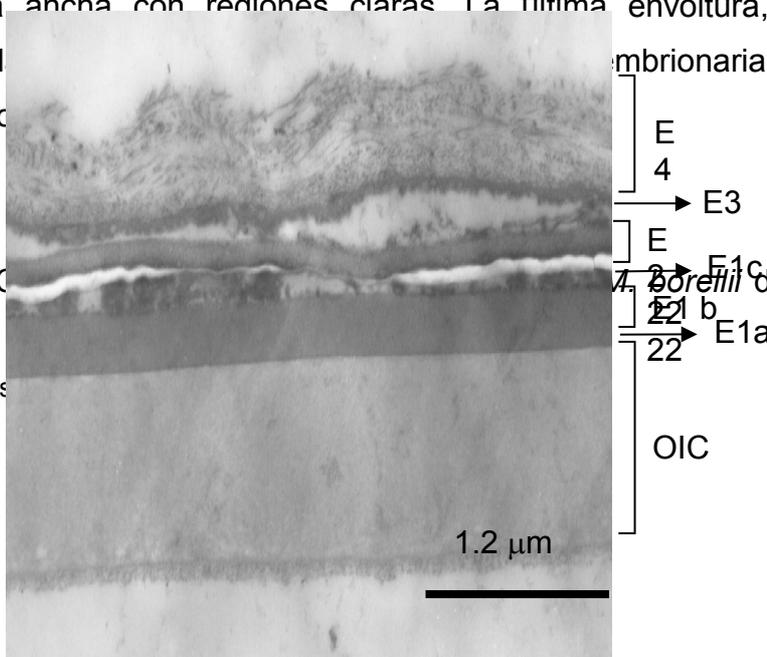
Tabla III.6. Análisis discriminante de los datos utilizados para seleccionar las variables (% de asignación correcta que predice la clasificación).

Estadio	Sin las variables	Con las variables
	del ojo % correcto	del ojo % correcto
1	84,2	-
2	100	100,0
3	57,1	100,0
4	35,3	73,3
5	85,2	82,6
6	69,2	70,0
7	78,6	84,6
Total	76,7	82,9

III.B.2.b. Ultraestructura de la cáscara

La Figura III.5 muestra la composición de la cáscara de un huevo de *M. borellii* correspondiente al estadio 3 de 15-20 días de desarrollo. Se identificaron cinco envolturas análogas a las descritas en *Palaemonetes pugio* por Glas y col. (1997). La envoltura más externa (OIC) permite la adhesión a otros huevos y también forma el funículo que fija los huevos a los pleópodos de la hembra, a los que permanecen unidos hasta la eclosión. Por debajo de la OIC se ubica la primera envoltura embrionaria (E1) que está constituida a su vez por una capa fina externa (E1a), una capa gruesa interna (E1b) y la capa E1c que está formada por material filamentososo con estructura desorganizada. La capa E2 se encuentra asociada con la E1 y comprende una capa fina externa densa y una interna menos densa. La tercer capa (E3) está formada por una capa fina electro-densa y una banda heterogénea ancha con regiones claras. La última envoltura, E4, tiene una estructura similar a la primera envoltura embrionaria durante el resto del desarrollo embrionario.

Figura III.5. Corte transversal de la cáscara de un huevo de *M. borellii* de 15-20 días de desarrollo. Las referencias son...



III.C. Discusión

Estudio de línea de base

La evaluación de la presencia de HC en muestras de agua, sedimento y organismos en el área seleccionada para la recolección de los camarones, fue un requisito indispensable antes de comenzar con los bioensayos. Antes de comenzar con las determinaciones se compararon diferentes técnicas de extracción de HC en las muestras el sedimento en donde la técnica de sonicación resultó ser la más eficiente para la recuperación de HC aromáticos mientras que la de soxhlet lo fue para los alifáticos, por lo que se eligió la primera dado nuestro interés de lograr el máximo de recuperación de estos. En las muestras de tejidos la mejor recuperación de HC aromáticos se logró por medio de destilación por arrastre con vapor. Cabe mencionar que en general los porcentajes de recuperación fueron bajos, probablemente debido a evaporación durante el procesado de las muestras.

Los resultados obtenidos con este monitoreo no mostraron cantidades perceptibles de HC en las muestras de agua y camarones. Para conocer la historia previa del área, estos datos son buenos indicadores de que el sitio no ha estado sujeto a contaminación por HC en los años previos al muestreo ya que si bien se puede argumentar que el agua varía su concentración de HC de acuerdo a las condiciones del momento, ha sido encontrado petróleo en sedimentos de sitios de baja energía inclusive después de 5 años de haber ocurrido un derrame, y estos HC pueden ser liberados a la columna de agua mucho tiempo después de haberse iniciado el derrame. De esta manera, las especies bentónicas podrían acumular los HC directamente desde la columna de agua o indirectamente desde el agua intersticial de los sedimentos como consecuencia del intercambio químico entre el agua de la columna y el agua intersticial (Bhattacharyya y col., 2003). En este sentido el análisis del sedimento también fue indicativo de la escasa presencia de HC petrogénicos, si bien cabe mencionar que se observaron cantidades traza de HC aromáticos.

Apoyando este razonamiento, Glegg y Rowland (1996) observaron que en muestras del gasterópodo *Patella vulgata* tomadas luego de seis meses del derrame de petróleo del Braer, los niveles de HC en los organismos disminuyeron a la concentración basal de la región.

Como en las muestras de sedimentos se observó la presencia de HC de la serie alifática, se aplicaron a su análisis algunos de los índices de HC que son comúnmente usados para identificar las posibles fuentes de contaminación (Tran y col., 1997; Colombo y col., 1989; Commendatore y col., 2000). Se pudo determinar que el sedimento contiene HC esencialmente de origen biogénico, provenientes principalmente de plantas superiores. El contenido de materia orgánica fue elevado (2,2-3,6 %) similar al encontrado en otras zonas del estuario del Río de La Plata (Bilos y col., 1998). Este dato también apoya la hipótesis de que el sitio no ha estado sujeto a contaminación por HC, ya que es sabido que la MO tiene una alta capacidad de absorción de HC. Por ejemplo se ha encontrado que sedimentos (luego de 6 meses del derrame del Estrella Pampeana en las cercanías de la localidad de Magdalena) con alto contenido de materia orgánica presentaron altas concentraciones de HC (Moreno y col., 2004).

Estudios realizados en esa zona costera del Río de La Plata revelaron una significativa disminución de la diversidad de macroinvertebrados bentónicos causada por el derrame, y muestreos realizados tres años después mostraron pocos signos de recuperación por la permanencia de HC en los sedimentos (Rodríguez Capítulo y col., 2004).

Graça y col. (2002) estudiaron el estado de contaminación en los arroyos de la cuenca del Río de La Plata por medidas de diversidad de especies y parámetros fisicoquímicos. Este grupo también determinó que el arroyo El Pescado no estaba contaminado en el área cercana a nuestra zona de muestreo basándose en las especies de invertebrados presentes, el oxígeno disuelto (6,1 mg/l) y los valores de conductividad (257 $\mu\text{S cm}^{-2}$).

Estudio morfométrico del desarrollo embrionario de M. borellii

Bajo condiciones controladas de laboratorio a 24 °C, el desarrollo de *M. borellii* lleva alrededor de 39 días hasta la eclosión. Este es un período de incubación 10 días menor que el que reporta Boschi (1981) en condiciones naturales para esta especie. Esto probablemente se deba a las fluctuaciones de temperatura en el ambiente donde el rango varía entre 20-30 °C. En un estudio sobre el efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario de *M. rosenbergii*, Gomez Diaz (1987) encontró que a los huevos incubados a 25 y 31 °C les lleva 26 y 16 días, respectivamente, llegar a la eclosión. También otros

autores han observado que pequeños cambios en la temperatura son suficientes para alterar significativamente el tiempo de desarrollo de los huevos (Wear, 1974). El período de incubación de *M. borellii* es significativamente más largo que el de otros Palaemonidos, y Wear (1974) sugiere que entre decápodos que estén cercanamente relacionados, el incremento en el tamaño de los huevos y, consecuentemente el contenido de vitelo (como ocurre en *M. borellii*), retarda el tiempo de desarrollo. Frecuentemente, se relaciona al gran tamaño de los huevos con hembras que producen menor cantidad de huevos. Por otra parte, se ha observado en varias especies de crustáceos con desarrollo abreviado, que el número de huevos que lleva una hembra depende tanto del tamaño del individuo como de la especie a la que pertenece (Rabalais y Gore, 1985), coincidiendo esto con la correlación positiva que presentaron las hembras de *M. borellii* con el tamaño de sus camadas.

Se estudiaron los principales eventos morfológicos durante el desarrollo embrionario, midiendo los rasgos más conspicuos como la cáscara, el vitelo y el ojo. El diámetro máximo aumentó a lo largo del desarrollo, como también el área de la cáscara. Durante el desarrollo embrionario hubo también un incremento en el contenido de agua. Es sabido que la cáscara altera su permeabilidad durante el desarrollo permitiendo el ingreso del agua (Glas y col., 1997; Narashimha-Rao y col., 1981). De este modo, la observación del aumento del área del huevo un 33 % al final del desarrollo podría ser atribuido tanto a la expansión del embrión como a la turgencia osmótica por ingreso de agua como se ha encontrado en otros decápodos (Pandian, 1970; Marangos y Vincent, 1988; Narashimha-Rao y col., 1981). También se debe tener presente que el incremento en el contenido de agua se debe en parte al agua metabólica producida por la oxidación, principalmente, de los lípidos del vitelo (Pandian, 1970). Incrementos en estas magnitudes también fueron reportadas en otros Palaemonidos (Gore, 1985). A medida que el huevo se va agrandando, se va haciendo más ovoide tal como se observó en otros Palaemonidos (Nazari y col., 2000).

Los ojos aparecen alrededor de los 15 días del desarrollo, pero se van haciendo más visibles y conspicuos más tarde, tomando forma esférica al acercarse al momento de la eclosión. Todas las variables del vitelo decrecen durante el desarrollo debido a la utilización del vitelo por el embrión como fuente de energía (Heras y col., 2000). El consumo del vitelo también fue reflejado en la disminución en el peso seco (Tabla III.4). La mayor disminución del área del vitelo se observó entre los estadios 4 y 5, y esto fue

simultáneo con un notorio incremento en la actividad de algunas enzimas involucradas en el catabolismo lipídico (la principal fuente de energía) (Gonzalez-Baró y col., 2000). Ambos coincidieron con una activa organogénesis (Figura III.2). En el momento de la eclosión, el huevo todavía posee el 35 % del vitelo, el cual aporta a los primeros estadios larvales las reservas indispensables para las larvas del tipo lencitotrófico (Rabalais y Gore, 1985). Clarke y col. (1990) observaron que los embriones de *M. rosenbergii* con 17 días de desarrollo, eclosionan como larvas de zoea las que retienen alrededor del 90% del vitelo original y éste es consumido en las siguientes 24 h. *M. rosenbergii* tiene pequeños huevos (0,55 x 0,57 mm) con desarrollo del tipo lencitotrófico, pero a diferencia de *M. borellii*, esta especie no posee desarrollo abreviado (Rabalais y Gore, 1985).

De esta forma determinamos que usando solo la cáscara, el vitelo y el ojo considerando la redondez y el diámetro mayor se pudieron identificar 7 estadios de desarrollo en embriones de *M. borellii* con una exactitud de entre el 70 al 100 %. Este método no invasivo de medida de parámetros morfométricos en embriones de camarones permite una rápida selección de estadios de desarrollo sin necesidad de matarlos, lo cual es particularmente importante en estudios bioquímicos, fisiológicos y toxicológicos que requieren un seguimiento de organismos vivos.

Durante el período en que las hembras de los decápodos incuban sus huevos, las envolturas embrionarias protegen a los embriones del estrés físico y químico y mantienen constante el medio interno (Fisher y Clark, 1983). La envoltura externa, debido a la inmediata exposición al ambiente acuático, es de primordial importancia en este rol. Estudios sobre las envolturas de embriones del camarón *Palaemonetes pugio* realizados por Glas y col. (1997) revelaron que los embriones durante el desarrollo normal, forman la cáscara con un total de cinco envolturas. La envoltura externa (OIC) se origina a partir de una secreción cementante que permite la adhesión a otros embriones entre sí y también constituye el funículo que conecta los embriones con los pleópodos de la hembra, donde permanecen hasta la eclosión. Las restantes cuatro envolturas, son de origen embrionario (E1-4) y se van sintetizando durante el desarrollo. Estas mismas estructuras fueron identificadas en embriones de *M. borellii* con 15-20 días de edad. Se dispone de escasa información sobre la composición de dichas envolturas en decápodos. Pandian (1970) observó que en las cáscaras de los huevos de la langosta *Homarus gammarus*, las proteínas resultaron ser los constituyentes mayoritarios alcanzando un 70 % del peso seco. Por otro lado, estudios realizados en embriones de *P. pugio* con distintas clases de

lectinas mostraron que la OIC presentó residuos de glucosa y N-acetilglucosamina (Glas y col., 1997).

Esta información básica del ambiente y del desarrollo embrionario nos permitió encarar los estudios *in vitro* de acumulación, depuración y efectos metabólicos de hidrocarburos petrogénicos que se describen en los siguientes capítulos, utilizando a *M. borellii* de este hábitat.

Capítulo IV

Bioacumulación y biodepuración de la fracción hidrosoluble
de hidrocarburos en diferentes estadios de desarrollo

IV.A. Introducción

El análisis del agua, como el que se realizó en el capítulo II, permite la cuantificación de las sustancias tóxicas presentes, sin embargo no permite evaluar el efecto de las mismas sobre la biota. En este contexto, la utilización de bioensayos de corta duración como mecanismo de evaluación ecotoxicológico, se ha difundido como instrumento válido para evaluar el efecto tóxico de contaminantes en efluentes y aguas receptoras. Los bioensayos presentan dos ventajas importantes con respecto al análisis químico: miden directamente el efecto del tóxico sobre la biota y son, en general, de menor costo. Las condiciones experimentales bajo las que se realizan deben ser reproducibles y estandarizadas, para permitir validar los datos (Rodríguez y col., 1995).

Varios criterios de efecto o “end points” de toxicidad pueden ser usados para comparar los organismos expuestos a un contaminante con los no expuestos. Los criterios ideales son aquellos que estén asociados con los eventos moleculares que resultan de tal exposición. Sin embargo, en toxicología acuática esto es difícil de ejecutar debido a que los mecanismos moleculares son en general poco conocidos. Por lo tanto, al realizar la evaluación toxicológica, los primeros ensayos utilizan comúnmente la letalidad (mortalidad) como índice. La medida de letalidad es precisa, importante e inequívoca para estimar la potencia de un tóxico. Este parámetro permite comparar sustancias con mecanismos diferentes de acción e indica como conducir futuros estudios toxicológicos (Rand y col., 1995).

No existen demasiados estudios sobre la toxicidad del petróleo en organismos de agua dulce, pese a que los derrames ocurridos en estos ambientes suelen ser más complicados que los ocurridos en ambientes marinos (Mitchell y Holdway, 2000). En particular *M. borellii* solo había sido empleado en estudios de toxicidad frente a pesticidas en el laboratorio y por lo tanto fue necesario, como primer paso antes de los estudios metabólicos, analizar la toxicidad de la WSF. Los petróleos crudos son una mezcla compleja de cientos de compuestos orgánicos gaseosos, líquidos y sólidos, de los cuales alrededor del 75 % (p/p) son HC, incluyendo alcanos, cicloalcanos y aromáticos (Ralph y Burchett, 1998). Una vez que el petróleo ingresó en el agua, ocurre la disolución de compuestos principalmente mono y diaromáticos y compuestos polares que pasan a formar parte de la fracción hidrosoluble (WSF). En este sentido, también fue necesaria la caracterización de la WSF que se empleó en los bioensayos identificando los HC que la componen. En este

capítulo se determinó la toxicidad de la WSF en diferentes estadios de *M. borellii*, y se analizó la cinética de acumulación y biodepuración de los HC aromáticos en adultos.

IV.B. Resultados

Composición de la WSF

La Figura IV.1 muestra un cromatograma típico de los HC recuperados a partir de la WSF utilizada en los experimentos, mientras que en la Tabla IV.1 se presenta la composición de la misma. Los principales componentes de esta fracción fueron hidrocarburos monoaromáticos (tolueno, benceno, xileno y dimetil y trimetilbencenos) y muy bajas concentraciones de C₁₂-C₂₄ n-alcanos reflejando la baja solubilidad de estos compuestos. En esta WSF también se encontraron bajas concentraciones de naftaleno y metilnaftaleno y altos niveles de metilciclohexano comparado con WSF preparadas a partir de otros petróleos crudos livianos (Heras y col., 1992).

Tabla IV.1. Composición cuali-cuantitativa de la WSF determinada por cromatografía gaseosa capilar.

Hidrocarburo	mg/l	Hidrocarburo	mg/l
Benceno	0,192 ± 0,007	1,3,5-Trimetilbenceno	0,146 ± 0,020
Ciclohexano	0,035 ± 0,004	1-Etil-2-metilbenceno	0,062 ± 0,009
2-Metilhexano	0,004 ± 0,001	1,2,4-Trimetilbenceno	0,229 ± 0,028
Isooctano	0,036 ± 0,001	nC10	0,039 ± 0,001
nC7	0,018 ± 0,001	1,2,3-Trimetilbenceno	0,075 ± 0,009
Metilciclohexano	0,227 ± 0,006	nC11	0,018 ± 0,010
Tolueno	0,292 ± 0,034	1,2,4,5+1,2,3,5- Tetrametilbencenos	0,018 ± 0,002
Dimetilciclohexanos	0,082 ± 0,003	C4 Alquibencenos	0,184 ± 0,017
nC8	0,038 ± 0,001	Naftaleno	0,061 ± 0,008
Etilciclohexano	0,047 ± 0,001	nC12	0,004 ± 0,001
Etilbenceno	0,124 ± 0,016	nC13 + 2-Metilnaftaleno	0,057 ± 0,009
m + p-Xileno	0,713 ± 0,097	1-Metilnaftaleno	0,017 ± 0,003
o-Xileno	0,239 ± 0,032	nC14 + Etilnaftaleno	0,011 ± 0,003
Isopropilbenceno	0,016 ± 0,002	Dimetilnaftalenos	0,066 ± 0,024
Propilbenceno	0,020 ± 0,002	C3 Naftalenos	0,010 ± 0,006
1-Etil-3-metilbenceno	0,256 ± 0,031	PAH	0,007 ± 0,001
nC9	0,001 ± 0,001	nC15 – nC23	0,027 ± 0,016
		Desconocidos	0,068 ± 0,003
		Total	3,436 ± 0,018

Los valores representan la media de 3 replicas ± 1 SD.

C4 Alquibencenos = grupo que contiene: C1 x 4; C2 x 2; C1+ C3 y C1 x 2 + C2 bencenos; C3

Naftalenos = varios C1 x 3; C2 + C1 y C3 naftalenos; PAH: hidrocarburos poliaromáticos.

IV.B.1. Determinación de la dosis letal 50 %

Los organismos no fueron alimentados durante el ensayo, tal como esta estandarizado para bioensayos de toxicidad aguda. Los bioensayos de 96-h permitieron una evaluación de la sensibilidad de los camarones en diferentes estados de desarrollo frente a la WSF. También nos permitieron seleccionar las concentraciones apropiadas de la WSF para realizar los estudios de bioacumulación y biodepuración. Durante el curso de los ensayos de toxicidad, las larvas (L) fueron más sensibles a la exposición de la WSF que los adultos, resultando su mortalidad más temprana (Tabla IV.2). Por lo tanto el valor de dosis letal 50 % (LC50) para 48 y 72 h en adultos fue significativamente mayor que los

valores determinados para L (Figuras IV.2 (A) y (B), Tabla IV.2). De todas maneras, al finalizar el ensayo de LC50, a las 96 h los valores determinados para adultos y L fueron 1,56 mg/l y 1,41 mg/l, respectivamente siendo estos valores no significativamente diferentes entre ellos. No se observó mortalidad en los organismos no expuestos. El rango de temperatura varió entre 20-22 °C, el pH entre 6,6-6,9 y el oxígeno disuelto entre 4,5-5;0 mg/l para todos los experimentos.

Tabla IV.2. Valores de dosis letal 50 % para adultos y larvas de 2-4 días de *M. borellii* expuestos a la WSF durante 96 h.

Tiempo de exposición	Adultos (95% CL)	Larvas (95% CL)	<i>p</i>
LC50, 24 h	>3,4 (*)	2,52 (2,11->3,4)	ND
LC50, 48 h	3,14 (2,23 - >3,40)	1,73 (1,46 - 2,0)	<0,05
LC50, 72 h	2,04 (1,24- 3,24)	1,46 (1,13 - 1,48)	<0,05
LC50, 96 h	1,56 (0,74- 2,61)	1,41 (1,22 - 1,56)	NS

Valores expresados en mg/l. NS: No significativo; ND: no determinable CL: límite de confianza (*) no se observó mortalidad usando 100 % de la WSF en el medio de exposición.

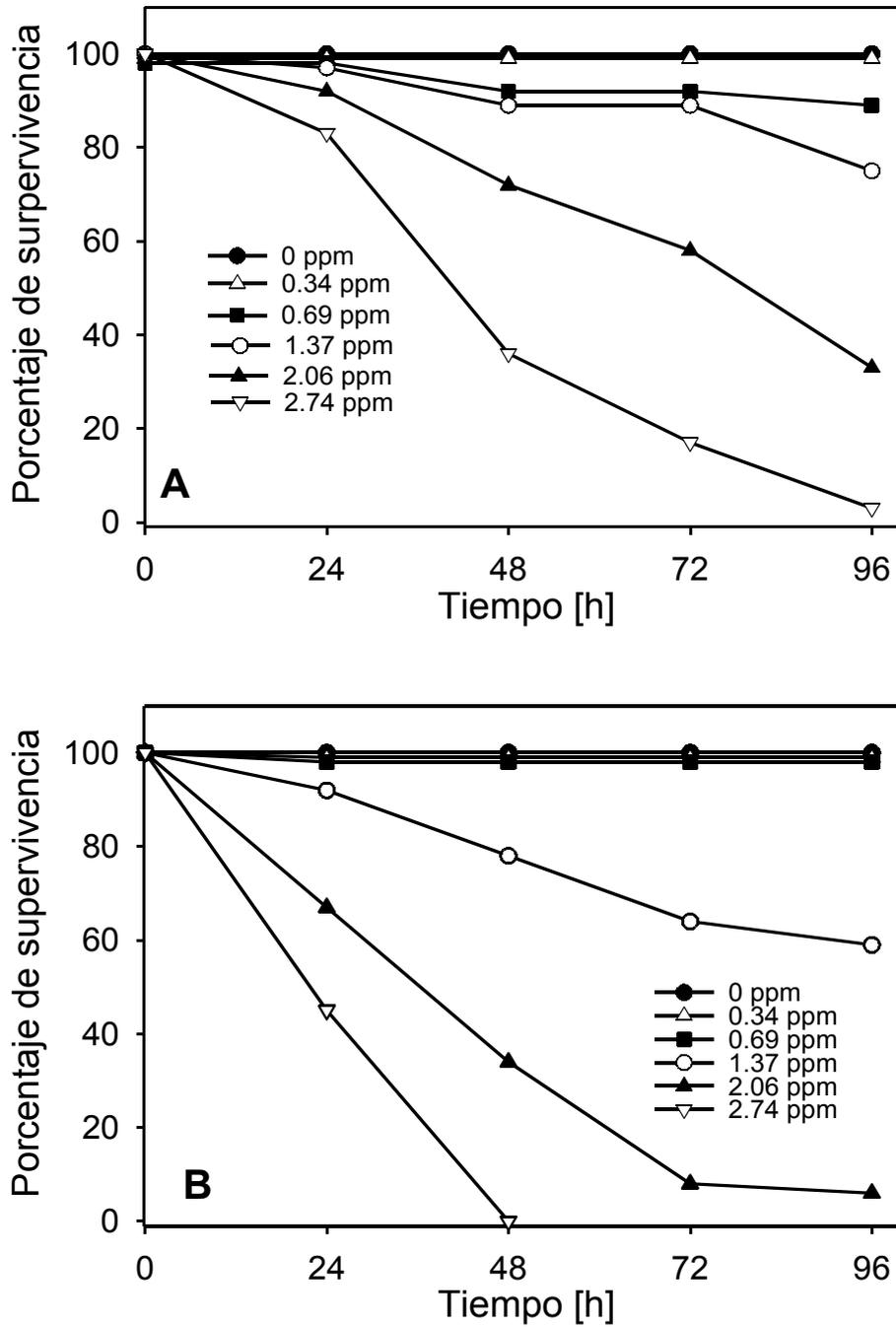


Figura IV.2. Curvas de supervivencia de adultos (A) y larvas (B) expuestos a diferentes concentraciones de WSF.

IV.B.2. Efecto de la exposición crónica de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos sobre el desarrollo

En los ensayos para determinar la LC50 en embriones no se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre los controles y los tratados con WSF, y la mortalidad nunca fue lo suficientemente alta como para permitir calcular la LC50-96 h, por lo tanto esta se estima $> 3,4$ mg/l. De todas maneras, cuando los embriones fueron crónicamente expuestos desde el momento la puesta hasta la eclosión a una concentración de 2,7 mg/l de la WSF, se hizo evidente un incremento significativo de la mortalidad en los embriones expuestos. En estos experimentos, la supervivencia de los embriones hasta la eclosión fue del 77,3 y 46,3 % para los grupos controles y los expuestos respectivamente, y este incremento de la mortalidad fue evidente al acercarse el momento de la eclosión (aproximadamente a partir del estadio 6) (Figura IV.3(A)). También hubo diferencias en el momento de la eclosión ya que mientras que todos los controles de L eclosionaron en los días 42 y 43; el 42% de los embriones tratados con la WSF eclosionaron más tempranamente y en un rango de días más amplio (desde el día 40 al 43) (Figura IV.3 (B)). Una posibilidad para explicar este comportamiento era que la cáscara del huevo (descrita en III.B.2) variara su permeabilidad a la WSF a lo largo del desarrollo. Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos de permeabilidad de la cáscara a sustancias hidrofóbicas en los que se observó que las envolturas embrionarias permitieron el paso del HC fluorescente DPH en los estadios expuestos, y que la intensidad de fluorescencia fue incrementando hacia el momento de la eclosión (Figura IV.4).

También se estudió el desempeño de las L y se observó que la mayoría de las L control sobrevivieron al proceso de eclosión (64,7 %), mientras que solamente el 10,5 % de los tratados fueron capaces de completar este proceso (Figura IV.5). Cuando las L fueron inmediatamente transferidas a agua limpia se observó que el 50 % de las L controles y el 5 % de las tratadas fueron capaces de alcanzar la primera muda. No se pudieron observar diferencias a lo largo del desarrollo en ninguna de las otras variables medidas, incluyendo la morfometría y morfología bajo microscopía óptica. Tampoco se observaron efectos teratogénicos.

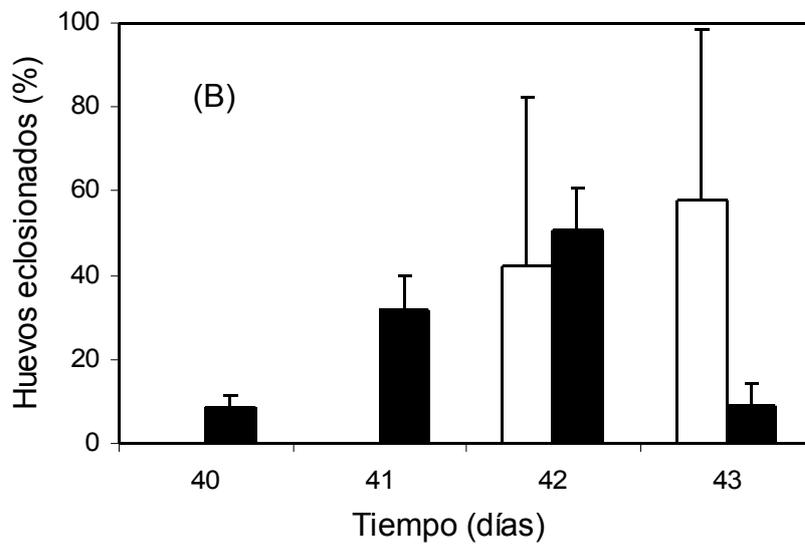
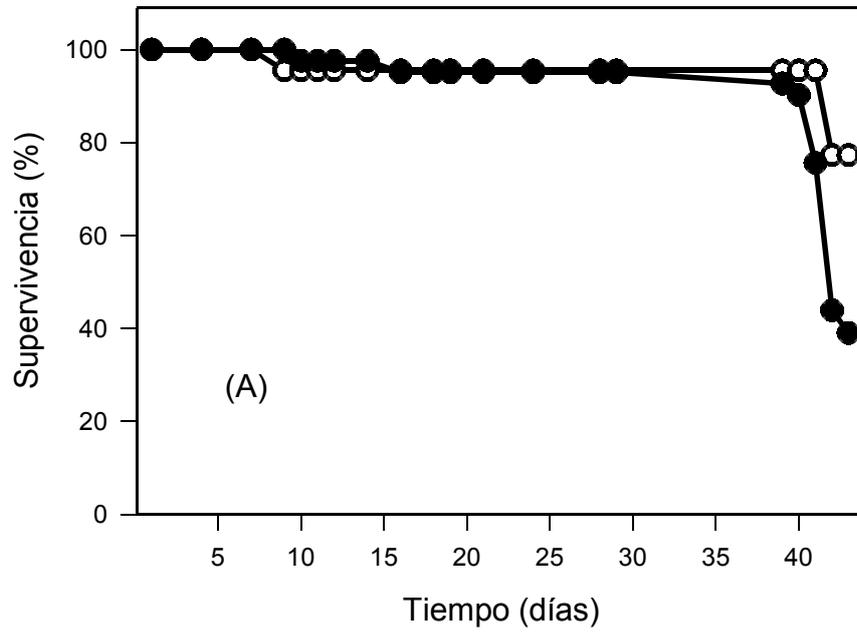


Figura IV.3. Porcentaje de supervivencia de embriones de *M. borellii* a lo largo del desarrollo hasta la eclosión (A), y porcentaje de huevos eclosionados en función del día de eclosión (B). ○ controles ● tratados con WSF.

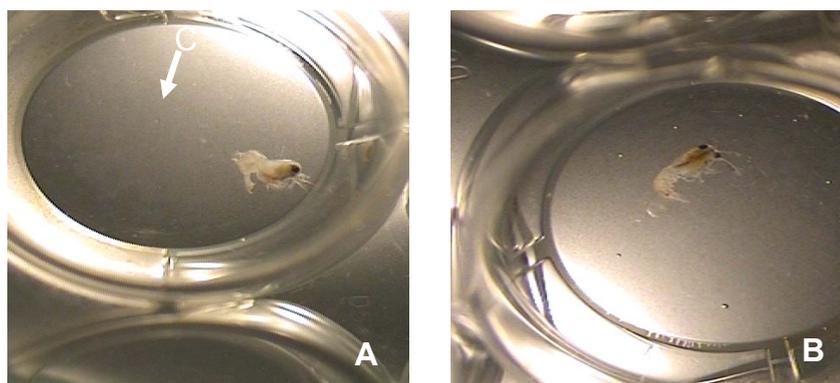


Figura IV.5. Fotografía mostrando una larva recién eclosionada procedente de un huevo expuesto crónicamente a 2,7 mg/l de WSF durante todo el desarrollo (A) y control (B). C: cáscara unida al embrión en la zona del pleon.

IV.B.3. Acumulación y depuración de hidrocarburos en organismos adultos

Se llevó a cabo un experimento piloto para optimizar las condiciones de las exposiciones subletales, donde los camarones adultos fueron expuestos a diferentes concentraciones de la WSF durante 24 h. Se observó que la acumulación fue dosis dependiente aumentando en el rango ensayado (0 – 3,0 mg/l). Cuando la concentración de la WSF en el medio de exposición fue de 0,3 mg/l, el nivel de HC de los tejidos fue 0,9 $\mu\text{g/g}$, con un factor de bioconcentración en base a peso húmedo (FBC) de 3. Basándose en estos resultados y los valores de LC50, adultos de *M. borellii* fueron expuestos a una concentración subletal de 0,3 mg/l por 96 h. No hubo mortalidad durante las 96 h de exposición. Se observó que los HC fueron rápidamente captados desde el medio en las primeras 24 h, luego la mayoría llegó al equilibrio y los niveles de acumulación se mantuvieron durante el resto del período de exposición (Figura IV.6). Luego de 24 h de exposición el rango individual de acumulación fue de 0,05 a 0,37 $\mu\text{g/g}$ de tejido, donde los niveles más altos de concentración observados correspondieron a propilbenceno y otros C3 alquilbencenos, y los mas bajos a los de alto peso molecular (naftalenos y metilnaftalenos). Se observaron también diferencias en las velocidades de acumulación entre los diferentes HC (Tabla IV.3). En general, la acumulación aumentó con el grado de sustitución y el número de anillos aromáticos, lo que se reflejó en el FBC de los metilnaftalenos que fue dos

veces y media mayor que el del monoaromático benceno (Tabla IV.3). El FBC del metilciclohexano fue inusualmente mayor que el de los HC aromáticos con equivalente peso molecular. Como era de esperar, hubo una relación lineal ($r^2= 0,65$) entre el $\log K_{ow}$ y FBD (Figura IV.7). Por otra parte, los organismos mostraron propiedades selectivas con respecto a la acumulación de los HC de bajo peso molecular (Tabla IV.3, factor de discriminación).

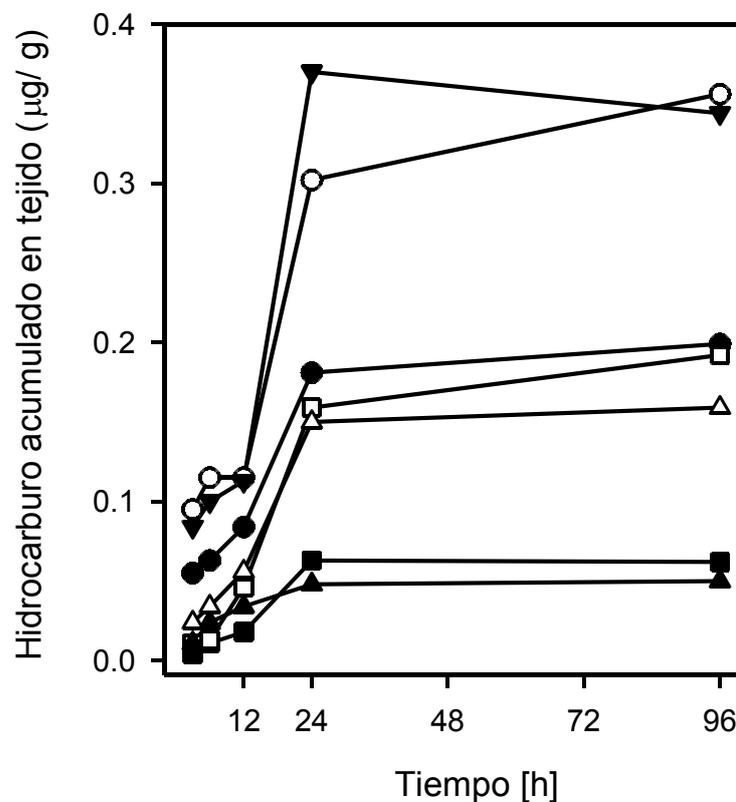


Figura IV.6. Bioacumulación de los hidrocarburos mayoritarios en *M. borellii* expuestos a 0,3 mg/l de la WSF por 96 h.

Concentración de HC/ peso tejido húmedo. ● Benceno; Δ Tolueno; ○ Etilbencenos + Xilenos; ▼ Propilbencenos + C3 Alquilbencenos; □ C4 Alquilbencenos; ▲ Naftaleno; ■ Metilnaftalenos.

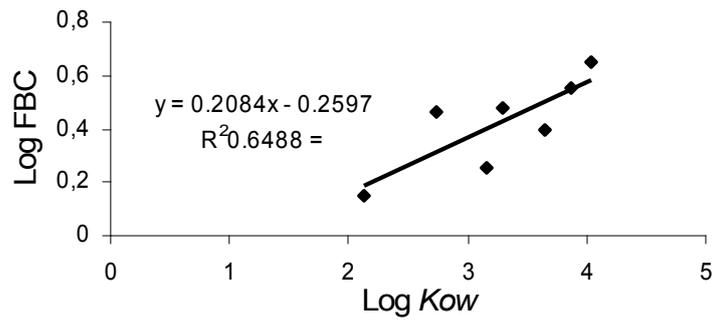


Figura IV.7. Relación entre el log FBC y el log de *Kow* de los HC.

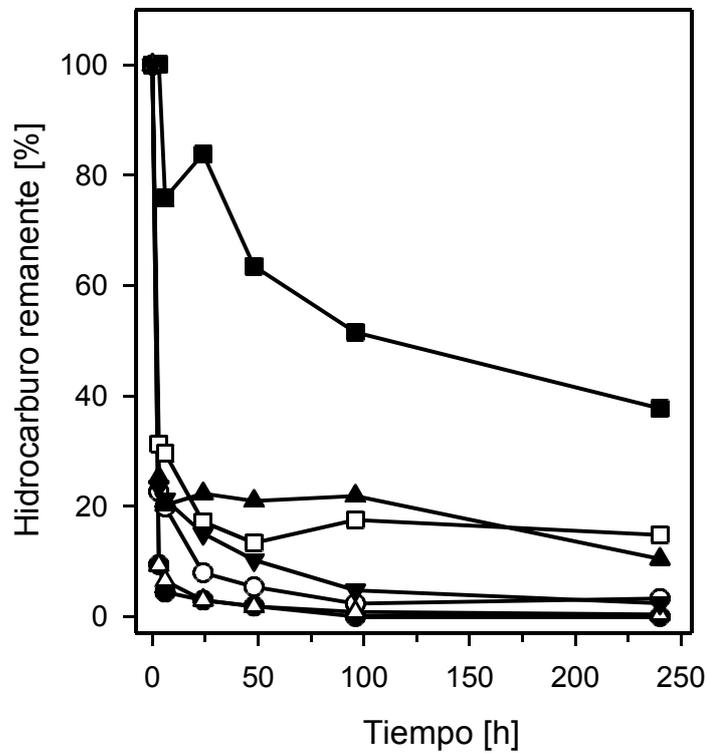


Figura IV.8. Biodepuración de los hidrocarburos mayoritarios durante un período de 10 días en camarones adultos de *M. borellii* expuestos previamente a 0,3 mg/l de la WSF por 4 días.

Para las referencias ver Figura IV.6.

Luego de 96 h de exposición, los camarones fueron transferidos a agua limpia y se monitoreó por 10 días la depuración de los HC de los tejidos. Se observó una cinética bifásica típica de los procesos de transporte que tienen lugar a través de dos compartimientos, donde la acumulación y la eliminación del tóxico del cuerpo ocurre a través de un compartimiento rápido o central. Basándose en este modelo, se calcularon las constantes de velocidad por el método gráfico (Spacie y Hamelink, 1995). Los HC fueron eliminados a diferentes velocidades en dos fases como está reflejado por las constantes de velocidad de eliminación (Figura IV.7, Tabla IV.3). Primero, hubo una fase de eliminación rápida en las primeras 12 h, donde los valores de HC disminuyeron a un 80 % del total acumulado. La segunda fase de depuración, (entre 24 h y 10 días) fue menor. Es interesante notar que luego de 10 días de depuración, los organismos estaban casi “limpios” y presentaban menos de 0,07 $\mu\text{g/g}$ de HC. La vida media de la mayoría de los HC fue menor a 12 h y la depuración de los HC individuales se relacionó con su sustitución de grupos alquilo y el número de anillos aromáticos (Figura IV.7, Tabla IV.3). Benceno y tolueno fueron casi completamente depurados en un día y las velocidades de los HC individuales bajaron mas lentamente con el aumento de la sustitución de los grupos alquilos. La depuración del metilnaftaleno fue muy baja y luego de 10 días, más del 40 % estuvo todavía presente en los tejidos del camarón.

Tabla IV.3. Bioconcentración^(a) de hidrocarburos mayoritarios (FBC), factor de discriminación^(b) (DF) y la razón de las constantes^(c) luego de la exposición de camarones adultos de *M. borellii* a 0,3 mg/l de la WSF por 96 h seguido de 10 días de depuración.

Hidrocarburo	FBC	DF	Log K_{ow}	k_{01}	k_{21}	k_{10}
Benceno	1,4	0,7	2,13	0,2999	-0,1627	-0,0227
Tolueno	2,9	1,4	2,73	0,2552	-0,0946	-0,0102
Etilbenceno + Xilenos	1,8	0,9	3,15	0,3434	-0,0991	-0,0013
Propilbenceno + C3 Alquilbencenos	2,5	1,2	3,45	0,3333	-0,1340	-0,0047
C4 Alquilbencenos	4,5	2,2	4,04	0,1857	-0,1097	-0,0002
Naftaleno	3,0	1,5	3,30	0,2300	-0,1315	-0,0024
Metilnaftalenos	3,6	3,5	3,87	0,1736	-0,0032	-0,0010

(a) Calculado como la razón entre la concentración de HC en el tejido y la concentración de HC en el agua de exposición.

(b) El factor de discriminación fue calculado como la razón entre la concentración de los HC individuales de la concentración de los HC totales en el tejido dividido por la equivalente razón en el agua de exposición.

(c) Cálculos por el método gráfico del modelo de cinética bifásico: k_{01} constante de velocidad de acumulación del HC desde el agua; k_{21} constante de velocidad de eliminación del HC desde el compartimiento lento al rápido; k_{10} constante de velocidad de eliminación del HC desde el compartimiento rápido al medio; todas estas en ng/ g h^{-1} . C3 Alquilbencenos: varios C3; C1 x 3 y C2 + C1 bencenos. C4 Alquilbencenos.

IV.C. Discusión

Toxicidad de la WSF en adultos y larvas

Las respuestas biológicas a la exposición de los HC dependen de las condiciones de la exposición, lo cual hace que generalizaciones y comparaciones entre diferentes laboratorios sea dificultosa (Kühnhold, 1977). Es esencial medir no solo la concentración de la WSF en el agua y el organismo sino también la composición de HC. Para evitar que la WSF cambiara de concentración y composición, tal como se ha visto que ocurre durante el almacenamiento (Heras y col., 1995), la WSF se preparó día por día de manera tal que la WSF nunca fue almacenada por más de 36 h. Los componentes

principales de la WSF fueron los HC aromáticos de menor peso molecular que el naftaleno, especialmente el benceno, tolueno, xilenos y dimetil y trimetil bencenos. La WSF se vio enriquecida en HC aromáticos y con una notable disminución de los alcanos en los HC totales (Tabla IV.1) reflejando su baja solubilidad en el agua (Siron y col., 1987). Las propiedades fisicoquímicas de los HC monoaromáticos los hacen más solubles en agua dulce que en agua de mar (Whipple y col., 1981); por lo tanto se esperaba que el stock de WSF fuera más concentrado que el equivalente de agua salada.

Las L fueron significativamente más sensibles a la WSF que los adultos a tiempos cortos. De echo todas las L murieron luego de exponerlas 48 h a altas concentraciones de la WSF. De todas maneras, los valores de LC50-96 h no fueron significativamente diferentes entre los adultos y las L, coincidiendo con observaciones realizadas en otras especies de invertebrados acuáticos (Rice y col., 1977). Altos valores de LC50-96 h fueron reportados para otros palaemonidae tales como los adultos de *Palaemonetes pugio* (3,5 mg/l) y también para otras familias como las larvas de *Penaeus aztecus* (4,9 mg/l) (Anderson y col., 1974). De todos modos estos resultados fueron obtenidos empleando diferentes petróleos, cantidades y métodos de preparación de WSF, y es sabido que la toxicidad de un petróleo es función del contenido de HC mono-, di- y triaromáticos que a su vez depende de la composición del petróleo original (Kühnhold, 1977). Ensayos realizados en *Mysidopsis bahia* mostraron que los valores de LC50 variaron con la composición del petróleo en un rango entre 0,9 a 1,5 mg/l (Barron y col., 1999). Por esta razón, los valores deben ser cuidadosamente extrapolados para petróleos similares así como tener en cuenta que la forma en que se emplea el petróleo en los experimentos también varía. La composición del medio también afecta la composición final de la WSF, afectando aún más la comparación de los valores de LC50-96 h de WSF preparadas con otros petróleos. La Toxicidad de la WSF sobre *M. borellii* fue también menor que la reportada para larvas de *P. pugio* expuestas a fuel oil N°2, lo cual está de acuerdo con el hecho de que los petróleos refinados tienen mayores cantidades de compuestos aromáticos moderadamente volátiles que son los componentes más tóxicos y persistentes en la WSF. Estos resultados se condicen con los de Hedtke y Puglisi (1982) donde los valores de LC50 de cuatro especies de vertebrados de agua dulce (los peces *Jordanilla floridae* y *Pimephales promelas*, larvas de rana *Rana sylvatica* y larvas de salamandras *Ambystoma maculatum*) mostraron diferencias de acuerdo al tipo de petróleo y a las condiciones experimentales. Comparando estos resultados de LC50 con

las concentraciones del ambiente (Colombo y col., 1989), observamos que estos camarones estarían normalmente expuestos en el ambiente natural a concentraciones subletales. Aunque hay que tener en cuenta que en las semanas siguientes a un derrame de petróleo las concentraciones de HC pueden superar varias veces estos niveles (Gallego y col., 1995; Ritchie y O'Sullivan, 1994). Por último, las diferentes estrategias de vida de los organismos ensayados también pueden afectar la toxicidad. Por ejemplo, *P. pugio*, comparado con *M. borellii*, posee huevos más pequeños eclosionando como larva planctótrofa luego de solo 12 días, y este hecho puede explicar la elevada sensibilidad de las L de *P. pugio* (Fisher y Foss, 1993; Hartman, 1992) comparadas con las de *M. borellii* reflejando la mayor relación superficie/ volumen, y desde aquí la mayor acumulación del contaminante, amén de la fisiología diferente en estas larvas pequeñas y menos desarrolladas.

Toxicidad de la WSF sobre los embriones

Los ensayos se realizaron con embriones que estaban entre los estadios 5-7 ya que ha sido reportado que estos estadios de desarrollo poseen una alta tasa metabólica y el mayor consumo de vitelo (González-Baró y col., 2000; Heras y col., 2000). Por lo tanto era de esperar que fueran más afectados por la WSF debido a que los lípidos son la principal fuente de energía durante el desarrollo. Sin embargo, la supervivencia de los embriones expuestos a la WSF no fue afectada por el contaminante en comparación con los controles. En general se asume que algunos huevos de crustáceos son más tolerantes que otros estadios a la exposición con petróleo (Rice y col., 1977), probablemente debido al efecto protector de la cáscara (Rodríguez y Pisanó, 1993). En otros invertebrados se ha demostrado que la exposición a HC puede provocar un incremento de la actividad de transportadores de membrana (Hamdoum y col., 2002). De todos modos, la exposición crónica de los huevos a la WSF desde la oviposición hasta la eclosión mostró un incremento de la mortalidad en los embriones tratados con la WSF comparado con los controles, especialmente antes o durante el proceso de eclosión. Esto podría ser debido al hecho de que las envolturas embrionarias restringieran la entrada de los químicos hasta los estadios tardíos, como ocurre en *P. pugio* (Rayburn y Fisher, 1997). Para explorar esta hipótesis, se expusieron los huevos a un fluoróforo y el incremento de la fluorescencia que se observó en los últimos estadios parece indicar un aumento en la permeabilidad de la

cáscara hacia el final del desarrollo, permitiendo el mayor ingreso de los hidrocarburos disueltos en el agua, que ejercerían los efectos nocivos sobre el embrión a punto de eclosionar. En este sentido, Glas y col. (1997) también demostraron un rápido incremento de la permeabilidad de las envolturas embrionarias de *P. pugio* 2-3 días antes de la eclosión. *M. borellii* pertenece a la misma familia y podría ser posible que el desarrollo más lento en esta especie ofrezca al embrión la oportunidad de inducir algún mecanismo de protección que altere la permeabilidad de la cáscara. Además, los huevos expuestos crónicamente mostraron una tendencia a eclosionar más temprano que los controles; y por último, la supervivencia de las L expuestas fue 6 veces menor que los controles. Inclusive algunas larvas murieron con la cáscara unida al cuerpo (Figura IV.5), y de este reducido grupo eclosionado, solamente el 5 % de aquellos embriones expuestos sobrevivieron al estrés de la primera muda. En el molusco *Littorina littorea* se observó que la eclosión fue significativamente reducida en individuos recolectados en áreas contaminadas con petróleo. Asimismo, los huevos de estas poblaciones presentaron numerosas anormalidades (Staveland,1979). Resultados similares se obtuvieron al exponer huevos de anfípodos desde estadios muy tempranos con altas concentraciones de WSF; si bien los huevos fueron capaces de completar el desarrollo, la WSF causó una disminución en la tasa de eclosión y la supervivencia de las larvas recién eclosionadas (Lee y Nicol, 1980). Estas observaciones fueron diferentes a las realizadas por Hartman y Sulkin (1999) quienes reportaron que el desarrollo de embriones del cangrejo *Hemigrapsus oregonensis* no fue afectado por la exposición a HC del petróleo sugiriendo también un efecto protector de la cáscara. En el caso de *M. borellii* la exposición a la WSF está afectando sin lugar a dudas de algún modo a los embriones ya que (a) eclosionaron tempranamente, (b) no fueron capaces de sobrevivir por un largo período de tiempo luego de la eclosión, (c) aumentaron su permeabilidad a moléculas hidrofóbicas al final del desarrollo y (d) mostraron importantes alteraciones metabólicas, tal como se describe en los capítulos siguientes.

Acumulación y eliminación de HC

Los HC del petróleo en los crustáceos no tienen una función biológica, por lo que su acumulación en diferentes compartimientos estará solamente determinada por los coeficientes de partición lípido: agua y los procesos de difusión mencionados por Neely y

col. (1974) y no por la selectividad biológica. Por lo tanto, la cinética de bioacumulación y depuración desde los tejidos del camarón está controlada principalmente por las propiedades fisicoquímicas de las células y el flujo de la hemolinfa alrededor de ellas. Las membranas son el principal factor en la partición de los HC (Boryslawskyj y col., 1988) siendo la difusión probablemente el mayor paso limitante que controla la velocidad de acumulación.

Basándose en el valor de LC50, se seleccionó una concentración subletal realista de la WSF y se expusieron los camarones por un corto período de tiempo. La composición de la WSF en los recipientes de exposición se vio reflejada en los HC acumulados por los camarones luego de un día de exposición. El análisis mediante GLC mostró que los HC aromáticos correspondieron a casi el 60 % de los HC totales que fueron bioconcentrados en los camarones luego de 4 días de exposición. La acumulación se produjo en diferentes proporciones, lo cual se reflejó en los valores individuales de los FBC de cada HC, relacionada con las propiedades fisicoquímicas de los compuestos. El nivel máximo de HC aromáticos se observó luego de un día de exposición, indicando una rápida bioacumulación desde el agua, probablemente a través de las branquias. Cuando los camarones retornaron al agua libre de HC, la partición lípido: agua favoreció la liberación gradual de los HC desde dos compartimientos tisulares (uno rico en lípidos y otro pobre en lípidos) hacia el agua. El pool de los HC de bajo peso molecular fue el responsable del rápido descenso observado en las primeras 12 h de depuración (Figura IV.7). Ellos probablemente fueron transportados desde el compartimiento pobre en lípidos por la hemolinfa hacia las branquias o el tegumento para ser excretados, o al HP para ser metabolizados como ocurre en otros invertebrados (Vandermeulen y col., 1980 y Stegeman y Hahn, 1994). El músculo magro del bacalao y los mejillones son compartimientos similares, en los que también se observó la rápida acumulación (minutos-días) y la relativamente acelerada depuración (pocos días) de los HC (Ernst y col., 1987, Ernst y col., 1989) confirmando las características observadas en *M. borellii*. Los compartimientos ricos en lípidos, por otra parte, jugaron un rol importante en la acumulación y en la eliminación a largo plazo de los HC, especialmente de los HC más hidrofóbicos que mostraron una liberación lenta durante la depuración. Probablemente el compartimiento lipídico se convierta en el único sitio de almacenamiento en donde permanecen los HC luego de los cuatro días de depuración.

También se observó que un incremento en el número de anillos aromáticos y las sustituciones en los anillos favoreció la acumulación de los HC individuales, y la disminución de sus constantes de depuración. Adicionalmente hubo una correlación positiva entre los FBC y los K_{ow} de los compuestos, indicando que los factores de bioconcentración basados en la lipofilidad se incrementan con la hidrofobicidad y que el K_{ow} es un buen parámetro descriptivo de la bioconcentración, tal como fue observado también en otros organismos acuáticos (Baussant y col., 2001; Landrum, 1988; Geyer y col., 1991). La acumulación selectiva de HC es el resultado del efecto combinado del metabolismo de detoxificación y de la difusión individual de los HC de acuerdo a su solubilidad en el agua. Resultados similares fueron reportados por Neff y col. (1976) quienes observaron que los FBC aumentaron proporcionalmente al peso molecular de los PAH en los organismos estudiados. Además observaron que durante el proceso de depuración, los PAH fueron eliminados rápidamente y que la velocidad de depuración de los HC fue especie-dependiente. El sistema del citocromo P-450 oxida los HC a productos más polares que son fácilmente excretados por las branquias. La detoxificación comenzaría en cuanto el sistema es inducido (Stegeman y Hahn, 1994) y continuaría mientras haya HC presentes. Este proceso actuaría primero sobre los HC de menor peso molecular y ayudaría a aumentar la discriminación hacia los de mayor peso molecular.

La depuración de los HC es usualmente más lenta que la de otros xenobióticos y está relacionada con el contenido de grupos funcionales; de todas maneras los crustáceos generalmente metabolizan los HC más rápido que otros invertebrados tales como los moluscos (Livingstone, 1998). Algunos PAH como el metilnaftaleno, estuvieron todavía presentes en los camarones aun después de 10 días de permanecer estos en agua libre de HC. Resultados similares fueron observados en moluscos y peces (Baussant y col., 2001). Generalmente, en bioensayos agudos los PAH parecen ser más tóxicos y más persistentes en los tejidos que los HC monoaromáticos (Whipple y col., 1981). El efecto del tamaño molecular de los HC aromáticos (incremento en el número de anillos o sustituciones en los anillos aromáticos) es sabido que incrementa la toxicidad (Thomas y Rice, 1981). La acumulación y retención de los compuestos originales y metabolitos por el salmón también se incrementa en este sentido (Zhou y col., 1996).

De este estudio se concluye que los camarones adultos tienen una rápida acumulación y depuración de los HC contenidos en la WSF, y este proceso probablemente esté relacionado con su bajo contenido en lípidos. El incremento en el

número de anillos aromáticos y sustituciones en los anillos favorecieron la bioacumulación de los HC individuales, y la disminución de sus velocidades de depuración. Los estadios de desarrollo temprano de *M. borellii* no son muy vulnerables a la WSF, mientras que la menor sensibilidad de las L y huevos comparado con otros crustáceos, posiblemente esté relacionada con su estrategia de desarrollo. El desarrollo abreviado de esta especie tiene la ventaja de: (a) incrementar la razón entre el volumen y la superficie, tanto en las L como en los huevos (disminuyendo la permeabilidad) y (b) aumentar probablemente el período de protección dentro de la cáscara. Posiblemente esta estrategia haya facilitado la colonización del ambiente de agua dulce disminuyendo el estrés osmótico (Anger, 1995), y esto en forma secundaria haya ayudado a estas especies a hacer frente a los contaminantes. De todos modos es necesario realizar estudios comparativos para evaluar estas posibilidades.

Capítulo V

Efecto de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos sobre la composición y el catabolismo lipídico de camarones adultos y embriones

V.A. Introducción

Las alteraciones a nivel bioquímico provocadas por hidrocarburos antropogénicos en organismos acuáticos incluyendo crustáceos, se pueden reflejar en cambios en la composición y en los procesos energéticos que a largo plazo pueden desencadenar trastornos en el crecimiento y la reproducción (Capuzzo y col., 1984; Lee y col., 1981). En este sentido, las medidas específicas de respuestas biológicas subletales en especies indicadoras sensibles (biomarcadores) son particularmente valiosas para monitorear exposiciones a estos contaminantes (Reid y MacFarlane, 2003). Se ha observado que las respuestas enzimáticas son buenos biomarcadores para detectar efectos de concentraciones subletales de tóxicos sobre el metabolismo de los organismos indicadores (De Coen y Janssen, 1997). Si bien Chambers y col. (1978 y 1979) evaluaron el efecto del petróleo sobre las actividades de enzimas del tipo oxidoreductasas, hidrolasas, transaminasas y peptidasas en el camarón *Penaeus sp.*, no existían antecedentes de estudios del mismo tipo en enzimas involucradas en el metabolismo lipídico, siendo los lípidos el principal grupo molecular con un claro rol energético. Por estas razones se decidió focalizar los estudios en esta ruta, y en particular, en los procesos implicados en la obtención de energía. Debido a que los organismos suelen presentar diferente sensibilidad a los tóxicos de acuerdo al estadio del ciclo vital (Rice y col., 1977), los estudios se realizaron tanto en organismos adultos como en embriones.

V.B. Resultados

V.B.1. Composición de lípidos

V.B.1.a. Composición cuali-cuantitativa de lípidos

La Tabla V.1 muestra los valores del contenido de lípidos totales tanto en organismos controles como tratados luego de 21 días de exposición a 0,6 mg/l de la WSF. Los análisis del contenido de lípidos en animales enteros muestran una disminución significativa de la cantidad de lípidos totales del organismo entero de un 15,2 % mientras que, en otros ensayos de exposición, en hepatopáncreas (peso promedio/camarón 25 mg)

solo se observó una tendencia al aumento en los camarones expuestos. Dichas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas. En músculo (peso promedio/camarón 390 mg) y en huevos (peso promedio/huevo: 2 mg) tampoco se observaron diferencias entre organismos expuestos y controles (Tabla V.1).

Tabla V.1. Contenido de lípidos totales en camarones y huevos controles y expuestos a 0,6 mg/l de WSF.

	Control	WSF	<i>p</i>
Organismo completo	11,2 ± 0,5	9,5 ± 0,2	<0,05
Hepatopáncreas	22,9 ± 2,8	28,7 ± 4,2	NS
Músculo	8,5 ± 0,04	8,51 ± 0,1	NS
Huevos	83,0 ± 5,1	83,7 ± 12,3	NS

Valores expresados como mg/g tejido húmedo ± 1 SD, N= 3. NS: no significativo

Los ensayos de exposición de los adultos se realizaron bajo condiciones de ayuno (Tabla V.1) o con alimentación. En estos últimos, los camarones fueron alimentados *ad libitum* con alimento elaborado (no vivo) lo cual facilitó la libre disponibilidad de alimento. Se observó que los organismos expuestos presentaban un comportamiento más aletargado, pero pese a ello no se detectó una disminución en la ingesta. Los valores de contenido de lípidos totales en los camarones alimentados fueron en hepatopáncreas de 27,5 ± 3,3 y 28,1 ± 3,4 mg/g de tejido húmedo en controles y expuestos a 0,6 mg/l de WSF, y en el tejido muscular de 9,2 ± 1,1 y 8,5 ± 1,0 mg/g de tejido húmedo en controles y expuestos respectivamente, siendo en ambos las diferencias no significativas ($p > 0,05$).

Cuando se analizaron las clases de lípidos en tejidos de animales adultos controles, se observó tanto en HP como en músculo, que la clase de lípido mayoritaria fue la fosfatidilcolina (PC) seguida de colesterol (COL) y fosfatidiletanolamina (PE) (Tabla V.2). En huevos en estadio 6, que fue el estadio en que se encontraban los huevos al finalizar el ensayo, la clase predominante fue la de los triacilgliceroles (TAG) seguidos de PC. Al comparar los organismos controles con los expuestos a la WSF, se observó una disminución significativa del porcentaje de PC y astaxantina (ASX) y un aumento significativo en esfingomielina (SM) en HP. Sin embargo, considerando la masa, la variación solo fue significativa en la clase ASX (Tabla V.2). En músculo solo se observó un cambio significativo en esta última clase que comprende los pigmentos. Los huevos

mostraron un cambio significativo del porcentaje de los lípidos mayoritarios, evidenciando una disminución de los lípidos de reserva energética y un aumento de los fosfolípidos (PL): PC y PE, si bien la clase que varió significativamente la masa fue sólo la PC. El cociente de las masas PL/ TAG disminuyó de 19,02 a 7,70 en HP debido especialmente a la disminución de PL, mientras que en huevos el cociente aumentó de 0,40 a 0,65 reflejando tanto un incremento de PL como una disminución de TAG.

Tabla V.2. Clases de lípidos en tejidos de camarones adultos y huevos de *M. borellii* en controles y expuestos a 0,6 mg/l de WSF.

Clases de Lípidos	Músculo		Hepatopáncreas		Huevo	
	Control	WSF	Control	WSF	Control	WSF
EC %	Tr	Tr	0,67 ± 0,38	0,33 ± 0,16	Tr	Tr
µg/mg	Tr	Tr	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,02	Tr	Tr
TAG %	Tr	Tr	4,29 ± 1,69	7,20 ± 4,8	69,45 ± 1,99	61,76 ± 2,8*
µg/mg	Tr	Tr	0,48 ± 0,22	1,01 ± 0,65	57,87 ± 3,27	51,51 ± 5,27
COL %	30,09 ± 0,62	28,69 ± 1,01	14,43 ± 2,01	11,95 ± 5,35	1,74 ± 0,75	1,35 ± 0,25
µg/mg	2,57 ± 0,05	2,44 ± 0,09	1,61 ± 0,12	1,17 ± 0,3	1,43 ± 0,50	1,13 ± 0,13
PE %	15,58 ± 0,58	16,79 ± 1,51	9,86 ± 2,76	10,13 ± 2,62	3,25 ± 0,22	4,61 ± 0,26**
µg/mg	1,33 ± 0,05	1,43 ± 0,13	1,38 ± 0,33	1,11 ± 0,08	2,70 ± 0,05	3,84 ± 0,35**
PC %	45,73 ± 0,50	44,35 ± 3,20	62,1 ± 2,15	53,29 ± 4,04*	23,84 ± 2,35	30,66 ± 3,19*
µg/mg	3,91 ± 0,05	3,77 ± 0,27	7,43 ± 0,46	6,03 ± 1,05	19,98 ± 3,66	25,85 ± 6,45
SM %	6,18 ± 0,83	5,89 ± 0,28	2,84 ± 0,27	5,57 ± 1,68*	Tr	Tr
µg/mg	0,53 ± 0,07	0,50 ± 0,03	0,32 ± 0,07	0,63 ± 0,29	Tr	Tr
AXT %	2,43 ± 0,25	4,28 ± 0,6**	6,16 ± 0,69	4,54 ± 0,68*	1,54 ± 0,36	1,62 ± 0,08
µg/mg	0,21 ± 0,02	0,36 ± 0,05**	0,80 ± 0,01	0,47 ± 0,06**	1,30 ± 0,41	1,35 ± 0,13

Valores expresados como % p/p ± 1 SD; N= 3 *p< 0,05; **p< 0,01. Tr: trazas.

µg/mg: µg de lípido/ mg tejido (p. húmedo). EC: ésteres de colesterol, para el resto de las referencias consultar el texto.

V.B.1.b. Composición cuali-cuantitativa de ácidos grasos

La Tabla V.3 muestra el perfil de ácidos grasos (AG) de los lípidos totales extraídos de músculo, HP y huevos. Al analizar la composición relativa de los AG en tejidos controles, se observó que los ácidos eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y oleico (18:1 n-

9) fueron los mayoritarios en HP con más del 13 %, mientras que en músculo el EPA representa más del 18 %. En huevos controles los principales AG fueron el oleico y el palmítico (16:0). La composición de AG no fue notoriamente afectada por la WSF. Se observó un incremento significativo del ácido palmitoleico (16:1n-7) en HP y músculo de camarones adultos mientras que hubo una disminución significativa del ácido palmítico en huevos y músculo (Tabla V.3).

Tabla V.3. Composición de los principales ácidos grasos de lípidos totales en tejidos de camarón adulto y huevos de *M. borellii* en controles y expuestos a 0,6 mg/l de WSF.

Ácidos Grasos	Músculo		Hepatopáncreas		Huevos	
	Control	WSF	Control	WSF	Control	WSF
14:0	1,39 ± 0,06	1,42 ± 0,06	1,34 ± 0,12	1,86 ± 0,6	2,24 ± 0,11	1,99 ± 0,04*
16:0	14,83 ± 0,20	14,09 ± 0,06**	8,60 ± 0,46	9,69 ± 0,60	16,02 ± 0,17	15,45 ± 0,16*
18:0	5,81 ± 0,10	5,56 ± 0,26	5,88 ± 1,79	6,11 ± 0,64	4,18 ± 0,32	4,20 ± 0,12
16:1 n-7	3,82 ± 0,12	4,26 ± 0,12*	6,96 ± 0,27	7,75 ± 0,31*	11,09 ± 0,13	11,33 ± 0,86
18:1 n-9	8,63 ± 0,11	8,37 ± 0,10	13,75 ± 0,70	16,12 ± 2,78	16,91 ± 2,49	18,87 ± 1,76
18:1 n-7	6,43 ± 0,19	6,50 ± 0,11	10,11 ± 1,08	10,71 ± 1,03	8,94 ± 0,48	9,32 ± 0,42
18:2 n-6	3,71 ± 0,58	3,36 ± 0,48	5,11 ± 0,93	6,94 ± 2,92	9,28 ± 0,75	8,07 ± 0,89
16:3 n-4	2,52 ± 0,26	1,75 ± 0,23**	2,08 ± 0,78	1,42 ± 0,72	0,66 ± 0,04	0,87 ± 0,14
18:3 n-3	1,93 ± 0,26	1,92 ± 0,31	2,26 ± 0,66	2,28 ± 0,64	3,19 ± 0,21	3,38 ± 0,27
20:4 n-6	14,52 ± 0,46	14,46 ± 0,59	11,42 ± 0,32	8,81 ± 3,19	9,28 ± 0,75	8,07 ± 0,89
20:5 n-3	18,26 ± 0,29	18,31 ± 0,39	13,79 ± 0,39	12,00 ± 4,41	3,19 ± 0,75	3,38 ± 0,33
22:6 n-3	4,98 ± 0,10	4,89 ± 0,20	3,55 ± 0,24	3,28 ± 0,82	4,64 ± 0,81	4,89 ± 0,38
Σ Saturados	22,03 ± 0,35	21,07 ± 0,38	15,81 ± 2,36	17,66 ± 1,84	22,44 ± 0,60	21,64 ± 0,32
Σ Monoinsaturados	18,88 ± 0,41	19,12 ± 0,32	30,83 ± 2,06	34,59 ± 4,12	36,94 ± 3,10	39,52 ± 3,05
Σ Polinosaturados	45,91 ± 1,93	44,68 ± 2,19	38,21 ± 3,31	34,72 ± 12,7	28,8 ± 3,04	27,0 ± 2,30

Valores expresados como % p/p ± 1 SD, N= 3 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Como se observaron diferencias significativas en los PL de HP y huevos, se analizó la composición de AG de esa fracción. Se observó en HP que el AG mayoritario fue el EPA llegando a más del 20 % seguido de los AG araquidónico y oleico. En los PL de los huevos el EPA también resultó ser el predominante seguido de los AG saturados 16:0 y 18:0 y el oleico. La WSF solo afectó significativamente al contenido en ácido oleico del HP (Tabla V.4).

Tabla V.4. Composición de los principales ácidos grasos de lípidos polares en hepatopáncreas y huevos de *M. borellii* en controles y expuestos a 0,6 mg/l de WSF.

Ácidos grasos	Hepatopáncreas		Huevos	
	Control	WSF	Control	WSF
14:0	0,68 ± 0,10	0,74 ± 0,02	1,23 ± 0,29	1,55 ± 0,15
16:0	8,56 ± 0,86	7,91 ± 0,51	14,90 ± 1,64	15,61 ± 1,17
18:0	8,92 ± 0,54	9,15 ± 1,91	13,02 ± 2,42	12,88 ± 0,17
16:1 n-7	5,22 ± 0,76	5,35 ± 0,39	4,85 ± 0,38	5,57 ± 1,02
18:1 n-9	14,12 ± 2,16	18,46 ± 0,51*	13,89 ± 2,35	12,73 ± 1,55
18:1 n-7	10,06 ± 1,99	7,35 ± 2,15	5,69 ± 1,40	6,69 ± 2,21
18:2 n-6	6,18 ± 0,95	5,32 ± 0,68	6,80 ± 1,73	5,82 ± 1,02
18:3 n-6	0,05 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,25 ± 0,36	0,02 ± 0,03
18:3 n-3	1,48 ± 0,13	1,10 ± 0,04*	3,59 ± 1,41	2,78 ± 0,51
20:3 n-6	Tr	Tr	0,12 ± 0,15	0,11 ± 0,01
20:4 n-6	15,25 ± 0,60	14,46 ± 1,01	8,68 ± 0,91	9,13 ± 1,45
20:5 n-3	20,20 ± 1,47	21,25 ± 0,81	17,80 ± 3,23	16,02 ± 1,34
22:2 n-6	Tr	Tr	0,40 ± 0,06	0,02 ± 0,03
22:6 n-3	6,11 ± 1,27	6,27 ± 1,48	4,23 ± 1,12	6,87 ± 1,30
Σ Saturados	18,15 ± 0,84	17,84 ± 1,87	29,47 ± 4,41	28,34 ± 2,52
Σ Monoinsaturados	29,42 ± 1,38	31,45 ± 3,13	23,58 ± 2,21	24,90 ± 0,68
Σ Polinosaturados	51,59 ± 1,07	50,71 ± 1,17	46,95 ± 1,80	46,76 ± 2,30

Valores expresados como % p/p ± 1 SD, N= 3 * $p < 0,05$

Tr: trazas

V.B.2. Catabolismo lipídico

V.B.2.a. Caracterización y actividad de Palmitoil-CoA ligasa mitocondrial

Las Figuras V.1 y V.2 muestran las curvas de proteínas y tiempo para la síntesis de palmitoil-CoA en hepatopáncreas de camarones adultos y embriones en estadio 5. Se seleccionó el estadio 5 de desarrollo porque en este período hay una elevada actividad de las enzimas del metabolismo lipídico coincidiendo con una etapa de activa organogénesis (González-Baró y col., 2000). Se observó que la actividad de la palmitoil-CoA ligasa fue proporcionalmente lineal a la cantidad de proteína mitocondrial agregada hasta por lo menos 200 µg/ml en hepatopáncreas y 160 µg/ml en embriones (Figura V.1). Por lo tanto

se seleccionó el valor 120 $\mu\text{g/ml}$ de concentración de proteínas para la mezcla de reacción utilizada en los ensayos enzimáticos.

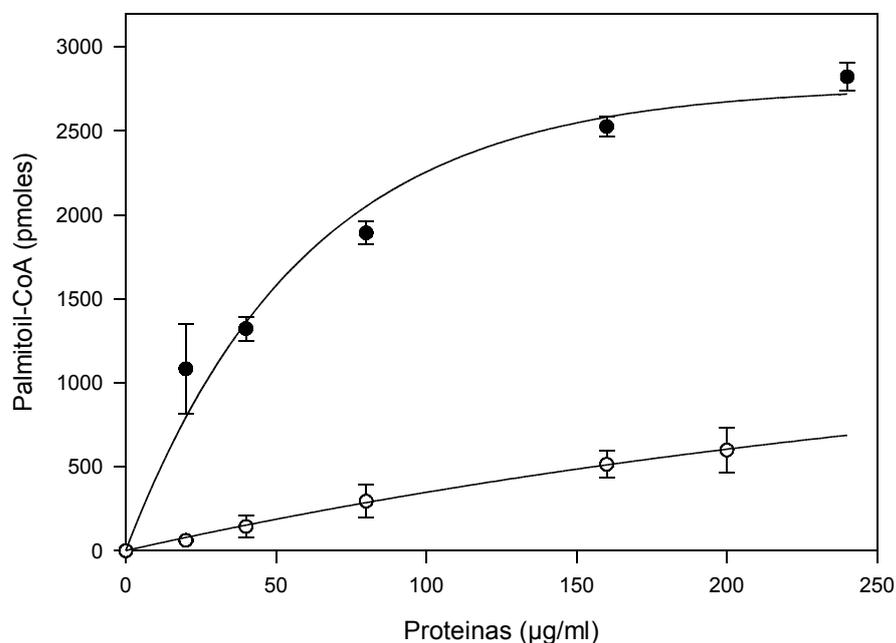


Figura V.1. Efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad de la palmitoil-CoA ligasa mitocondrial en HP de camarones adultos y huevos de *M. borellii*. (●) huevos, (○) HP.

Con respecto al tiempo de incubación, el incremento de la síntesis de palmitoil-CoA mostró linealidad hasta 20 min en el caso de los huevos (3382 pmoles) mientras que en el HP la linealidad se conservó hasta los 10 min (1987 pmoles) (Figura V.2); por lo tanto se seleccionó como tiempo de incubación para los ensayos este último valor.

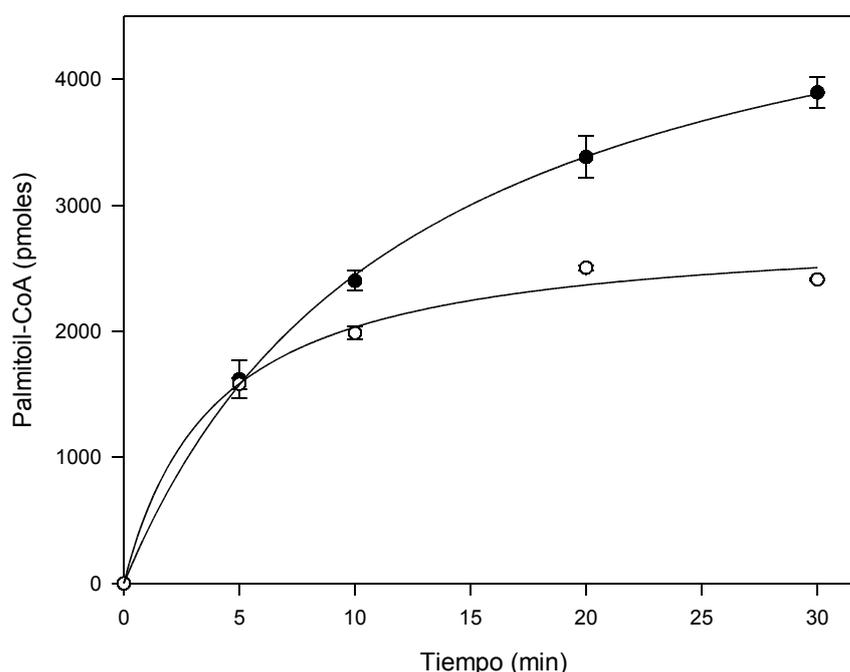


Figura V.2. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la palmitoil-CoA ligasa mitocondrial en HP de camarones adultos y huevos de *M. borellii*. (●) huevos, (○) HP.

La influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática se muestra en la Figura V.3, donde se observa que la actividad específica aumenta rápidamente hasta 32°C (1120 pmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína) con una tendencia al decaimiento a mayores temperaturas.

En los ensayos del efecto del pH sobre la actividad enzimática se observó un aumento progresivo hasta pH 8 (Figura V.4), valor límite de la capacidad buffer de la solución de MOPS empleada.

También se estudiaron los parámetros cinéticos de la palmitoil-CoA ligasa donde se evaluó el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción de esta enzima y se observó que presenta un comportamiento con una cinética de Michaelis-Menten. A partir de la representación de Lineweaver-Burk (Figura V.5) se calcularon las constantes aparentes K_m y velocidad máxima (V_{max}). Para los bioensayos posteriores se eligió una concentración de sustrato (16:0) adecuada y que no interfiriera con la estabilidad de las membranas por su acción detergente.

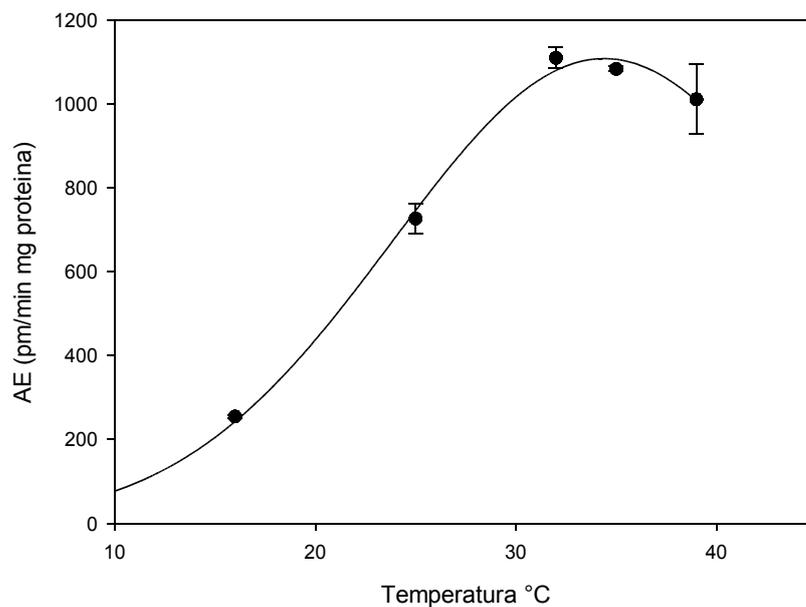


Figura V.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la palmitoil-CoA ligasa mitocondrial en HP de camarones adultos de *M. borellii*.

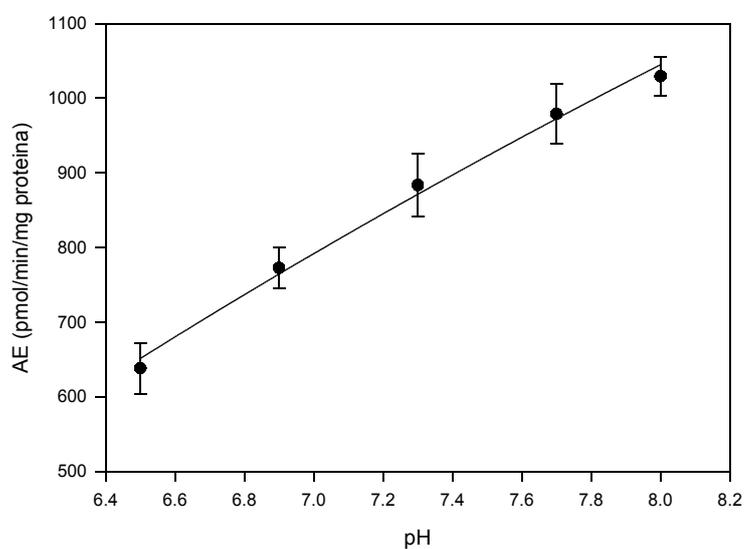


Figura V.4. Efecto del pH sobre la actividad de la palmitoil-CoA ligasa mitocondrial en HP de camarones adultos de *M. borellii*.

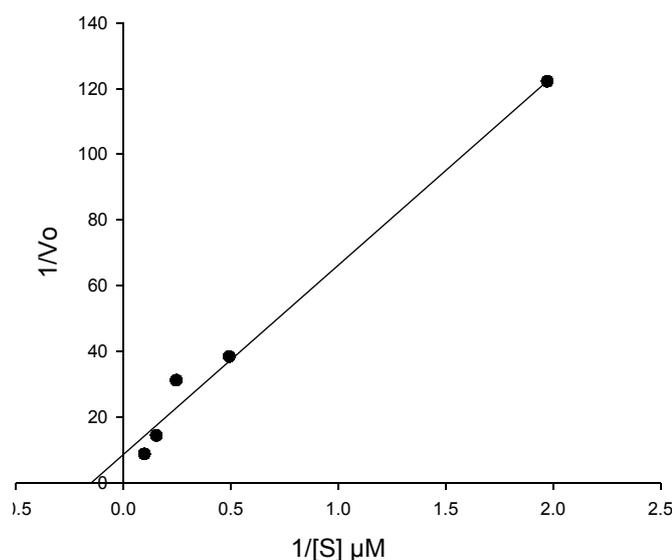


Figura V.5. Representación de Lineweaver- Burk del efecto de la concentración de ácido palmítico sobre la actividad de la palmitoil-CoA ligasa mitocondrial en HP de camarones adultos de *M. borellii*. V_0 : velocidad inicial

Una vez establecidas las condiciones para medir la actividad de palmitoil-CoA ligasa mitocondrial, se realizaron los bioensayos en camarones adultos y embriones para evaluar en diferentes etapas del desarrollo, el efecto de la WSF sobre el catabolismo lipídico.

La activación del ácido palmítico por parte de la ligasa mitocondrial solo se incrementó en hepatopáncreas de adultos y embriones en estadio 5 expuestos a la WSF, mientras que los embriones en estadio 4 no presentaron diferencias significativas como se muestra en la Figura V.6. Cabe recordar que los embriones que se expusieron en estadio 4 y 5, al término de la semana de exposición avanzaron a los estadios 5 y 6, respectivamente.

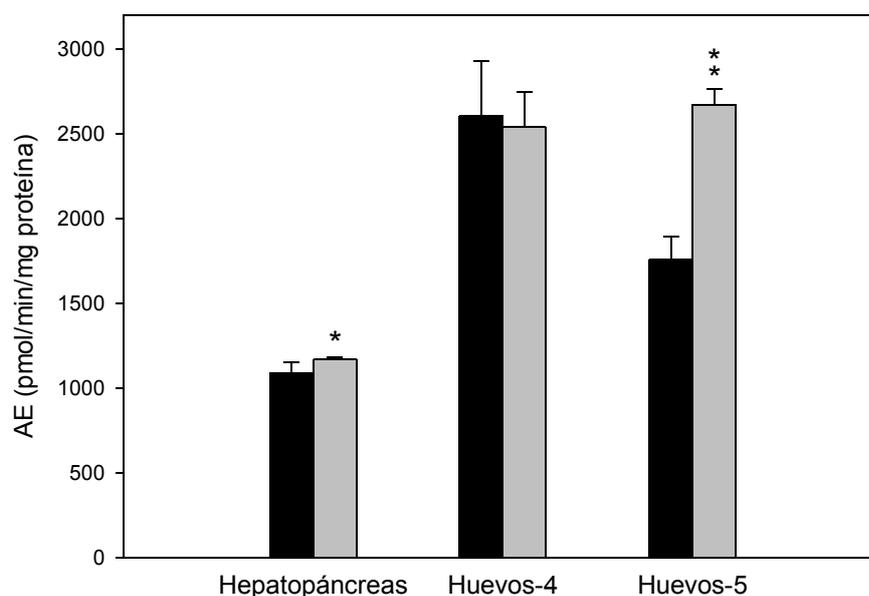


Figura V.6. Efecto de la WSF sobre la actividad palmitoil-CoA ligasa mitocondrial en HP de camarones adultos y huevos de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l.

■ Control; □ expuestos a la WSF. Los valores representan la media de 3 determinaciones \pm 1 SD. * significativo ($p < 0,05$) ** muy significativo ($p < 0,001$) Huevos-4: huevos con embriones en estadio 4.; Huevos-5: huevos con embriones en estadio 5.

V.B.2.b. Actividad triacilglicerol lipasa

Antes de comenzar con los bioensayos se optimizaron las condiciones para medir actividad lipasa. Se midió la actividad lipasa solo en citosol ya que como se ha reportado para estos camarones, es la única fracción celular en que se observó actividad (González-Baró y col., 2000). Las Figuras V.7 y V.8 muestran las curvas correspondientes a actividades en función de la concentración de proteínas y tiempo de incubación respectivamente. De acuerdo a los valores obtenidos se fijaron las condiciones óptimas de ensayo en 6 h de incubación y 2 mg/ml de proteína citosólica.

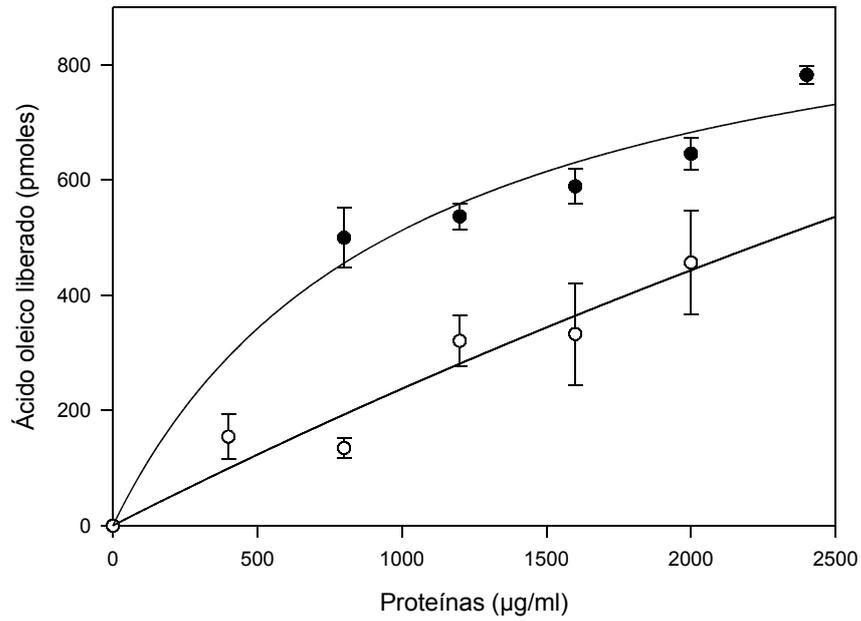


Figura V.7. Efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad de la triacilglicerol lipasa en HP de camarones adultos y huevos de *M. borellii*. (●) huevos, (○) HP.

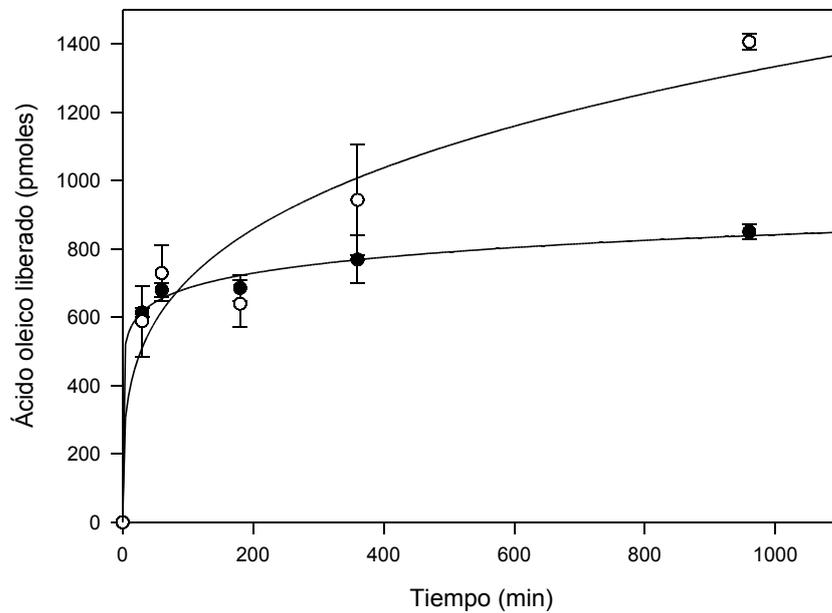


Figura V.8. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la triacilglicerol lipasa en HP de camarones adultos y huevos de *M. borellii*. (●) huevos, (○) HP.

Luego de exponer los organismos a 0,6 mg/l de la WSF durante 7 días se observó que esta afectó la actividad lipasa en todos los estadios ensayados, siendo el aumento particularmente significativo en los embriones en estadio 5 donde se observó un incremento del 154 % de la actividad (Figura V.9).

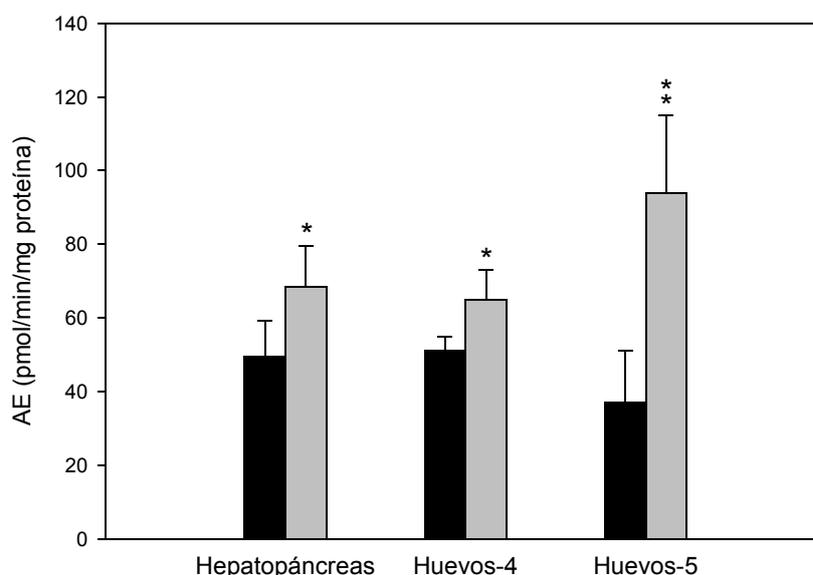


Figura V.9. Efecto de la WSF sobre la actividad lipasa en HP de camarones adultos y huevos de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l.

■ Control; ■ expuestos a la WSF. Los valores representan la media de 3 determinaciones \pm 1 SD. * significativo ($p < 0,05$) ** muy significativo ($p < 0,001$)

V.B.2.c. Sistema de β -oxidación

Se realizaron en primer lugar curvas de tiempo de incubación y concentración de proteínas para evaluar el efecto de estos parámetros sobre la actividad del sistema enzimático de β -oxidación (Figuras V.10 y V.11). De acuerdo a los valores obtenidos se seleccionaron los tiempos de incubación y la cantidad de proteínas en 20 min y 120 μ g de proteína mitocondrial en hepatopáncreas y 160 μ g en huevo para estos ensayos.

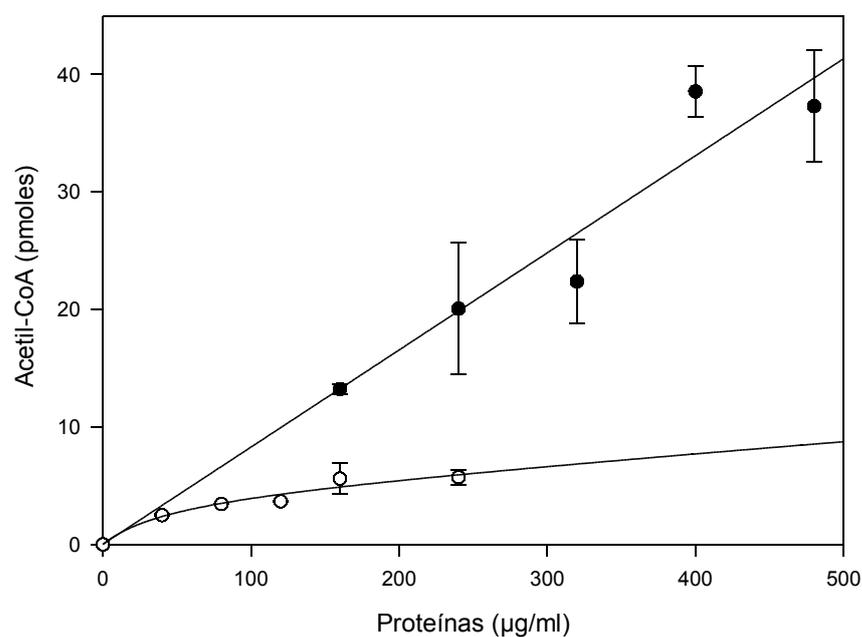


Figura V.10. Efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad de β -oxidación en HP de camarones adultos y huevos de *M. borellii*. (●) huevos, (○) HP.

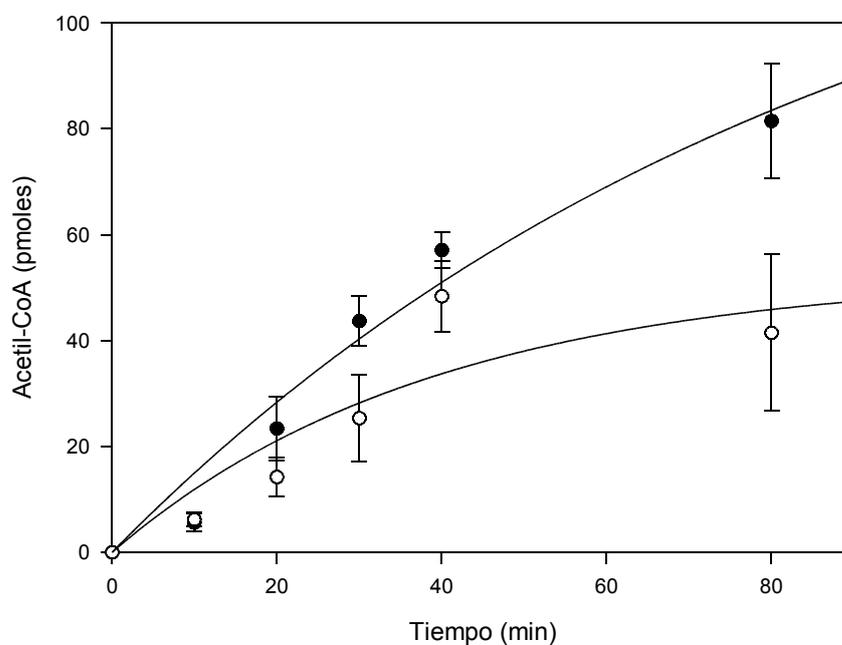


Figura V.11. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de β -oxidación en HP de camarones adultos y huevos de *M. borellii*. (●) huevos, (○) HP.

La exposición a la WSF afectó significativamente la actividad del sistema de β -oxidación de AG. Los organismos más afectados fueron los camarones adultos y embriones muy desarrollados mientras que los embriones en estadio 4 no presentaron cambios significativos (Figura V.12).

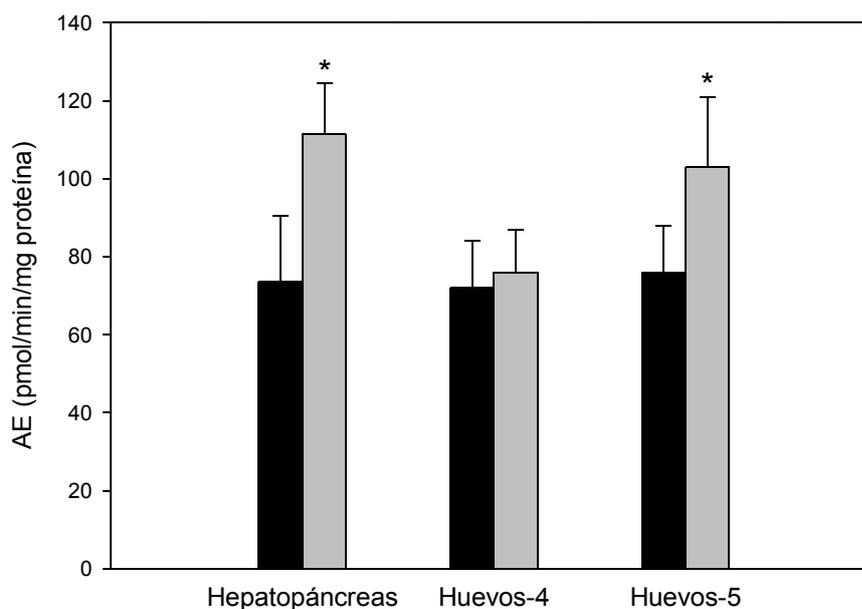


Figura V.12. Efecto de la WSF sobre la actividad de la β -oxidación en HP de camarones adultos y huevos de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l. Control; expuestos a la WSF. Los valores representan la media de 3 determinaciones \pm 1 SD. * significativo ($p < 0,05$)

V.C. Discusión

Efecto de la WSF sobre la composición lipídica y el contenido lipídico total

Luego de 15 días de exposición, se evaluó el efecto de la WSF sobre el contenido lipídico, las clases de lípidos y la composición de AG en tejidos de adultos y embriones de *M. borellii*. Podría pensarse que la ligera disminución de los lípidos totales en camarones

adultos expuestos a la WSF coincidentemente se deba a la necesidad energética provocada por la situación de estrés del contaminante. Wang y Stickle (1988) estudiando el cangrejo *Callinectes sapidus* observaron una disminución en el contenido de lípidos totales luego de 15 días de exposición con petróleo crudo, donde los lípidos estructurales fueron menos afectados que los energéticos (TAG). De todas maneras, cuando se determinaron los lípidos totales en HP y huevos de *M. borellii* no se observaron diferencias entre los organismos controles y expuestos. En contraste con esto, Bergen y col. (2001) estudiando mejillones mostraron un incremento de los lípidos totales en los organismos contaminados. Actualmente se está haciendo evidente que el uso tradicional del contenido de lípidos totales o los datos normalizados por la cantidad de lípidos totales como indicadores de contaminación, no son siempre un dato confiable, debido a las variaciones en la extracción y análisis de lípidos, a diferencias en la partición del contaminante con los lípidos, y a los cambios estacionales y fisiológicos en la concentración y composición de los lípidos (Capuzzo y col., 1989). Para predecir el grado de contaminación, la clase de lípidos presente en los tejidos si es más importante que la concentración del contaminante en la columna de agua (van Wezel y Opperhuizen, 1995). Esto probablemente se deba al hecho que los mecanismos de homeostasis lipídica de los organismos evitan la aparición de cambios significativos en las concentraciones totales. Por esta razón es importante considerar al menos las variaciones de las clases de lípidos.

El análisis de las clases de lípidos de HP mostró una disminución significativa del porcentaje de PC mientras que los TAG mostraron una tendencia al aumento, aunque con un alto desvío. Estos cambios en PC y TAG fueron similares a los observados en cangrejos (Capuzzo y Leavitt, 1988) y mejillones (Bergen y col., 2001). Estos autores sugieren que este hecho posiblemente se deba al daño de la membrana, algo que también podría estar pasando en *M. borellii* siendo la PC el PL mayoritario en membranas (Pollero y col., 1991). Y la disminución en el contenido de PC en HP de organismos expuestos a la WSF podría estar afectando su estructura y propiedades (González-Baró y Pollero, 1988). Además, el contenido de AXT, un potente antioxidante, disminuyó en los organismos expuestos probablemente reflejando su consumo para reprimir el daño provocado por radicales libres (ver capítulo VII). La disminución en la concentración de las moléculas antioxidantes puede provocar que el organismo sea más susceptible a la peroxidación lipídica y estrés oxidativo. Se podría pensar que exposiciones a largo plazo podrían incrementar estos efectos, dado que los efectos fisiológicos a la exposición de

contaminantes lipofílicos son modificados por la disponibilidad del tóxico y la habilidad del organismo para acumularlos y metabolizarlos. Otra posibilidad es que el incremento de la razón TAG/PL en HP refleje un mecanismo para incrementar los niveles de TAG aumentando su síntesis y/o disminuyendo su movilización a los pools de PL y, de esta manera, aumentar los reservorios hidrofóbicos de la WSF para disminuir la disponibilidad del tóxico. Este mecanismo también ha sido observado en otros organismos acuáticos (Bergen y col., 2001). Como se demuestra en el capítulo IV la bioconcentración de HC aromáticos desde el medio y la subsecuente tasa de depuración en *M. borellii*, está relacionada con el contenido lipídico y el número y grado de sustitución de los anillos aromáticos.

Capuzzo y Lancaster (1981) observaron un impedimento en la utilización de los lípidos en la langosta *Homarus americanus* expuesta a WSF y sugieren que tal disfunción energética fue causada por alteraciones en el metabolismo lipídico, si bien no realizaron estudios para demostrarlo.

A diferencia de los resultados encontrados en HP, el contenido y las clases de lípidos en el músculo permanecieron prácticamente invariables entre los organismos controles y expuestos a la WSF, salvo por el aumento significativo de AXT. Debido a que el HP es considerado el centro metabólico de síntesis, transporte y almacenamiento, era de esperar que este órgano experimentara los máximos cambios en el perfil lipídico durante la condición de estrés en comparación al músculo. Este hecho coincide con los resultados obtenidos por Rafi y col. (1991) los cuales estudiaron el efecto de un insecticida organoclorado sobre el metabolismo lipídico del cangrejo de agua dulce *Oziotelphusa senex senex*.

Los lípidos de los huevos de *M. borellii* están compuestos principalmente de TAG que sirven como la fuente primaria de energía durante el desarrollo (Heras y col., 2000). En este modelo se observó una disminución significativa de estas reservas en los embriones expuestos. Este efecto es contrario al observado en el HP, y esto está probablemente relacionado con el hecho de que los huevos son un sistema cerrado (en el sentido que no incorporan nutrientes del medio). Por ende, los embriones se enfrentan con una situación diferente ya que no tienen otras fuentes de energía, salvo el vitelo, y necesitan gastar más energía para hacer frente al incremento de los radicales libres y los mecanismos de detoxificación inducidos por la WSF. El aumento del cociente PL/TAG

refleja este hecho. El HP está a cargo de la detoxificación de xenobióticos (Livingstone, 1998) y ciertamente está utilizando energía que llega desde otros tejidos. Se ha demostrado en trabajos previos en *M. borellii* que los embriones en desarrollo tienen una alta tasa metabólica y un importante consumo de lípidos del vitelo en los últimos estadios de desarrollo (Heras y col., 2000); por lo tanto sería de esperar una alteración de la mayor reserva energética causada por la presencia de la WSF.

La composición de AG de lípidos totales y de PL en músculo, HP y huevos no fueron notoriamente afectada por la exposición a la WSF. Los principales AG de los PL de HP fueron 20:5 n-3 seguido de 20:4 n-6, los isómeros de 18:1, y 16:0 y 18:0, patrón similar al que presentaron los lípidos totales del HP. Cuculescu y col. (1999) encontraron en cangrejos marinos que los ácidos mayoritarios de PC fueron 16:0, 18:1, 20:5 y 22:6. Es interesante notar que el contenido de algunos de los AG n-3 como el 20:5 y 22:6 son algo elevados para lo esperado en organismos de agua dulce, lo cual esté probablemente ligado a la colonización reciente del medio dulceacuícola del género *Macrobrachium*. El cociente n-3/n-6 no fue afectado por la exposición a la WSF siendo siempre menor a uno. De todas maneras es notable el incremento del 18:1 n-9 en HP luego de la exposición convirtiéndose en el segundo ácido graso de los PL del tejido luego del 20:5. En el caso de los lípidos totales este AG alcanzó el primer lugar. Este incremento en AG monoinsaturados podría representar un mecanismo de defensa u homeostasis para minimizar el probable daño oxidativo en los polinsaturados provocado por la WSF. Hay evidencias que los xenobióticos inducen la peroxidación de los lípidos de membranas (Stegeman, 1985). Los AG de los PL de los huevos también fueron dominados por un perfil similar aunque con más saturados y menos polinsaturados y monoinsaturados que en HP. En el caso de los lípidos totales los AG monoinsaturados fueron los predominantes. Los embriones se encuentran encerrados dentro de la cáscara y este sistema cerrado no puede soportar perder sus AG polinsaturados esenciales para el funcionamiento y estructura de sus membranas. Se sabe que los embriones de otros crustáceos tienen más desarrollados los sistemas de defensa antioxidante en comparación a los adultos (Correia y col., 2003) y, dada su importancia, este sistema de protección fue estudiado en los embriones de *M. borellii* en el capítulo VII.

Efecto de la WSF sobre el catabolismo lipídico

Para evaluar si las alteraciones en la composición de los lípidos tenían relación con el metabolismo lipídico, se estudiaron varias de las enzimas clave del catabolismo (en esta sección) y el anabolismo (capítulo VI).

Se estudió por primera vez en crustáceos la actividad de la enzima acil-CoA ligasa mitocondrial. La actividad de esta isoenzima mitocondrial en el hepatopáncreas mostró algunas diferencias en los parámetros cinéticos en comparación a la isoenzima microsomal cuyos parámetros habían sido estudiados con anterioridad en este laboratorio (González-Baró y col., 1990). Estas diferencias en el comportamiento de ambas isoenzimas puede deberse a diferentes causas: (a) muy probablemente estén codificadas por genes diferentes o por un mismo gen con corte y empalme diferentes o al menos deben traducirse en diferentes sitios. De acuerdo a Lodish y col. (2002), probablemente la mitocondrial deba traducirse en ribosomas citosólicos y poseer secuencias señal en la región N-terminal para ser introducida en la membrana mitocondrial externa, mientras que el RNA mensajero de la isoenzima microsomal debería traducirse en el retículo endoplasmático rugoso y codificar para un péptido señal cerca de su extremo N-terminal para anclar la enzima en el retículo endoplasmático. (b) Por otra parte, podría ocurrir que el entorno en la membrana afectara la actividad enzimática como se ha demostrado para otras enzimas del metabolismo lipídico (Castuma y col., 1991) (ver capítulo VI). También podría ocurrir que estén reguladas de forma diferente por síntesis de algún modulador como ha sido demostrado para otras enzimas (Marra y col., 1986). (c) Por último, se debe tener en cuenta el destino de los AG activados ya que ambas pueden aportar a un único "pool" citoplasmático, como se ha sugerido "aunque sin evidencias" para enzimas en insectos (Hauerland, 1997) o, como la hipótesis que se plantea para mamíferos, los acil-CoA sintetizados por cada una de las isoformas podrían tener destinos diferentes (Coleman y col., 2002). El metabolismo de la isoforma microsomal se estudia en el capítulo VI

Se observó que la WSF aumentó significativamente la actividad enzimática de los tres enzimas y sistemas enzimáticos estudiados. La lipasa, involucrada en la degradación de TAG, aumentó en los organismos expuestos en todos los estadios ensayados. El mayor incremento de la actividad se observó en embriones expuestos en estadio 5 donde

el valor alcanzó al 154 % del control. Esta etapa se destaca por una activa degradación de TAG y la oxidación de AG para abastecer de energía a los procesos de organogénesis (González- Baró y col., 2000).

Las lipasas son un grupo heterogéneo de enzimas hidrolíticas que están involucradas en la degradación de lípidos. El incremento de la actividad lipasa en todos los estadios sugiere una mayor demanda energética probablemente para afrontar la situación de estrés causada por los hidrocarburos (Rafi y col., 1991). Los camarones *Metapenaeus conoceros* expuestos a queltano presentaron inducción de la actividad de los tres grupos de lipasas pH-dependientes identificados conjuntamente con una disminución en los lípidos totales y aumento de los AG libres, lo que evidencia lo mencionado anteriormente (Ramana-Rao y Surendranath, 1991). Elumalai y Balasubramanian (1999) observaron que el naftaleno disminuye la actividad esterasa en músculo y ovario del cangrejo *Scylla serrata* a diferencia del efecto observado en *M. borellii* con la WSF en hepatopáncreas y embriones.

En mitocondrias el aumento de las actividades de β -oxidación y palmitoil-CoA ligasa en HP y embriones expuestos en estadio 5, también se correlacionaron positivamente con los observados en la triacilglicerol lipasa.

A diferencia de lo observado en triacilglicerol lipasa, las actividades enzimáticas de β -oxidación y palmitoil-CoA ligasa solo aumentaron en los organismos expuestos a la WSF en HP de adultos y en embriones en estadio 5 (medidos en estadio 6). Esta diferencia podría deberse a que en los estadios mas avanzados haya un aumento de la permeabilidad de la cáscara, hecho que hemos comprobado mediante el aumento de la incorporación de sondas hidrofóbicas y la observación de que durante la exposición crónica de embriones con altas concentraciones de WSF, ésta afectó a los embriones solo en el momento cercano a la eclosión (ver detalles en el capítulo IV).

En síntesis, la exposición de *M. borellii* a la WSF provocaría un aumento del flujo de metabolitos en las rutas catabólicas del metabolismo lipídico, el cual podría deberse a una activación de enzimas preexistentes, o a una inducción de la síntesis de las enzimas provocada por la presencia de los HC aromáticos. Independientemente de cual sea el mecanismo involucrado, el incremento significativo en las actividades de β -oxidación, palmitoil-CoA ligasa y triacilglicerol lipasa estaría indicando que tanto los adultos como los embriones poseen una mayor demanda energética causada por el contaminante.

Capítulo VI

Efecto de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos sobre el anabolismo lipídico de camarones adultos y embriones

VI.A. Introducción

En el capítulo anterior se describió el efecto que ejerce la WSF sobre las actividades de enzimas citosólicas y mitocondriales, en general solubles, involucradas en el catabolismo de los lípidos. Pero debe tenerse en cuenta que la interacción de compuestos lipofílicos con membranas pueden provocar cambios en la integridad y afectar la funcionalidad de las mismas modificando también las actividades de enzimas ligadas a ellas. En este sentido, los elevados coeficientes de partición octanol-agua (K_{ow}) de los HC ponen en evidencia que estos compuestos, una vez ingresados en un organismo, residen preferentemente dentro de las membranas y otros compartimientos lipídicos (Di Toro y col., 2001) y pueden causar efectos tóxicos (Sikkema y col., 1994), ya que los cambios en la composición y empaquetamiento de las membranas provocan alteraciones en las propiedades y actividades de varias enzimas y receptores (Spector y Yorek, 1985; Castuma y Brenner, 1983).

Así, en moluscos acuáticos expuestos a PAH se observó un incremento de la permeabilidad de membrana y una disminución en algunas actividades enzimáticas (Moore y Farrar, 1985). Herman y col. (1991) también observaron que los HC monoaromáticos ejercían efecto sobre la integridad de la membrana de algas en concentraciones subletales. Estudios realizados en nuestro laboratorio con *M. borellii* mostraron que la exposición de membranas microsomales al pesticida liposoluble fenitrotión provocó efectos significativos en el empaquetamiento de los lípidos (González-Baró y col., 1997).

En algunos moluscos y crustáceos se han estudiado a nivel bioquímico los efectos de los HC, principalmente empleando como biomarcadores enzimas de membrana microsomal involucradas en los procesos de biotransformación de xenobióticos, en especial del sistema de monoxigenasas dependiente de citocromo P-450 (Livingstone y col., 1985; Moore y col., 1987; Solé y col., 1996; García Martínez y Livingstone, 1995). Sin embargo, no se han estudiado las enzimas ligadas a membranas e involucradas en el anabolismo de los lípidos. Dado que el retículo endoplasmático es la fracción subcelular más activa en la biosíntesis de lípidos, se evaluó el efecto de la WSF sobre la estructura de esta membrana de *M. borellii* y sobre las actividades enzimáticas participantes en la síntesis de acilglicéridos. Debe destacarse que no existían antecedentes sobre el tema en invertebrados.

VI.B. Resultados

VI.B.1. Actividad Palmitoil-CoA ligasa microsomal

Las Figuras VI.1 y VI.2 muestran las curvas de actividad de palmitoil-CoA ligasa microsomal en función de la concentración de proteínas y del tiempo de incubación, respectivamente. En base a estos resultados se fijaron los parámetros para los ensayos dentro de una respuesta lineal en 10 min y 30 μg de proteína microsomal.

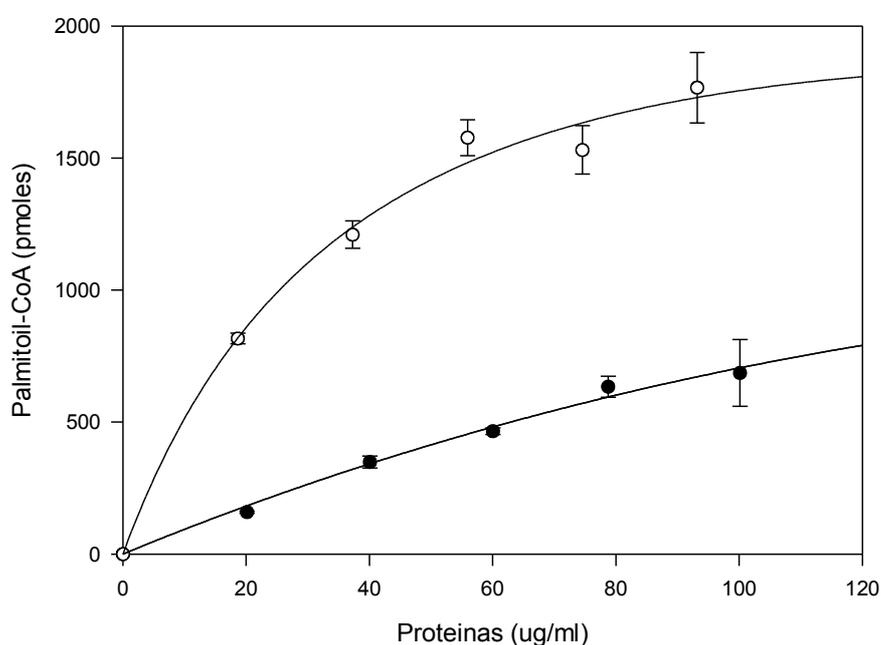


Figura VI.1. Efecto de la concentración de proteínas microsomales sobre la actividad de la palmitoil-CoA ligasa microsomal en HP de adultos (○) y huevos (●) de *M. borellii*.

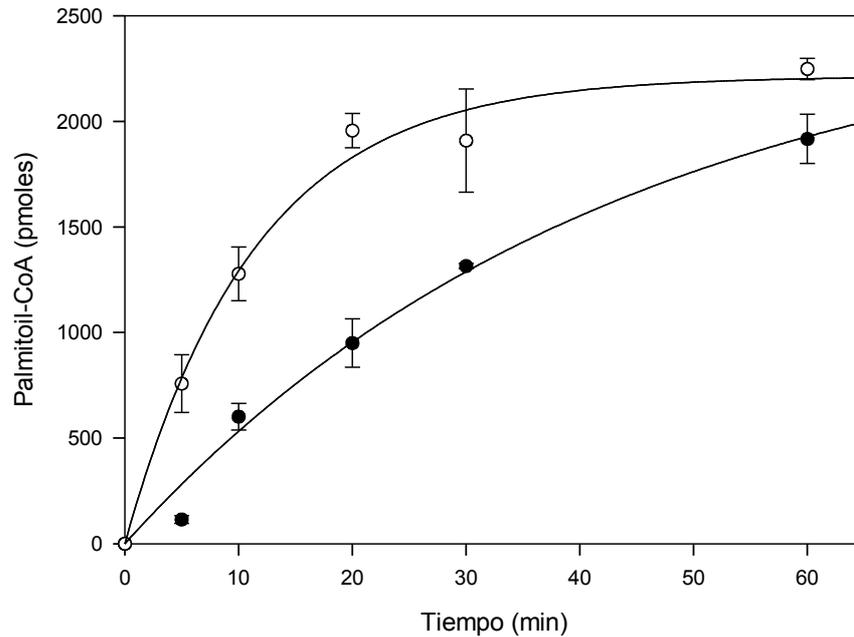


Figura VI.2. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la palmitoil-CoA ligasa microsomal en HP de adultos (○) y huevos (●) de *M. borellii*.

Luego de una semana de exposición a la WSF (ver II.G) los organismos mostraron cambios significativos en la actividad de la palmitoil-CoA ligasa microsomal tanto en el hepatopáncreas de los adultos como en los embriones expuestos en los dos estadios de desarrollo ensayados. Los embriones en estadio 4 incrementaron la actividad de esta enzima un 89 % y los embriones en estadio 5 lo hicieron en un 64 %, mientras que en hepatopáncreas de adultos el incremento fue mayor al 137 % (Figura VI.3).

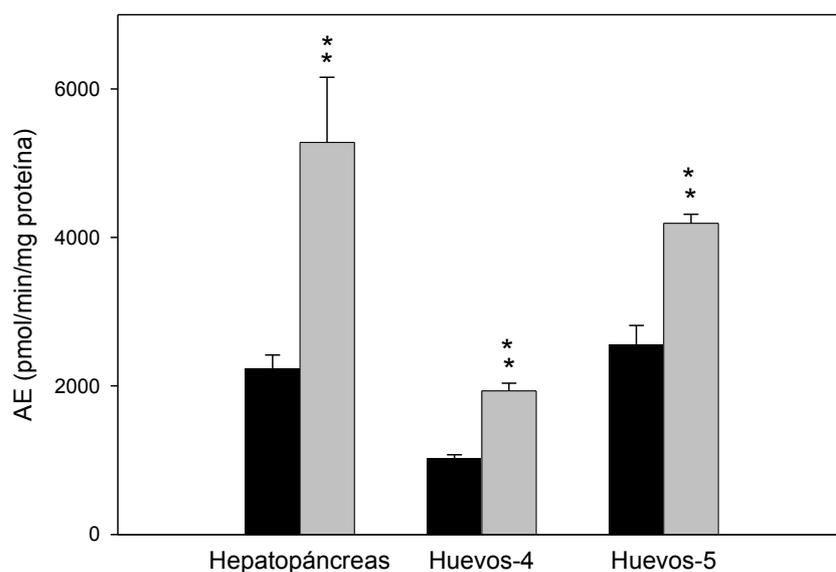


Figura VI.3. Efecto de la WSF sobre la actividad de la palmitoil-CoA ligasa microsomal en HP de adultos y huevos de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l WSF.

■ Control; ■ expuestos a WSF Los valores de actividad específica (EA) representan la media de 3 determinaciones \pm 1 SD. ** muy significativo ($p < 0,001$)

VI.B.2. Síntesis de acilglicerol

En el caso del sistema enzimático que comprende el anabolismo de acilglicéridos se establecieron las condiciones para los ensayos en 1 hora y 200 μ g de proteína microsomal (Figuras VI.4 y VI.5). Se observó que luego de una hora de incubación, en microsomas de hepatopáncreas la mayor parte de la marca se encontró en la fracción correspondiente a TAG, mientras que en los microsomas de huevos correspondió a los PL (Tabla VI.1). Con respecto al efecto de la WSF sobre este sistema enzimático se observó un aumento significativo de la actividad de síntesis de acilglicerol totales en hepatopáncreas del 21 %. En los embriones en estadio 4 no se observaron diferencias significativas, en cambio los embriones en estadio 5 mostraron un aumento del 61 % (Figura VI.6).

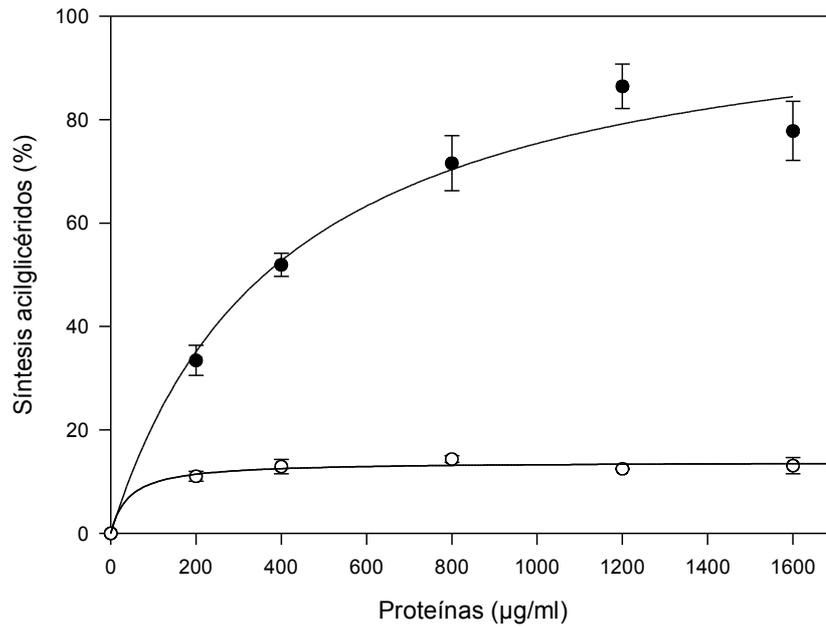


Figura VI.4. Efecto de la concentración de proteínas microsomales sobre la actividad del sistema de síntesis de acilglicéridos en HP de adultos (○) y huevos (●) de *M. borellii*.

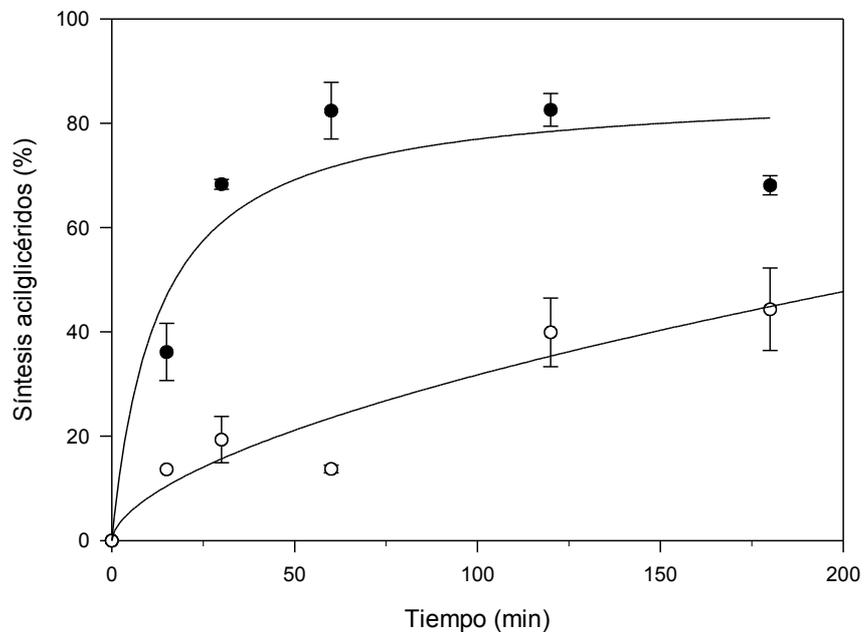


Figura VI.5. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad del sistema de síntesis de acilglicéridos en HP de adultos (○) y huevos (●) de *M. borellii*.

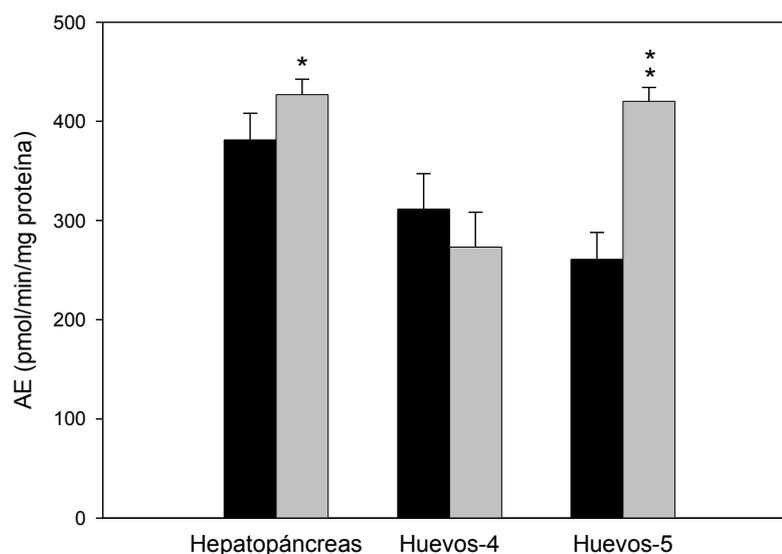


Figura VI.6. Efecto de la WSF sobre la actividad del sistema de síntesis de acilglicéridos en HP de adultos y huevos de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l.

■ Control; ■ expuestos a WSF Los valores de actividad específica (EA) representan la media de 3 determinaciones \pm 1 SD. * significativo ($p < 0,05$) ** muy significativo ($p < 0,001$)

Tabla VI.1. Porcentaje de síntesis de diferentes clases de lípidos en HP y huevos de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l de WSF.

	Hepatopáncreas		Huevos-4		Huevos-5	
	Control	WSF	Control	WSF	Control	WSF
Triacilglicéridos	45,44 \pm 3,80	53,77 \pm 1,52*	18,8 \pm 1,24	21,93 \pm 4,42	18,88 \pm 2,22	18,49 \pm 3,22
Fosfolípidos	7,15 \pm 1,34	5,75 \pm 1,64	44,25 \pm 4,61	40,39 \pm 7,93	42,84 \pm 10,00	41,29 \pm 8,81
Ésteres de	6,94 \pm 0,47	6,88 \pm 0,97	Tr	Tr	Tr	Tr
colesterol						
Mono y	34,44 \pm 4,49	28,68 \pm 1,19	29,92 \pm 2,76	25,8 \pm 15,99	30,32 \pm 7,93	34,55 \pm 6,15
Diacilglicéridos						

Los valores representan la media de 3 determinaciones \pm 1 SD. * significativo ($p < 0,05$) Tr: trazas

Un análisis de la síntesis de las diferentes clases de lípidos, mostró un aumento significativo en la fracción correspondiente a los TAG en los adultos tratados con la WSF,

mientras que la síntesis del resto de los lípidos no presentó diferencias significativas entre los organismos controles y expuestos a la WSF (Tabla VI.1).

VI.B.3. Efecto de los hidrocarburos sobre propiedades físicas de membranas microsomales.

Antes de comenzar con los ensayos definitivos, se realizaron pruebas para determinar si la WSF ejercía un efecto de “apagado” sobre la sonda fluorescente (DPH) que se iba a emplear. Se comparó la intensidad de fluorescencia de una solución acuosa con la sonda sola y la sonda con el agregado de la WSF, no observándose diferencias en los patrones de intensidad.

Al evaluar el efecto de la WSF sobre la fluidez de membranas, se observó que los microsomas de los HP de camarones controles y expuestos a la WSF, incubados con DPH, no mostraron diferencias significativas en los valores de anisotropía del estado estacionario (r_s). Tampoco fueron significativamente diferentes los tratamientos a distintas temperaturas (Tabla VI.2).

Tabla VI.2. Anisotropía de fluorescencia del DPH en microsomas de HP de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l de WSF.

Temperatura	Control	WSF	<i>p</i>
10 °C	0,189 ± 0,040	0,186 ± 0,040	NS
20 °C	0,164 ± 0,032	0,170 ± 0,039	NS
30 °C	0,148 ± 0,023	0,154 ± 0,040	NS

Los valores son la media de 3 determinaciones ± 1 SD. NS: no significativo ($p < 0,05$)

En los ensayos en los cuales se incorporó WSF *in vitro* a microsomas controles, se observó que la presencia de estos HC produjo un incremento en la fluidez del entorno lipídico de la sonda DPH, puesto de manifiesto por la disminución significativa del valor de r_s (Figura VI.7). Se observó que el cambio en la anisotropía dependió tanto de la temperatura como de la concentración de la WSF. La disminución de la r_s en el ensayo a baja temperatura fue la más marcada, y alcanzó alrededor de un 10 %. Medidas de

anisotropía en microsomas de branquias mostraron un aumento de la fluidez semejante al que presentaron los microsomas de HP. También se realizó un ensayo utilizando la sonda fluorescente DPH-PA, la que se ubica en la zona mas cercana a las cabezas polares de los lípidos de las bicapas lipídicas y permite evaluar el estado de esta parte más externa de la membrana. Los valores de rs en este caso no variaron con el tratamiento en la WSF. Cabe mencionar que el rango de temperaturas se seleccionó teniendo en cuenta el rango ambiental al que están expuestos estos crustáceos.

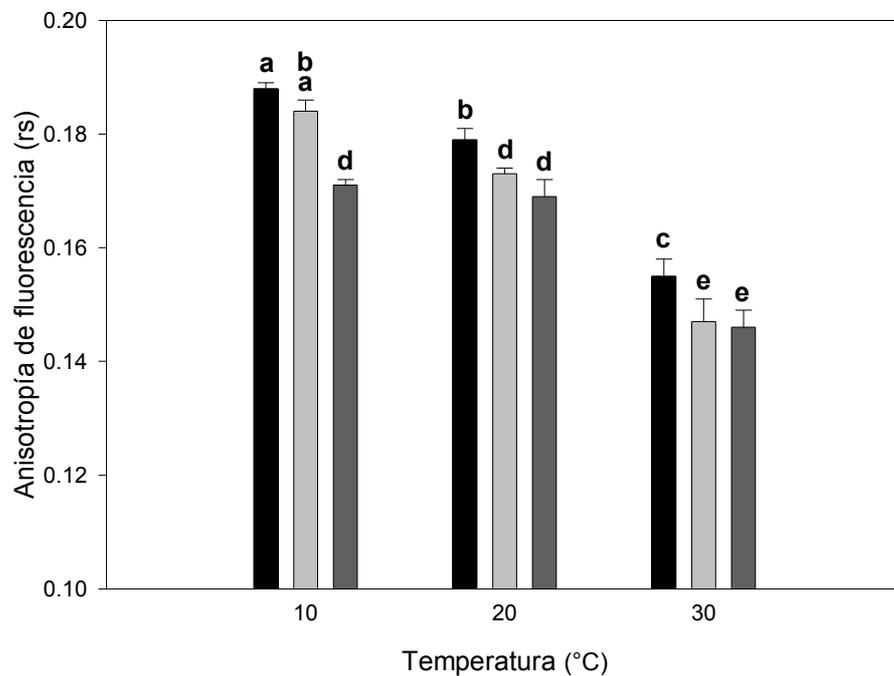


Figura VI.7. Anisotropía de fluorescencia del DPH en microsomas de HP de *M. borellii* tratados *in vitro* con WSF.

■ Control; □ 1,3 mg/l de WSF; ▒ 3,2 mg/l de WSF. Los valores representan la media de 3 determinaciones \pm 1 SD. Las distintas letras indican la significancia ($p < 0,05$)

Considerando que la WSF es una mezcla de diferentes HC (ver IV.B) y para poder discriminar en mayor medida la influencia de cada uno, se realizó un ensayo determinando el efecto que ejercen individualmente algunos de ellos sobre la fluidez de las membranas de *M. borellii*. La Tabla VI.3 muestra el efecto de los principales componentes de la WSF sobre las membranas microsomales a 20 °C. Se puede observar

que todos los HC provocaron una disminución significativa del rs a la concentración de 10 mg/l, mientras que cuando los microsomas fueron expuestos a una concentración de 4 mg/l, sólo los HC alifáticos de entre 10-16 C de longitud y la mezcla de HC (ver II.E.1) produjeron una disminución significativa del rs (Tabla VI.3).

Tabla VI.3. Porcentaje de disminución de la anisotropía de fluorescencia del DPH en microsomas de HP de *M. borellii* tratados *in vitro* con diferentes clases de HC de la WSF.

HC	4 mg/l	10 mg/l
Xileno	< 1 %	6,6 ± 1,1*
Tolueno	< 1 %	12,5 ± 0,6*
Naftaleno	< 1 %	8,8 ± 2,5*
Benceno	< 1 %	12,8 ± 3,4*
Alifáticos	27,7 ± 9,7*	29,1 ± 4,9*
Mezcla HC	22,9 ± 10,0*	31,4 ± 2,9*

Ensayos realizados a 20 °C. Los valores representan la media de 3 determinaciones ± 1 SD.

* significativo ($p < 0,05$)

VI.C. Discusión

Al igual que el catabolismo (ver capítulo V), el anabolismo de lípidos en camarones adultos y embriones fue afectado por la exposición a la WSF. Las enzimas involucradas en la activación de los AG y la síntesis de acilgliceroles, sobre todo la primera, resultó estar considerablemente aumentada en todos los estadios del ciclo de vida ensayados. Posiblemente los AG activados por esta enzima tengan como destino no solo la síntesis de acilgliceroles, sino también la oxidación mitocondrial, ya que como vimos anteriormente, la WSF aumenta la degradación de AG (ver capítulo V). Se podría postular que, independientemente de cuál sea la ubicación subcelular de la Acil-CoA ligasa, los AG activados pueden incorporarse a un pool citosólico común, y ser empleados tanto en el anabolismo como en el catabolismo lipídicos, de acuerdo a las necesidades metabólicas del momento. Esto fue postulado en mamíferos (Coleman y col., 2002), y fue sugerido

aunque sin base experimental, por Haunerland (1997) en insectos. No existían en crustáceos medidas de actividad de acil-CoA ligasas mitocondriales fuera de la descrita en el capítulo V de la presente tesis.

Por otra parte, estudios realizados en mamíferos con respecto al metabolismo de xenobióticos, mostraron que las acil-CoA ligasas de cadena larga de microsomas hepáticos, pueden catalizar la conjugación de CoA con tóxicos que tienen grupos carboxilos (Watkins, 1997; Knights y Drogemuller, 2000). Dado que el mecanismo de detoxificación de HC aromáticos mediante oxigenasas en crustáceos incluye productos carboxilados (Livingstone, 1998; Di Giulio y col., 1995), estos podrían ser a continuación conjugados con CoA. Luego, los conjugados podrían actuar como sustratos alternativos en la síntesis lipídica formando TAG híbridos como fue sugerido por Dodds (1991) y Sallustio y col. (1988). Esto podría explicar el elevado incremento en la actividad de esta enzima en microsomas de *M. borellii* tratados con WSF, que inclusive es mayor que el de su isoforma mitocondrial (ver V.B.2.a).

El aumento de la síntesis de acilgliceroles simultáneamente con el incremento en su degradación (capítulo V), reflejan un activo intercambio de lípidos en condiciones de estrés, posiblemente para mantener la homeostasis metabólica (Rafi y col., 1991).

El hepatopáncreas de este crustáceo es el principal órgano del metabolismo lipídico y en los adultos predomina normalmente la síntesis de TAG (González-Baró y col., 1993) la cuál se vio significativamente aumentada por efecto de la WSF. Por otra parte, en los embriones en estadio 4 y 5 el precursor radioactivo se incorporó principalmente en los PL, probablemente debido a que en esta etapa del desarrollo, los embriones se encuentran en activa organogénesis y los PL serían utilizados en la síntesis de membranas. Esta diferente incorporación estaría de acuerdo con el cociente PL/TAG que disminuyó por efecto de la WSF en los lípidos de HP y aumentó en los huevos (ver V.B.1.a). Hay que tener en cuenta que, como se mencionó en el punto V.B.2.a, al término de la semana de exposición los embriones avanzaron a los estadios 5 y 6, respectivamente.

Para determinar si este incremento en la actividad de estas enzimas en el HP se debía a modificaciones estructurales de la membrana, se estudiaron algunas de sus propiedades. Se pudo observar que los microsomas preparados a partir de organismos expuestos *in vivo* a la WSF no mostraron alteraciones en la fluidez de las membranas, algo semejante a lo observado con microsomas de este camarón expuestos al fenitrotión

(González-Baró y col., 1997). Como se mencionó en IV.B.3, los camarones expuestos a una concentración constante de WSF en 24 h llegan a un equilibrio con el medio alcanzando el máximo de concentración de HC en los tejidos. Para poder estudiar el efecto de concentraciones mayores, se diseñaron ensayos *in vitro* donde sí se observó un efecto de los HC sobre las propiedades de la membrana. Puede pensarse entonces que la concentración de HC (0,6 mg/l) utilizada en los bioensayos no fue suficiente para provocar una alteración en la estructura y, consecuentemente, en la fluidez de las membranas. Debe notarse, además, que el efecto provocado por los HC en los ensayos *in vitro* fue diferente según la clase de HC, siendo mayor el efecto fluidificante de los alifáticos.

Sikkema y col. (1994) observaron que la acumulación de HC cíclicos en membranas biológicas, causó un incremento en su fluidez. Estos resultados confirman lo observado en otras membranas donde existe una fuerte correlación entre la toxicidad de compuestos lipofílicos y su acumulación, llegando en concentraciones elevadas (relacionadas además con su partición en la membrana) a afectar su integridad y funcionamiento. En particular, el efecto de los HC cíclicos sobre la estructura y propiedades de la membrana depende de la acumulación en la misma (Sikkema y col., 1994) provocando una expansión o aumento de su superficie y por ende un aumento de su fluidez, tal como observamos en los microsomas de HP de *M. borellii*.

Para los HC, el principal sitio de localización en la membrana sería la región interna donde se encuentran las cadenas alifáticas de los lípidos. Estudios previos han reportado que los HC tanto aromáticos como alifáticos se ubican en la región de las cadenas hidrocarbonadas de los PL o en el área donde se enfrentan las monocapas (White y col., 1981; Sikkema y col., 1995; McIntosh, y col., 1980). Por esta causa probablemente no observamos cambios en los valores de r_s de los microsomas expuestos a los HC empleando la sonda DPH-PA, ya que este fluoróforo se ubica en la zona mas externa de la membrana cerca de las cabezas polares. Los microsomas de este camarón respondieron de manera diferente cuando fueron expuestos a otro xenobiótico lipofílico pero de mayor polaridad, ya que una exposición de organismos adultos al organofosforado fenitrotión mostró alteraciones en el empaquetamiento de estas membranas tanto en la zona interna como, principalmente, en las regiones externas cercanas a los grupos polares (González-Baró y col., 1997). En otros estudios se encontró que el mayor cambio en las propiedades de las membranas era originado por la

interacción con moléculas de HC pequeñas como el hexano, que provocarían un incremento en el ancho de la bicapa lipídica (White y col., 1981). Esta puede haber sido la razón por la cual se observó en microsomas de *M. borellii* un mayor efecto de los HC alifáticos con respecto de los aromáticos.

En ratas a las que se les administraron por vía oral m- y p-xileno, se observó que este último produjo cambios en el contenido lipídico y la fluidez de membranas microsomales de pulmón, donde aumentó significativamente el valor de rs con respecto a los controles, mientras que el m-xileno no produjo cambios en el contenido lipídico ni en la fluidez de las membranas (Stickney y col., 1989). En nuestro caso, el efecto del m-xileno, aunque menor que el de otros HC ensayados, fue medible y contrario al mencionado en membranas de pulmón de ratas, ya que produjo una disminución en el valor de anisotropía.

De los resultados de estos experimentos podemos inferir que, si bien la exposición *in vivo* de camarones adultos a la WSF aumenta la actividad de las enzimas microsomales ensayadas, este cambio no se debería a una alteración directa de la fluidez de la membrana y posiblemente exista una inducción de la síntesis de estas enzimas. Mecanismos de inducción en respuesta a HC han sido sugeridos en otros organismos, pero referido a enzimas de detoxificación, y no a enzimas microsomales del metabolismo lipídico.

Capítulo VII

Efecto de la fracción hidrosoluble de hidrocarburos
sobre el sistema de defensa antioxidante

VII.A. Introducción

De los estudios de los sistemas bioquímicos relacionados con el efecto de los tóxicos en los organismos acuáticos, el de las enzimas involucradas en el metabolismo o la transformación de los contaminantes orgánicos, es posiblemente el más extensamente estudiado. Como ya se mencionara en la introducción general, las alteraciones de las actividades de estas enzimas y de los secuestradores no enzimáticos de radicales libres, ambos involucrados en el metabolismo y eliminación de compuestos presentes en el petróleo crudo, pueden ser utilizados como biomarcadores bioquímicos (Reid y MacFarlane, 2003).

Estudios sobre la biotransformación de distintos tipos de contaminantes realizados en numerosas especies de invertebrados, han mostrado que existen diferencias en el metabolismo de diferentes grupos de tóxicos. Por ejemplo, los HC aromáticos y alifáticos se metabolizan más lentamente en comparación con xenobióticos que poseen grupos polares. Al comparar la capacidad de biotransformación de los invertebrados, se observó que los crustáceos metabolizan ambos tipos de componentes más rápidamente que los moluscos (Livingstone, 1998). En moluscos, la exposición a HC de petróleo aumentó la actividad monooxidasa de función mixta (MOF), conjunto de enzimas involucradas en los procesos oxidativos de fase I mencionados en el capítulo I (Livingstone y col., 1985; Moore y col., 1987). Estudios realizados en camarones adultos y larvas de *Pandalus platyceros* mostraron que estos decápodos fueron capaces de metabolizar el naftaleno a productos conjugados y no conjugados (Sanborn y Malins, 1977).

De las enzimas del metabolismo de contaminantes de la Fase II, la glutatión S-transferasa (GST) ha sido una de las más estudiadas en crustáceos (Saravana Bhavan y Geraldine, 2001; Arun y Subramanian, 1998a y b; Ishizuka y col., 1998), sin embargo el rol de la GST como potencial biomarcador en estudios ecotoxicológicos solo ha cobrado relevancia recientemente en crustáceos (Gowland y col., 2002).

Si bien existen datos sobre el efecto de los PAH sobre las defensas antioxidantes en crustáceos (Orbea y col., 2002; de Knecht y col., 2001), no se han encontrado antecedentes de estudios de la WSF sobre este sistema.

En este capítulo se presentan los primeros estudios sobre los sistemas enzimáticos y no enzimáticos que participan en la defensa antioxidante de *M. borellii*, así como los primeros en crustáceos sobre el grado en que son afectados por la exposición a la WSF.

VII.B. Resultados

VII.B.1. Sistema enzimático de defensa antioxidante

Luego de exponer camarones adultos y hembras ovígeras (portando huevos en estadio 5) a una concentración de 0,6 mg/l de WSF durante una semana, se evaluó la actividad de algunas de las enzimas que intervienen en el mecanismo de defensa antioxidante (SDA). En este caso, a diferencia de los bioensayos descritos en otros capítulos, los camarones adultos fueron alimentados durante el período de exposición, para evitar que disminuyeran los componentes que forman parte del SDA. Se observó que la actividad catalasa (CAT) aumentó significativamente en un 86 % en HP de los adultos expuestos a la WSF, mientras que las branquias y los huevos no presentaron diferencias significativas entre los organismos expuestos y los controles (Figura VII.1).

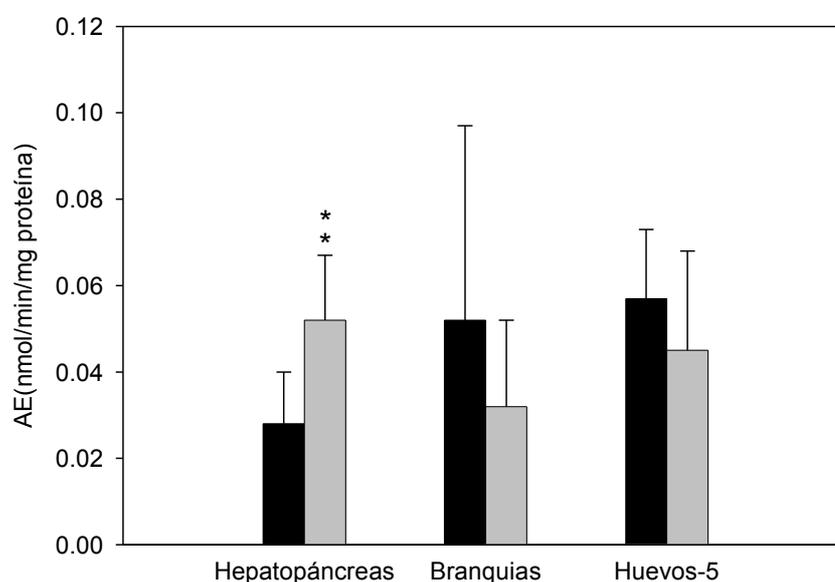


Figura VII.1. Efecto de la WSF sobre la actividad de la CAT en tejidos adultos y huevos de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l.

■ Control; □ expuestos a la WSF. Huevos-5: embriones en estadio 5. Valores expresados como la media \pm 1 SD; N= 13 para HP y branquias, N= 6 para huevos; ** muy significativo ($p < 0,01$).

La actividad de la GST mostró diferencias significativas en ambos tejidos de los camarones adultos expuestos a la WSF, aumentando un 116 % en HP y un 28 % en branquias con respecto a los camarones controles. En los huevos la exposición a la WSF no afectó significativamente la actividad de la GST (Figura VII.2).

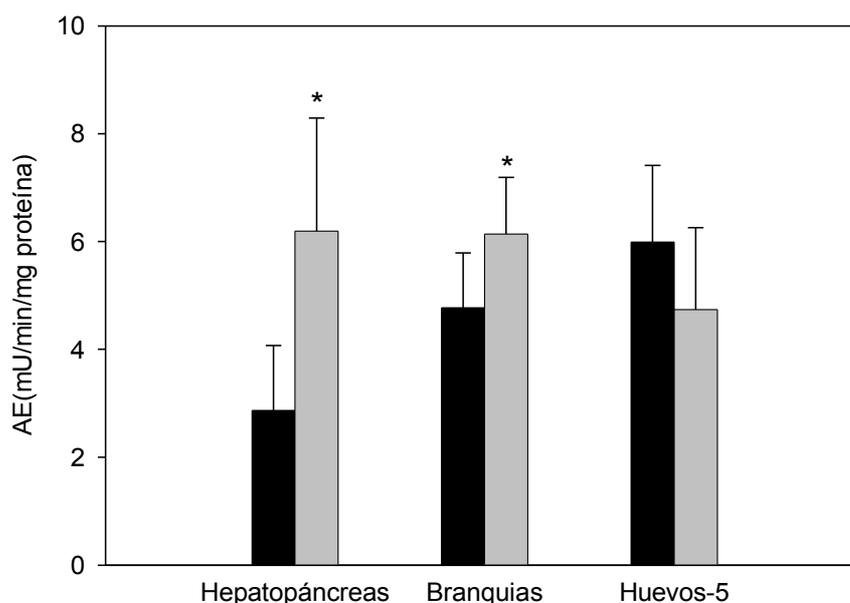


Figura VII.2. Efecto de la WSF sobre la actividad de la GST en tejidos de camarón adulto y huevos de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l.

■ Control; ■ expuestos a la WSF. Huevos-5: embriones en estadio 5. Valores expresados como la media \pm 1 SD; N= 13 para HP y branquias, N= 6 para huevos; * significativo ($p < 0,05$)

Cuando se compararon las actividades de CAT y GST entre los HP de adultos y huevos de organismos controles, se observó que los embriones presentaron mucha mayor actividad, más del doble de los valores de los adultos en ambos casos (Tabla VII.1).

Tabla VII.1. Comparación de las actividades específicas de CAT y GST de HP de camarones adultos y huevos de *M. borellii* no expuestos a la WSF.

	HP adultos	Huevos-5	<i>p</i>
CAT	0,028 ± 0,015	0,057 ± 0,015	**
GST	2,87 ± 1.2	5,99 ± 1,22	***

Valores expresados como: pmol/min/mg de proteína para CAT y mU/min/mg de proteína para GST. Huevos-5: embriones en estadio 5. * significativo ($p < 0,05$) ** muy significativo ($p < 0,01$).

Comparativamente con el otro tejido estudiado, la actividad de GST fue mayor en branquias que en HP de camarones controles, siendo esta diferencia muy significativa ($p < 0,002$). No obstante, la actividad promedio de GST en HP se indujo por la WSF en mucho mayor grado que en branquias. Con respecto a la actividad de CAT en branquias, fue algo mayor que en HP.

VII.B.2. Sistema no enzimático de defensa antioxidante

La Figura VII.3 muestra los resultados de las medidas de la capacidad antioxidante total por la reacción de la captación de radicales libres con el reactivo ABTS (ver II.G.10.c.1). Se observó un aumento muy significativo en la hemolinfa de adultos expuestos a la WSF con respecto a los controles, mientras que las muestras de homogenato total de huevos mostraron una disminución significativa de la capacidad antioxidante total (Figura VII.3).

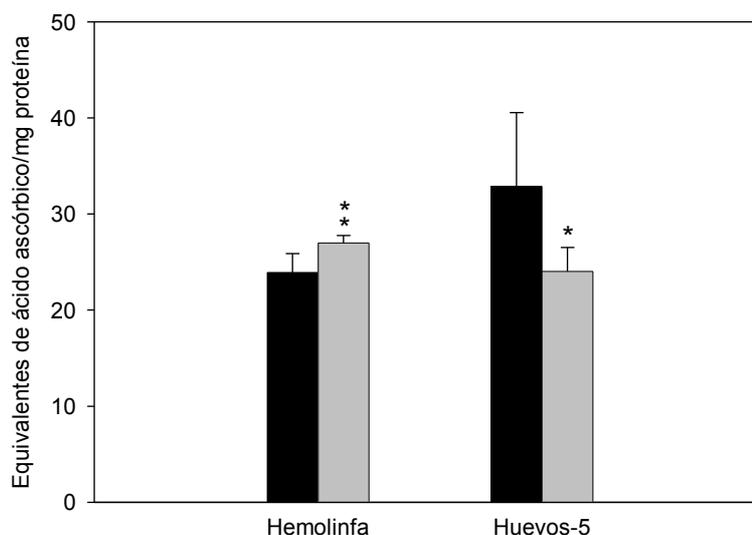


Figura VII.3. Medida mediante ABTS de la actividad antioxidante total en hemolinfa de adultos y huevos de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l de WSF.

■ Control; ■ expuestos a la WSF. Huevos-5: embriones en estadio 5. Valores expresados como la media \pm 1 SD; N= 6; * significativo ($p < 0,05$) ** muy significativo ($p < 0,005$).

Cuando se evaluó la capacidad antioxidante midiendo la reacción de captación de radicales libres por la reacción de FRAP (II.G.10.c.2), también se observó una disminución en los huevos expuestos a la WSF (Figura VII.4), mientras que las muestras de hemolinfa no mostraron diferencias significativas entre los camarones tratados con WSF y los controles.

La comparación de la capacidad antioxidante total entre organismos adultos y embriones controles mostró diferencias significativas con los dos reactivos ensayados, evidenciando la existencia de una mayor protección en los estadios menos desarrollados (Tabla VII.2).

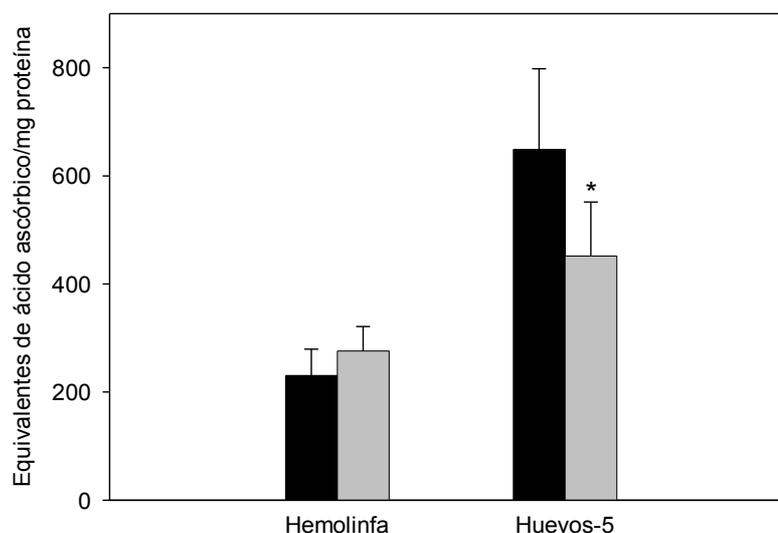


Figura VII.4. Capacidad antioxidante total en hemolinfa de adultos y huevos de *M. borellii* luego de 7 días de exposición a 0,6 mg/l de WSF evaluada mediante el poder reductor de Fe^{+3} (técnica de FRAP).

■ Control; ■ expuestos a la WSF. Huevos-5: embriones en estadio 5. Valores expresados como la media \pm 1 SD; N= 6; * significativo ($p < 0,05$).

Tabla VII.2. Comparación de la capacidad antioxidante total en hemolinfa de camarones adultos y huevos de *M. borellii* no expuestos a la WSF.

	Hemolinfa	Huevos-5	<i>p</i>
ABTS	23,9 \pm 1,97	32,89 \pm 7,68	*
FRAP	231,03 \pm 48,43	648,97 \pm 149,33	**

Unidades: Equivalentes de ácido ascórbico/ mg de proteína. * significativo ($p < 0,05$) ** muy significativo ($p < 0,0001$)

Finalmente se comparó la capacidad antioxidante total entre la hemolinfa de adultos control alimentados (ver valores en Tabla VII.2) con respecto a adultos con 4 días de ayuno. Se observó en estos últimos una disminución significativa ($p < 0,01$) tanto en las medidas de ABTS ($19,19 \pm 2,15$) como con FRAP ($152,31 \pm 18,97$).

VII.C. Discusión

Los organismos aeróbicos poseen un nivel basal de sus sistemas antioxidantes que les aseguran el mantenimiento del balance entre la producción y la remoción de las ROS endógenas y de otros pro-oxidantes. En crustáceos se ha identificado al HP como el principal sitio del metabolismo de tóxicos y de la actividad de las enzimas de biotransformación de las ROS generadas (Livingstone y col., 1998). En *Macrobrachium malcolmsonii* y *M. lamarrei lamarrei*, las actividades de CAT, SOD y GSX fueron más elevadas en HP, seguidas por las del músculo y las branquias (Arun y Subramanian, 1998a), a diferencia de lo que observamos en *M. borellii* donde la mayor actividad de las enzimas GST y CAT la presentaron las branquias. Por otra parte, se ha observado que los cambios intrínsecos en el consumo de oxígeno durante el ciclo de vida de los crustáceos pueden ser un factor importante que afecta el nivel antioxidante. Así, Arun y Subramanian (1998b) observaron que durante el desarrollo embrionario de *M. malcolmsonii*, el incremento gradual del consumo de oxígeno estaba relacionado con el incremento en las actividades de CAT, SOD y GSX. Comparando las actividades de SOD y GSX varios estadios de desarrollo en afípodos, Correia y col. (2003) observaron que los juveniles de *Gammarus locusta* mostraban actividades superiores a los adultos. En nuestro caso también observamos que las actividades de las enzimas GST y CAT variaban con el estadio de desarrollo siendo significativamente más elevadas en los estadios embrionarios de *M. borellii* (en estadio de desarrollo 5-6) que en los adultos controles. Estos resultados se contraponen con lo arriba mencionado para *M. malcolmsonii* donde los adultos presentaron mayor actividad que los estadios más inmaduros (Arun y Subramanian, 1998b). La enzima GST, en general se localiza en aquellos tejidos que interactúan directamente con el medio externo, o los que presentan una alta tasa metabólica como las branquias y el HP, donde Saravana Bhavan y Geraldine (2001) observaron en *M. malcolmsonii* elevados niveles de actividad de esta enzima.

De todas maneras, la comparación de las actividades de las enzimas del sistema antioxidante en invertebrados es limitada, por el uso de diferentes unidades en algunos estudios, y los escasos antecedentes de la influencia estacional y otros factores como género y edad.

En *M. borellii* la actividad CAT es baja tanto en embriones como en adultos, si bien hay que tener en cuenta que se trabajó con homogenato total y no con la fracción peroxisomal. Otros estudios indicarían que la CAT, si bien presenta mucha variación interespecífica, jugaría un rol muy importante en la detoxificación del H₂O₂ en invertebrados, en comparación a la GSX que cumpliría este papel en vertebrados (Livingstone y col., 1992).

Cuando los organismos se exponen a contaminantes, se suele producir un aumento en la producción de ROS, lo que trae aparejado un incremento en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante. Por ejemplo, los trabajos realizados por Niyogi y col. (2001a; 2001b) muestran que existe inducción de las enzimas antioxidantes CAT y SOD en el molusco *Balanus balanoides*, y de CAT, SOD, GST, como también de la peroxidación lipídica microsomal en el crustáceo *Saccostrea cucullata*, ambos recolectados en un estuario contaminado principalmente con PAH. También otros autores observaron incrementos de CAT y SOD en bivalvos expuestos a PAH donde hubo una correlación positiva entre las actividades de estas enzimas y la concentración de los PAH en los tejidos (Porte y col., 1991; Solé y col., 1996).

Saravana Bhavan y Geraldine (2001) observaron una inducción de GST por exposición al pesticida endosulfan en HP y branquias de *M. malcolmsonii*, coincidiendo esta respuesta con la que presentó *M. borellii* por exposición a la WSF, donde se observó un aumento significativo de esta enzima en ambos órganos. Asimismo, Ishizuka y col. (1998) reportaron que el HP del cangrejo de agua dulce *Eriocheir japonicus* recolectado en ríos contaminados con PAH y bifenilos policlorados presentaba inducción significativa de GST, y propusieron la utilización de este biomarcador para determinar la presencia de estos contaminantes en el ambiente. Esto se podría sugerir también para la enzima GST de *M. borellii*, ya que mostró cambios importantes tanto en HP como en branquias en 7 días de exposición. Por otra parte, dado que los embriones en desarrollo son sensibles al daño producido por el oxígeno y durante la embriogénesis se intensifica el consumo de oxígeno (Anger, 2001), es esperable que las enzimas antioxidantes en muchos casos tengan actividades elevadas, como se observó en los embriones de *M. borellii* en comparación con los niveles de actividad de los adultos. Llamativamente, los embriones de *M. borellii* tratados con la WSF no presentaron cambios de las enzimas estudiadas, indicando que posiblemente la actividad basal de estas enzimas es suficiente para proteger a los embriones del daño oxidativo iniciado por los HC de la WSF. Estos

resultados estarían relacionados con la baja mortalidad que presentaron los embriones expuestos crónicamente a elevadas concentraciones de la WSF (ver capítulo IV).

Recientemente se ha desarrollado un enfoque diferente para caracterizar las defensas antioxidantes en organismos acuáticos, evaluando la capacidad antioxidante total por métodos de captación de las ROS. Este tipo de medidas ofrece una cuantificación más confiable de la función y regulación del sistema antioxidante en organismos acuáticos (Livingstone, 2001). En nuestro caso los métodos seleccionados para medir la capacidad antioxidante total fueron ABTS y FRAP. El primero mide la capacidad colectiva de los antioxidantes para captar radicales libres, el segundo mide la capacidad de reducir Fe^{+3} en la muestra (ver capítulo II). Empleando ambos métodos se observaron los mismos cambios, aunque con algunas diferencias posiblemente debidas a la diferente sensibilidad que tienen los reactivos a los diferentes antioxidantes (Rice-Evans y Millar, 1997; Benzie y Strain, 1996) ya que estos métodos miden la cantidad pero no la calidad de los antioxidantes presentes en la muestra (Romay y col., 1996).

La mayoría de las moléculas antioxidantes son nutrientes esenciales que se incorporan a través de la ingesta. Se han realizado numerosos trabajos que estudian los requerimientos nutricionales de crustáceos y se ha visto por ejemplo, que dietas suplementadas con vitamina E inhiben la peroxidación lipídica y modulan las defensas antioxidantes en branquias y HP en *M. rosenbergii* (Dandapat y col., 2000). Estos resultados están de acuerdo con la disminución significativa en la capacidad antioxidante total, que presentaron los adultos de *M. borellii* en condiciones de ayuno. Así en *Chasmagnatus granulatus* se observó un incremento de los niveles de capacidad antioxidante total en respuesta al estrés oxidativo inducido por microcistina (Vinagre y col., 2003), determinada en fracción citosólica de branquias por un método diferente al utilizado en *M. borellii* (método de Regoli y Winston, 1998). También hay que tener en cuenta que las muestras de *M. borellii* fueron de hemolinfa y no citosol, la cual tiene principalmente como función el transporte de macromoléculas entre los tejidos. Evidentemente las comparaciones entre estas fracciones deben tomarse con los recaudos mencionados más arriba para las comparaciones de actividades enzimáticas.

La disminución de la capacidad antioxidante total en los homogenatos totales de embriones expuestos a la WSF comparados con los controles, se explicaría por la evidente actividad de los secuestradores de radicales relacionada al metabolismo de los HC de la WSF y la no incorporación de antioxidantes externos. La mayor capacidad

antioxidante de los embriones en comparación a los adultos, ambos no expuestos a la WSF, evidencia la existencia de un sistema de defensa bien desarrollado en los embriones durante su desarrollo, o al menos, en el estadio 6, que posee una elevada actividad metabólica. Estudios en los cuales se han medido altas concentraciones de GH y vitaminas A, E y C en embriones de otros invertebrados acuáticos apoyan esta hipótesis (Rudneva, 1999).

En conclusión, estos estudios del sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático en *M. borellii*, permiten determinar que el mismo se activa, en el caso de adultos muy significativamente, ante la presencia de la WSF. La falta de activación del sistema en embriones, sugiere que dicho sistema está lo suficientemente desarrollado como para hacer frente a este estrés. Aunque como se desprende de los experimentos de permeabilidad descritos en el capítulo IV y los de efecto sobre membranas descritos en el capítulo VI, no se descarta la posibilidad de que esto se deba al hecho de que la protección dada por la cáscara haga que las cantidades de HC que ingresen no sean lo suficientemente elevadas como para requerir una activación del sistema.

Conclusiones Generales

Los resultados obtenidos, discutidos en los capítulos III a VII, permiten las siguientes conclusiones:

- ✓ Dos estudios preliminares básicos apoyaron los bioensayos realizados posteriormente.
 - En el área seleccionada para la recolección de muestras no se encontraron HC petrogénicos. Esta condición se mantuvo durante el período de estudio.
 - Fue desarrollado un método rápido y no invasivo para diferenciar estadios de embriogénesis, basado en un análisis morfométrico de los embriones.

- ✓ La WSF afecta la supervivencia de *M. borellii* según el estadio de desarrollo
 - Tanto las larvas como los adultos resultan igualmente sensibles a la exposición a la WSF (similares LC50-96h). Las larvas son más sensibles a tiempos menores.
 - En comparación, la mayor resistencia de los embriones en desarrollo, sugiere una protección parcial de la cáscara. Esta protección disminuye cerca del momento de la eclosión.

- ✓ Los adultos tienen una cinética rápida de captación y liberación de los HC relacionada con su contenido lipídico.
 - Los HC de la WSF son incorporados rápidamente a los tejidos y llegan a un equilibrio de concentración en 24h.
 - El número y grado de alquilación de los anillos aromáticos aumenta tanto su cinética de bioacumulación como su retención en los tejidos.

- ✓ Los procesos catabólicos y anabólicos relacionados al metabolismo lipídico son afectados por la WSF en adultos y embriones en estadios avanzados, reflejando el esencial rol energético de los lípidos en los camarones.
 - El cociente TAG/PL se incrementa en HP y disminuye en huevos.
 - La enzima palmitoil-CoA ligasa mitocondrial fue caracterizada por primera vez en crustáceos.
 - Se incrementan las actividades de β -oxidación, palmitoil-CoA ligasas mitocondrial y microsomal, y TAG lipasa.
 - La actividad anabólica de los lípidos microsomales se incrementa. Este cambio no se debería a la alteración de las propiedades de la membrana.
 - Los HC afectan la fluidez de la membrana a concentraciones comparables a las observadas en zonas de derrame.

- ✓ La WSF altera los mecanismos de defensa antioxidante.
 - Aumenta la actividad del sistema enzimático en adultos y disminuye la capacidad antioxidante no enzimática de huevos.
 - Los embriones presentan naturalmente niveles de protección basales significativamente superiores a los adultos.

- Ackman, R. G. & Noble, D. (1972). Steam Distillation: A simple technique for recovery of petroleum hydrocarbons from tainted fish. *J. Fish Res. Bd. Canada*, 30, 711-714.
- Ackman, R. G., Heras, H., & Zhou, S. (1997). Improvements in recovery of petroleum hydrocarbons from marine fish, crabs and mussels. En: R.E. McDonald & M. Mossoba (Eds.), *New Techniques and Applications in Lipid Analysis*. (pp. 380-393). Champaign IL: Am. Oil Chem. Soc.
- AGOSBA-OSN-SHN (1992). Río de La Plata, Calidad de las Aguas, Franja Costera Sur (San Isidro-Magdalena). Buenos Aires, Argentina: Dirección de Servicios Especiales, Sub-Dirección Química de Recursos Hídricos.
- Al-Mohanna, S. Y. & Nott, J. A. (1986). B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 66, 403-414.
- Amin, O. A. & Comoglio, L. (2002). Toxicidad del petróleo diesel en el primer estadio larval de la centolla (*Lithodes santolla*) y del centollón (*Paralomis granulosa*). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 37(2), 139-144.
- Anderson, J. W., Neff, J. M., Cox, B. A., Tatem, H. E., & Hightower, G. M. (1974). Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Mar. Biol.*, 27(1), 75-88.
- Anger, K. (1996). The conquest of freshwater and land by marine crabs: Adaptations in life-history patterns and larval bioenergetics. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 193(1-2), 119-145.
- Anger, K. (2001). Metabolism. En: R. Vonk (Ed.), *The biology of decapod crustacean larvae* (pp. 213-242). Tokyo, Japan: A. A. Balkema.
- Arrese, E. L. & Wells M.A. (1994). Purification and properties of a phosphorilatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. *J. Lipid Res.*, 35, 1652-1660.
- Arun, S. & Subramanian, P. (1998a). Antioxidant enzymes activity in subcellular fraction of freshwater prawns *M. malcolmsonii* and *M. lamarrei lamarrei*. *Applied Biochem. Biotechnol.*, 75, 187-192.
- Arun, S. & Subramanian, P. (1998b). Antioxidant enzymes in freshwater prawn *M. malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121B, 273-277.
- Barron, M. G., Podrabsky, T., Ogle, R. S., Dugan, J. E., & Ricker, R. W. (1999). Sensitivity of the sand crab *Emerita analoga* to a weathered oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62(4), 469-475.
- Bauer, D. E., Donadelli, J., Gómez, N., Licursi, M., Ocón, C., Paggi, A. C., Rodrigues Capítulo, A., & Tangorra, M. (2002). Ecological status of the Pampean plain streams and rivers (Argentina). *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 28, 259-262.
- Baussant, T., Sanni, S., Jonsson, G., Skadsheim, A., & Borseth, J. (2001). Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(6), 1175-1184.
- Benzie, I.F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Bergen, B. J., Nelson, W. G., Quinn, J. G., & Jayaraman, S. (2001). Relationships among total lipid, lipid classes, and polychlorinated biphenyl concentrations in two indigenous populations of ribbed mussels (*Geukensia demissa*) over an annual cycle. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(3), 575-581.
- Bhattacharyya, S., Klerks, P. L., & Nyman, J. A. (2003). Toxicity to freshwater organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. *Environ. Pollut.*, 122(2), 205-215.

- Bilos, C., Colombo, J. C., & Rodriguez Presa, M. J. (1998). Trace metals in suspended particles, sediments and asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de La Palta estuary, Argentina. *Environ. Pollut.*, 99, 1-11.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37(911), 917.
- Boryslawskij, M., Garrood, T., Stanger, M., & Pearson, T. (1988). Role of lipid/water partitioning and membrane composition in the uptake of organochlorine pesticides into a freshwater mussel. *Mar. Environ. Res.*, 24, 57-61.
- Boschi, E. E. (1963). Observaciones sobre la morfología externa del camarón *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896) Crustacea, Palaemonidae. *Physis.*, 24(67), 165-179.
- Boschi, E. E. (1981). Decapoda: Natantia. En: E. E. Boschi (Ed.), *Fauna Argentina de agua dulce*. (pp. 19-61). Buenos Aires, Argentina: FECIC.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72, 248-254.
- Brusca, R. C. & Brusca, G. J. (1990). Phylum Arthropoda: The Crustaceans. En: A. D. Sinaver (Ed.), *Invertebrates* (pp. 595-666). Sunderland, Massachusetts, USA: Sinaver Associates Inc.
- Capuzzo, J. M. & Lancaster, B. A. (1981). Physiological effects of South Louisiana crude oil on larvae of the American lobster (*Homarus americanus*). En: F. J. Vernberg, A. Calabrese, F. P. Thurberg, & W. B. Vernberg (Eds.), *Biological Monitoring Of Marine Pollutants* (pp. 405-423). New York, USA: Academic Press.
- Capuzzo, J. M., Lancaster, B. A., & Sasaki, G. C. (1984). The effects of petroleum hydrocarbons on lipid metabolism and energetics of larval development and metamorphosis in the american lobster (*Homarus americanus*, Milne Edwards). *Mar. Environ. Res.*, 14, 201-228.
- Capuzzo, J. M. (1985). Biological effects of petroleum hydrocarbons on marine organisms: Integration of experimental results and predictions of impacts. *Mar. Environ. Res.*, 17(2), 272-276.
- Capuzzo, J. M. & Leavitt, D. F. (1988). Lipid composition of the digestive glands of *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* in response to pollutant gradients. *Mar. Ecol.*, 46, 139-145.
- Capuzzo, J. M., Farrington, J. W., Rantamake, P., Clifford, C. H., Lancaster, B. A., Leavitt, D. F., & Jia, X. (1989). The relationship between lipid composition and seasonal differences in the distribution of PCBs in *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, 28, 259-264.
- Castuma, C. E. & Brenner, R. R. (1983). Effect of fatty acid deficiency on microsomal membrane fluidity and cooperativity of UDP-glucuronyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta*, 729(1), 9-16.
- Castuma, C. E., Brenner, R. R., De Luca Gattás, E., Schriber, S., & Lamy-Freund, T. M. (1991). Cholesterol modulation of lipid-protein interactions in liver microsomal membrane. A spin label study. *Biochemistry*, 30, 9492-9497.
- Chambers, J. E., Heitz, J. R., McCorkle, F. M., & Yarbrough, J. D. (1978). The effects of crude oil on enzymes in the brown shrimp (*Penaeus sp.*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 61C, 29-32.
- Chambers, J. E., Heitz, J. R., McCorkle, F. M., & Yarbrough, J. D. (1979). Enzyme activities following chronic exposure to crude oil in a simulated ecosystem. 1. American oysters and brown shrimp. *Environ. Res.*, 20(1), 133-139.
- Chance, B. (1954). Special methods: Catalase. En: R. Glick (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis* (pp. 408-424). New York, USA: Wiley-Interscience.

- Charniaux Cotton, H., Payen, G. G., & Gisburger-Vogel, T. (1992). Arthropoda-Crustacea: sexual differentiation. En: K. G. Adiyodi & R. G. Adiyodi (Eds.), Reproductive biology of invertebrates. (pp. 281-324). New York, USA: John Wiley & Sons.
- Christie, W. W. (1982). A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J. Lipid Res.*, 23(7), 1072-1075.
- Clarke, A., Brown, J. H., and Holmes, L. J. (1990) The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in relation to embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol.*, 96B, 505-511.
- Clements, W. H. (2000). Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: An overview. *J. Aquat. Ecol. Stress Rec.*, 7, 113-116.
- Coleman, R. A., Lewin, T. M., Van Horn, C. G., & González-Baró, M. R. (2002). Do long-chain Acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *Rec. Adv. Nut. Sci.*, 2123-2126.
- Collins, P. A. & Paggi, J. C. (1998). Feeding ecology of *Macrobrachium borellii* (Nobili) (Decapoda: Palaemonidae) in the flood valley of the River Paraná, Argentina. *Hydrobiologia*, 362, 21-30.
- Colombo, J. C., Pelletier, E., Brochu, C., & Khalil, M. (1989). Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Rio de La Plata estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.*, 23, 888-894.
- Colombo, J. C., Barreda, A., Bilos, C., Cappelletti, N., Demichelis, S., Lombardi, P., Migoya, M. C., Skorupka, C., & Juárez, G. (2004). Oil spill in Río de La Plata estuary, Argentina:1- Biogeochemical assessment of waters, sediments, soils, and biota. *Environ. Pollut. (en prensa)*.
- Commendatore, M., Esteves, J. L., & Colombo, J. C. (2000). Hydrocarbons in costal sediments of Patagonia, Argentina. levels and probable sources. *Mar. Pollut. Bull.*, 11, 989-998.
- CONAMA (1994). Manual de evaluación de impacto ambiental: Conceptos y antecedentes básicos. Chile, Santiago: Comisión Nacional del Medio Ambiente.
- Cooney, J. D. (1995). Freshwater test. En: G. M. Rand (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. (pp. 71-102). Bristol, USA: Taylor & Francis.
- Correia, A. D., Costa, M. H., Luis, O. J., & Livingstone, D. R. (2003). Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 289, 83-101.
- Cucci, T. L. & Epitafio, C. E. (1979). Long-term effects of water-soluble fractions of Kuwait crude oil on the larval and juvenille development of the mud crab *Eurypanopeus depressus*. *Mar. Biol.*, 55, 215-220.
- Cuculescu, M., Pearson, T., Hyde, D., & Bowler, K. (1999). Heterothermal acclimation: An experimental paradigm for studying the control of thermal acclimation in crabs. *Proc.Nat.Acad.Sci.*, USA 1, 96(11), 6501-6505.
- Dandapat, J., Chainy, G. B., & Rao, K. J. (2000). Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 127C(1), 101-115.
- De-Coen, W. M. & Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. 2. Digestive enzyme activity in *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. *Chemosphere*, 35(5), 1053-1067.
- de Knecht, J., Stroomberg, G., Tump, C., Helms, M., Verweij, R., Commandeur, J., van Gestel, C., & van Straalen, N. (2001). Characterization of enzymes involved in biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in terrestrial isopods. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(7), 1457-1464.

- Di Giulio, R. T., Benson, W. H., Sanders, B. M., & Van Veld, P. A. (1995). Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. En: G. M. Rand (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. (pp. 523-561). Bristol, USA: Taylor & Francis.
- Di Toro, A. H., Bergman, H. L., Meyer, J. S., Paquin, P. R., & Santore, R. C. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 2383-2396.
- Díaz de Toranzo, E. G. (1990). Absorción de tóxicos. Un concepto básico en toxicología. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*, 24(4), 375-383.
- Dodds, P. F. (1991). Incorporation of xenobiotic carboxylic acids into lipids. *Life Sci.*, 49(9), 629-649.
- Elumalai, M. & Balasubramanian, M. P. (1997). Effect of naphthalene on carbohydrate metabolism during vitellogenesis in marine edible crab, *Scylla serrata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59, 989-993.
- Elumalai, M. & Balasubramanian, M. P. (1999). Effect of naphthalene on phosphatases and esterase in muscle and ovary of intermoult marine edible female crab, *Scylla serrata*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 111(14), 371-376.
- Ernst, R. J., Ratnayake, W. M. N., Farquharson, T. E., Ackman, R. G., & Tidmarsh, W. G. (1987). Tainting of finfish by petroleum hydrocarbons. *Environmental Studies Research Series* (pp. 150). Ottawa, Canada.
- Ernst, R. J., Carter, J., & Ratnayake, W. M. N. (1989). Tainting and toxicity in sea scallops (*Placopecten magellanicus*) exposed to the water-soluble fraction of scotian shelf natural gas condensate. Environment Canada, Conservation and Protection, Marine Environment Protection Branch, Report EE-116, section 2 Ottawa.
- F. C. S. (1994). Calidad de las aguas. Franja Costera Sur. Informe de avance. Buenos Aires, Argentina: Servicio de Hidrografía Naval.
- Fisher, W. S. & Clark, W. H., Jr. (1983). Eggs of *Palaemon macrodactylus*: I. Attachment to the pleopods and formation of the outer investment coat. *Biol. Bull.*, 164, 189-200.
- Fisher, W. S. & Foss, S. S. (1993). A simple test for toxicity of number 2 fuel oil and oil dispersants to embryos of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Mar. Pollut. Bull.*, 26, 385-391.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Gagnon, M. M. & Holdway, D. A. (1999). Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 44, 92-99.
- Gallego, A., Cargill, L. H., Heath, M. R., Hay, S. J., & Knutsen, T. (1995). An assessment of the immediate effect of the Braer oil-spill on the growth of herring larvae using otolith microstructure analysis. *Mar. Pollut. Bull.*, 30(8), 536-542.
- García Martínez, P. & Livingstone, D. R. (1995). Benzo(a)pyrene-dione-stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Environ. Res.*, 39, 185-189.
- García, F., Cunningham, M., Gonzalez-Baro, M. R., Garda, H. A., & Pollero, R. J. (2002). Effect of fenitrothion on the physical properties of crustacean lipoproteins. *Lipids*, 37(7), 673-679.
- García, F., González-Baró, M. R., Garda, H. A., Cunningham, M., & Pollero, R. J. (2004). Fenitrothion-induced structural and functional perturbations in the yolk lipoproteins of the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids*, 39(4), 389-396.

- Garda, H. A., Bernasconi, A., & Brenner, R. R. (1994a). Possible compensation of structural and viscotropic properties in hepatic microsomes and erythrocyte membranes of rats with essential fatty acid deficiency. *J. Lipid Res.*, 35(8), 1367-1377.
- Garda, H. A., Bernasconi, A. M., & Brenner, R. R. (1994b). Influence of membrane proteins on lipid matrix structure and dynamics. A differential polarized phase fluorometry study in rat liver microsomes and erythrocyte membranes. *An. Asoc. Quím. Arg.*, 82(4), 305-323.
- Gerhardt, A., Janssens de Bisthoven, L., Mo, Z., Wang, C., Yang, M., & Wang, Z. (2002). Short-term responses of *Oryzias latipes* (Pisces: Adrianichthyidae) and *Macrobrachium nipponense* (Crustacea: Palaemonidae) to municipal and pharmaceutical waste water in Beijing, China: survival, behavior, biochemical biomarkers. *Chemosphere*, 47, 35-47.
- GESAMP (1993). Impact of oil and related chemicals on the marine environment. Reports and studies No. 50. London, UK: IMO.
- Geyer, H. J., Scheunert, I., Brüggemann, R., Steinberg, C., Korte, F., & Kettrup, A. (1991). QSAR for organic chemical bioconcentration in *Daphnia*, algae, and mussels. *Sci. Total Environ.*, 109/110, 387-394.
- Giese, A. C. & Pearse, J. S. (1974). Reproduction of marine invertebrates. New York, USA: Academic Press.
- Glas, P., Courtney, L., Rayburn, J., & Fisher, W. (1997). Embryonic coat of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Biol. Bull.*, 192, 231-242.
- Glegg, G. A. & Rowland, S. J. (1996). The Braer oil spill-hydrocarbon concentrations in intertidal organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 32(6), 486-492.
- Gomez Diaz, G. (1987). Effect of environmental embryonic temperature on larval development of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 114, 39-47.
- Gonzalez-Baró, M. R. & Pollero, R. J. (1988). Lipid characterization and distribution among tissues of the freshwater crustacean *Macrobrachium borellii* during an annual cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B, 711-715.
- González-Baró, M. R., Irazú, C. E., & Pollero, R. J. (1990). Palmitoyl-CoA ligase activity in hepatopancreas and gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97B(1), 129-133.
- González-Baró, M. R. & Pollero, R. J. (1993). Palmitic acid metabolism in hepatopancreas of the freshwater crustacean *Macrobrachium borellii* during an annual cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B, 71-75.
- González-Baró, M. R., Garda, H. A., & Pollero, R. J. (1997). Effect of fenitrothion on hepatopancreas microsomal membrane fluidity in *Macrobrachium borellii*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 58, 133-143.
- González-Baró, M. R. & Pollero, R. J. (1998). Fatty acid metabolism of *Macrobrachium borellii*: dietary origin of arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119B(3), 747-752.
- González-Baró, M. R., Heras, H., & Pollero, R. J. (2000). Enzyme activities involved in lipid metabolism during embryonic development of *Macrobrachium borellii*. *J. Exp. Zool.*, 286(3), 231-237.
- Gore, R. H. (1985). Molting and growth in decapod larvae. En: A. M. Wenner (Ed.), *Larval Growth*. (pp. 52-65). Rotterdam Netherlands: A. A. Balkema.
- Gowland, B. T., Moffat, C. F., Stagg, R. M., Houlihan, D. F., & Davies, I. M. (2002). Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar. Environ. Res.*, 54, 167-177.
- Graça, M. A. S., Rodrigues-Capítulo, A., Ocón, C., & Gómez, N. (2002). In situ test for water quality assessment: a case study in Pampean rivers. *Water Res.*, 36, 4033-4040.

- Habig, W., Pabst, M., & Jakoby, W. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249(22), 7130-7139.
- Hamdoum, A., Griffin, F., & Cherr, G. (2002). Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter. *Aquat. Toxicol.*, 61, 127-140.
- Hartman, M. J. (1992). Nutritional analysis and effect of crude oil on the larval development of *Hemigrapsus oregonensis*. *Northwest Sci.*, 66, 111-115.
- Hartman, M. J. & Sulkin, S. (1999). Effects of prior exposure to petroleum hydrocarbon contamination during brooding on the subsequent larval development of the brachyuran crab *Hemigrapsus oregonensis*. *J. Crust. Biol.*, 19(4), 690-698.
- Hauerland, N. H. (1997). Transport and utilization of lipids in insect flight muscles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117B(4), 475-482.
- Hedtke, S. F. & Puglisi, F. A. (1982). Short-term toxicity of five oils to four freshwater species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 11(4), 425-430.
- Heras, H., Ackman, R. G., & Macpherson, E. J. (1992). Tainting of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by petroleum hydrocarbons during a short-term exposure. *Mar. Pollut. Bull.*, 24(6), 310-315.
- Heras, H., Zhou, S., & Ackman, R. G. (1995). Plastic bags for stable storage of the water-soluble fraction of crude petroleum used in aquatic environment toxicity and tainting studies. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 55, 597-602.
- Heras, H., González-Baró, M. R., & Pollero, R. J. (2000). Lipid and fatty acid composition and energy partitioning during embryo development in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids*, 35(6), 645-651.
- Herman, D. C., Inniss, W. E., & Mayfield, C. I. (1991). Toxicity testing of aromatic hydrocarbons utilizing a measure of their impact on the membrane integrity of the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 874-881.
- Holland, D. L. (1978). Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. En: D. C. Mallins & J. R. Sargent (Eds.), *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology* (pp. 85-123). London: Academic Press.
- Hose, J. E., McGurk, M. D., Marty, G. D., Hinton, D. E., Brown, E. D., & Baker, T. T. (1996). Sublethal effects of the Exxon Valdez oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic, and histopathological assessments, 1989-1991. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53, 2355-2365.
- Hyne, R. V. & Maher, W. A. (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicities that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 54, 366-374.
- IAFMM (1979). Recommended method of analysis for determination of moisture in fish meal. International Association of Fish Meal Manufacturers Technical Bulletin.
- Irazú, C. E., Gonzalez Baró, M. R., & Pollero, R. J. (1992). Effect of environmental temperature on mitochondrial β -oxidation activity in gills and hepatopancreas of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102B, 721-725.
- Ishizuka, M., Sakiyama, T., Iwata, H., Fukushima, M., Kazusaka, A., & Fujita, S. (1998). Accumulation of halogenated aromatic hydrocarbons and activities of cytochrome P450 and glutathione S-transferase in crabs (*Eriocheir japonicus*) from Japanese rivers. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(8), 1490-1498.

- Jalihal, D. R., Sankolli, K. N., & Shenoy, S. (1993). Evolution of larval development patterns and the process of fresh waterization in prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 65(3), 365-376.
- Johns, D. M. & Pechenik, J. A. (1980). Influence of water-accomodated fraction no.2 fuel oil on energetics of *Cancer irroratus* larvae. *Mar. Biol.*, 55(4), 247-254.
- Jüingwirth, M. (1979). The superficial sediments: their characterization and distribution. En: H. Loffer (Ed.), *Neusiedlersee: the Limnology of a Shallow Lake in Central Europe* (pp. 139-144). The Hague, Boston, London, UK: W. Junk.
- Karim-Malka, R., Muñoz, P., & Ceccaldi, H. (1983). Electrophoresis study of hemolymph proteins of *Idotea balthica basteri* (Crustacea: Isopoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B(3), 433-440.
- Knights, K.M. & Drogemuller, C. J. (2000). Xenobiotic-CoA ligases: kinetic and molecular characterization. *Curr. Drug Metab.*, 1(1), 49-66.
- Kühnhold, W. W. (1977). The effect of mineral oils on the development of eggs and larvae of marine species. A review and comparison of experimental data in regard to possible damage at sea. *Réun. Cons. Int. Explor. Mer.*, 171, 175-183.
- Lakowicz, J. R., Prendergast, F. G., & Hogen, D. (1979). Fluorescence anisotropy measurements under oxygen quenching conditions as a method to quantify the depolarizing rotations of fluorophores. Application to diphenylhexatriene in isotropic solvents and in lipid bilayers. *Biochemistry*, 18, 520-527.
- Landrum, P. F. (1988). Toxicokinetics of organic xenobiotics in the amphipod, *Pontoporeia hoyi*: role of physiological and environmental variables. *Aquat. Toxicol.*, 12, 245-271.
- Lee, W. Y. & Nicol, J. A. (1980). Toxicity of a fuel oil to the eggs of *Parhyale hawaiiensis* and *Amphithoe valida* (Amphipoda). *Mar. Environ. Res.*, 3(4), 297-305.
- Lee, W. Y., Macko, S. A., & Nicol, J. A. (1981). Changes in nesting behavior and lipid content of marine amphipod (*Amphithoe valida*) to the toxicity of a N°2 fuel oil. *Water Air Soil Pollut.*, 15(2), 185-195.
- Livingstone, D. R., Moore, M. N., Lowe, D. M., Nasci, C., & Farrar, S. V. (1985). Responses of the cytochrome P-450 monooxygenase system to diesel oil in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and the periwinkle, *Littorina littorea* L. *Aquat. Toxicol.*, 7, 79-91.
- Livingstone, D. R., Lips, F., Martinez, P. G., & Pipe, R. K. (1992). Antioxidant enzymes in digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 112, 265-276.
- Livingstone, D. R. (1998). The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120A, 43-49.
- Livingstone, D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42(8), 656-666.
- Lodish, H., Brek, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Dranell, J. (2002). Protein sorting: organelle biogenesis and protein secretion. En: H. Lodish, A. Brek, S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, & J. Dranell (Eds.), *Molecular Cell Biology* 4th edition (pp. 675). USA: W.H. Freeman.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Marangos, C. & Vincent, M. (1988). Descriptive and biometrical study of the eggs of the grey shrimp *Crangon crangon* (L.) (Crustacea: Decapoda) during embryogenesis. *Umi.Mer.*, 26, 53-60.

- Marra, C. A., de Alaniz, M. J., & Brenner, R. R. (1986). Modulation of delta 6 and delta 5 rat liver microsomal desaturase activities by dexamethasone-induced factor. *Biochem. Biophys. Acta.*, 879, 388-393.
- McCarthy, J. F. & Shugart, L. R. (1990). Biological markers of environmental contamination. En: J. F. McCarthy & L. R. Shugart (Eds.), *Biomarkers of environmental contamination*. (pp. 3-14). Boca Raton, Florida, USA: Lewis Publishers.
- McIntosh, T. J., Simon, S. A., & MacDonald, R. C. (1980). The organization of n-alkanes in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 597, 445-463.
- Mendes da Silva, E., Campos Peso-Aguilar, M., Teixeira Navarro, M. F., & de Barros e Azevedo Chastinet, C. (1997). Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(1), 112-118.
- Mitchell, F. & Holdway, D. A. (2000). The acute and chronic toxicity of the dispersants corexit 9527 and 9500, water accommodated fraction (WAF) of crude oil, and dispersant enhanced WAF (DEWAF) to *Hydra viridissima* (Green hydra). *Wat. Res.*, 34(1), 343-348.
- Moore, M. N. & Farrar, S. V. (1985). Effects of polynuclear aromatic hydrocarbons on lysosomal membranes in molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 17(2-4), 222-225.
- Moore, M. N., Livingstone, D. R., Widdows, J., Lowe, D. M., & Pipe, R. K. (1987). Molecular, cellular and physiological effects of oil-derived hydrocarbons on molluscs and their use in impact assessment. *Environmental effects of north sea oil and gas developments*, B316 (1181), 603-623.
- Morales, R. B. C., Pfeiffer, W. C., Guimaraes, J. R. D., Borges, A. L. N., & Campos, A. N. (2000). Development of sediment toxicity test with tropical penaeid shrimps. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(7), 1881-1884.
- Moreno, V. J., Iribarne, O. O., Escalante, A. H., Aizpún, J. E., Janiot, L. J., Heras, H., Menone, M. L., Miglioranza, K., Pérez, C., Isacch, J. P., Abib, A. E., & Canepuccia, A. D. (2004). Monitoring coastal Río de La Plata oil spillage. *Trondheim Conference, Noruega*.
- Morrison, W. R. & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, 53, 600-608.
- Morrone, J. J. & Lopretto, E. C. (1995). Parsimony analysis of endemism of freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) from south America. *Neotropica*, 41, 3-8.
- Narasimha-Rao, C., Ponnuchamy, R., Shakuntala, K., & Ravichandra-Reddy, S. (1981). Fecundity and energetics of embryonic metabolism of *Caridina weberi* (de Man) (Decapoda: Atyidae). *Int. J. Invertebr. Reprod.*, 3(2), 75-85.
- Nazari, E. M., Rauh Müller, Y. M., & Ammar, D. (2000). Embryonic development of *Palaemonetes argentinus* Nobili, 1901 (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. *Crustaceana*, 73, 143-152.
- Neely, W. B., Branson, D. R., & Blan, G. E. (1974). Partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. *Environ. Sci. Technol.*, 8, 1113-1115.
- Neff, J. M., Cox, B. A., Dixit, D., & Anderson, J. W. (1976). Accumulation and release of petroleum-derived aromatic hydrocarbons by four species of marine animals. *Mar. Biol.*, 38(3), 279-289.
- Neff, J. M., Ostazeski, S., Gardiner, W., & Stejskal, I. (2000). Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(7), 1809-1821.
- Newman, M. C. & Unger, M. A. (2003). Molecular effects and biomarkers. En: M. C. Newman & M. A. Unger (Eds.), *Fundamentals of ecotoxicology* 2nd edition (pp. 113-129). USA: Lewis.

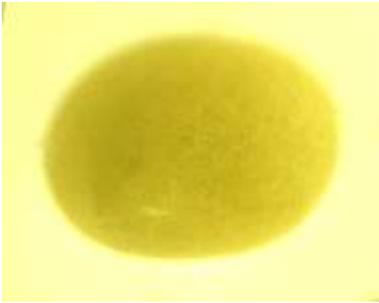
- Newman, M. C. & Unger, M. A. (2003). Introduction. En: M. C. Newman & M. A. Unger (Eds.), *Fundamentals of ecotoxicology* 2nd edition (pp. 3-20). USA: Lewis.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., & Datta, A. G. (2001). Antioxidant enzymes in brackish water oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *Sci. Total Environ.*, 281, 237-246.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., & Datta, A. G. (2001). Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbon. *Mar. Pollut. Bull.*, 52, 13-26.
- O'Clair, C. E. & Rice, S. D. (1985). Depression of feeding and growth rates of the seastar *Evasterias troschelii* during long-term exposure to the water-soluble fraction of crude oil. *Mar. Biol.*, 84, 331-340.
- Odinetz-Collart, O. & Rabelo, H. (1996). Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *J. Crust. Biol.*, 16, 684-688.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., & Cajaraville, M. (2002). Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.*, 58, 75-89.
- Pandian, T. J. (1970). Ecophysiological studies on the developing eggs and embryos of the European lobster *Homarus gammarus*. *Mar. Biol.*, 5, 154-167.
- Pollero, R. J., González-Baró, M. R., & Irazú, C. E. (1991). Lipid classes consumption related to fasting and thermal stress in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99B(1), 233-238.
- Porte, C., Solé, M., Albaigés, J., & Livingstone, D. R. (1991). Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus sp.* to organic pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 138-186.
- Rabalais, N. N. & Gore, R. H. (1985). Abbreviated development in decapods. En: A. M. Wenner (Ed.), *Larval Growth*. (pp. 67-126). Rotterdam Netherlands: Balkema, A. A.
- Rafi, G. M., Srinivas, T., Reddy, S. J., Reddy, D. C., & Ramamurthi, R. (1991). Acute and chronic toxicity of endosulfan to crab: effect on lipid metabolism. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 918-924.
- Ralph, P. & Burchett, M. (1998). Impact of petrochemicals on the photosynthesis of *Halophila ovalis* using chlorophyll fluorescence. *Mar. Pollut. Bull.*, 36(6), 429-436.
- Ramana-Rao, K. V. & Surendranath, P. (1991). Effect of kelthane on pH dependency of lipases in tissues of the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) under sublethal exposure. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 39(3), 205-209.
- Rand, G. M., Wells, P. G., & McCarty, L. S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. En: G. M. Rand (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. (pp. 3-67). Bristol, USA: Taylor & Francis.
- Rayburn, J. R., Glas, P. S., Foss, S. S., & Fisher, W. S. (1996). Characterization of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryo toxicity test using the water soluble fraction of number 2 fuel oil. *Mar. Pollut. Bull.*, 32(12), 860-866.
- Rayburn, J. R. & Fisher, W. S. (1997). Developmental toxicity of three carrier solvents using embryos of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 33(217), 221.
- Regoli, F. & Winston, G. W. (1998). Applications of a new method for measuring the total oxyradical scavenging capacity in marine invertebrates. *Mar. Environ. Res.*, 46(1-5), 439-442.

- Reid, D. J. & Mac Farlane, G. R. (2003). Potential biomarkers of crude oil exposure in the gasteropod mollusc, *Austrocochlea porcata*: laboratory and manipulative field studies. *Environ. Pollut.*, 126, 147-155.
- Rice-Evans, C. & Miller, N. (1997). Measurement of the antioxidant status of dietary constituents, low density lipoproteins and plasma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 57, 499-505.
- Rice, S. D., Short, J. W., & Karien, J. F. (1977). Comparative oil toxicity and comparative animal sensitivity. En: D. A. Wolfe (Ed.), *Fate and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Ecosystems and Organisms* (pp. 78-94). New York, USA: Pergamon Press.
- Ritchie, W. & O'Sullivan, M. (1994). ESGOSS, The environmental impact of the Braer. Edinburgh, United Kingdom: The Scottish Office.
- Rodrigues Capítulo, A., Ocon, C., Tangorra, M., Paggi, A. C., Cortelezzi, A., & Spaccesi, F. (2004). Estudios zoobentónicos recientes en el Río de La Plata. *Biología Acuática*, 21, 19-30.
- Rodríguez, M. C., Dadon, J. R., & Pedroso, F. L. (1995). Bioensayos con organismos del microplancton. En: E. C. Lopretto & G. Tell (Eds.), *Ecosistemas de Aguas Continentales. Metodología para su estudio*. Ediciones SUR.
- Rodríguez, E. M. & Pisanó, A. (1993). Effects of parathion and 2,4-D to eggs incubation and larvae hatching in *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Brachyura). *Comp. Biochem. Physiol.*, 104C, 71-78.
- Romay, C., Del Castillo, M. C., Pascual, C., Campos, A. M., Escobar, J., & Lissi, E. A. (1996). Evaluation of the total content of antioxidants in complex mixtures. *Free Radical Research in Latin America*, 48(1-2), 86-95.
- Rudneva, I. I. (1999). Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comp. Biochem. Physiol.*, 122C, 265-271.
- Sallustio, B. C., Meffin, P. J., & Knights, K. M. (1988). The stereospecific incorporation of fenoprofen into rat hepatocyte and adipocyte triacylglycerols. *Biochem. Pharmacol.*, 37(10), 1919-1923.
- Sanborn, H. R. & Malins, D. C. (1977). Toxicity and metabolism of naphthalene: A study with marine larval invertebrates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 154(2), 151-155.
- Sandeman, R. & Sandeman, D. (1990). Development and identified neural system in the crayfish brain. En: W. D. Krezts, J. Tautz, H. Heichert, & B. Mulloney (Eds.), *Frontiers in Crustacean Neurobiology* (pp. 498-508). Basel: Birkhäuser Verlag.
- Saravana Bhavan, P. & Geraldine, P. (2001). Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 70, 27-41.
- Sarojini, R., Reddy, P. S., Nagabhushanam, R., & Fingerman, M. (1993). Naphthlene-induced cytotoxicity on the hepatopancreatic cells of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 689-695.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R., & Fingerman, M. (1995). Naphthlene-induced atresia in the ovary of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 31, 76-83.
- Segel, H. (1998). Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. En: T. Braunbeck, D. E. Hinton, & B. Streit (Eds.), *Fish ecotoxicology* (pp. 1-38). Berlin, Germany: Birkhäuser Verlag.
- Shigehisa, H. & Shiraishi, H. (1998). Biomonitoring with shrimp to detect seasonal change in river water toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(4), 687-694.
- SHN-SOHMA (1989). Comisión administradora del Río de La Plata. Estudio para la evaluación de la contaminación en el Río de La Plata. Informe de Avance. Buenos Aires, Argentina.

- Sikkema, J., De Bont, J. A., & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 269(11), 8022-8028.
- Sikkema, J., De Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity hydrocarbons. *Micribiol. Rev.*, 59(2), 201-222.
- Sindermann, C. J. (1982). Implications of oil pollution in production of disease in marine organisms. *Phylos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B*, 297, 385-399.
- Siron, R., Rontani, J., & Giusti, G. (1987). Chemical characterization of a water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Toxicol. Environ. Chem.*, 15, 223-229.
- Solé, M., Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C. L., Chipman, J. K., Livingstone, D. R., & Albaiges, J. (1996). Effects of the Aegean Sea oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C(2), 257-265.
- Sollaud, E. (1923). Le développement larvaire des "Palaemoninae". I. Partie descriptive. La condensation progressive de l'ontogenèse. *Biol. Bull. France Belg.*, 57, 509-603.
- Spacie, A. & Hamelink, J. L. (1995). Bioaccumulation. En: G. M. Rand (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. (pp. 1052-1082). Bristol, USA: Taylor & Francis.
- Spector, A. A. & Yorek, M. A. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.*, 26(9), 1015-1035.
- Stagg, R. M., Robinson, C., McIntosh, A. M., Moffat, C. F., & Bruno, D. W. (1998). The effects of the "Braer" oil spill, Shetland isles, Scotland, on P450A in farmed atlantic salmon (*Salmo salar*) and the common dab (*Limanda limanda*). *Mar. Environ. Res.*, 46(1-5), 301-306.
- Staveland, J. T. (1979). Effects on hatching in *Littorina littorea* after an oil spill. *Mar. Pollut. Bull.*, 10(9), 255-258.
- Stegeman, J. J. (1985). Benzo[a]pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the western North Atlantic. *Mar. Biol.*, 89(1), 21-30.
- Stegeman, J. J. & Hahn, M. E. (1994). Biochemistry and Molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. En: D. C. Malins & G. K. Ostrander (Eds.), *Aquatic toxicology. Molecular, biochemical and cellular perspectives*. (pp. 87-206). Boca Raton, USA: Lewis Publishers.
- Stephens, S. M., Alkindi, A. Y., Waring, C. P., & Brown, J. A. (1997). Corticosteroid and thyroid responses of larval and juvenile turbot exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *J. Fish Biol.*, 50, 953-964.
- Stickney, J. A., Roberts, A. E., Silverman, D. M., & Schatz, R. A. (1989). The effect of *m*-xylene on rat lung benzo[a]pyrene metabolism and microsomal membrane lipids: comparison with *p*-xylene. *Toxicology*, 58, 155-165.
- Tatem, H. E. (1977). Accumulation of naphthalenes by grass shrimp: effects on respiration, hatching, and larval growth. En: D. A. Wolfe (Ed.), *Fate and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Ecosystems and Organisms* (pp. 201-209). New York, USA: Pergamon Press.
- Temara, A., Gulec, I., & Holdway, D. A. (1999). Oil-induced disruption of foraging behaviour of the asteroid keystone predator, *Coscinasterias muricata* (Echinodermata). *Mar. Biol.*, 133, 501-507.
- Thomas, R. E. & Rice, S. D. (1981). Excretion of aromatic hydrocarbons and their metabolites by freshwater and seawater *Dolly Varden* char. En: F. J. Vernberg, A. Calabrese, F. P. Thurberg, & W. B. Vernberg (Eds.), *Biological Monitoring of Marine Pollutants*. (pp. 425-448). New York, USA: Academic Press.

- Tran, K., Yu, C. C., & Zeng, E. (1997). Organic pollutants in the coastal environment off San Diego, California. 2. Petrogenic and biogenic sources of aliphatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(2), 189-195.
- Tricerri, M. A., Garda, H. A., & Brenner, R. R. (1994). Lipid chain order and dynamics at different bilayer depths in liposomes of several phosphatidylcholines studied by differential polarized phase fluorescence. *Chem. Phys. Lipids*, 71, 61-71.
- UNESCO (1982). Determinación de los hidrocarburos del petróleo en sedimentos. Manuales y Guías (pp. 1-35). Comisión Oceanográfica Intergubernamental.
- UNESCO (1984). Manual para la vigencia del aceite y de los hidrocarburos del petróleo disueltos o dispersos en el agua del mar y en las playas. Procedimientos para el componente petróleo del sistema de vigencia de la contaminación del mar (MARPOLMON-P). Manuales y Guías (pp. 1-37). Comisión Oceanográfica Intergubernamental.
- van Wezel, A. P. & Opperhuizen, A. (1995). Thermodynamics of partitioning of a series of chlorobenzenes to fish storage lipids, in comparison to partitioning phospholipids. *Chemosphere*, 31, 3605-3615.
- Vandermeulen, J. H., Hanrahan, J., & Hemsworth, T. (1980). Respiratory changes and stability of haemocyanin O₂ binding capacity in the crab *Cancer irroratus* exposed to Kuwait crude oil in sea water. *Mar. Environ. Res.*, 3(3), 161-170.
- Vinagre, T. M., Alciati, J. C., Regoli, F., Bocchetti, R., Yunes, J. S., Bianchini, A., & Monserrat, J. M. (2003). Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 135C, 67-75.
- Vonk, H. J. (1960). *The Physiology of Crustacea*. New York, USA: Academic Press.
- Walker, H., Kucklick, A., Steen, J. H., & Fritz, A. E. (1995). Oil spill chemicals in freshwater environments: Technical issues. *Proceedings of the 1995 International Oil Spill Conference*. 373-379.
- Wang, S. Y. & Stickle, W. B. (1988). Biochemical composition of the blue crab *Callinectes sapidus* exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Mar. Biol.*, 98, 23-30.
- Watkins, P. A. (1997). Fatty acid activation. *Prog. Lipid Res.*, 36(1), 55-83.
- Wear, R. G. (1974). Incubation in British decapod crustacea, and the effects of temperature on the rate and success of embryonic development. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 54, 745-762.
- Whipple, J. A., Eldridge, M. B., & Benville, P., Jr. (1981). An ecological perspective of the effects of monocyclic aromatic hydrocarbons on fishes. En: F. I. Vernberg, A. Calabrese, F. P. Thurberg, & W. B. Vernberg (Eds.), *Biological Monitoring Of Marine Pollutants*. (pp. 483-551). New York, USA: Academic Press.
- White, S. H., King, G. I., & Cain, J. E. (1981). Location of hexane in lipid bilayers determined by neutron diffraction. *Nature*, 290, 161-163.
- Winston, G. W. & Di Giulio, R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organism. *Aquat. Toxicol.*, 19, 137-161.
- Zhou, S., Heras, H., & Ackman, R. G. (1996). Role of adipocytes in the muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*) on the uptake, release and retention of water-soluble fraction of crude oil hydrocarbons. *Mar. Biol.*, 127, 545-553.

1



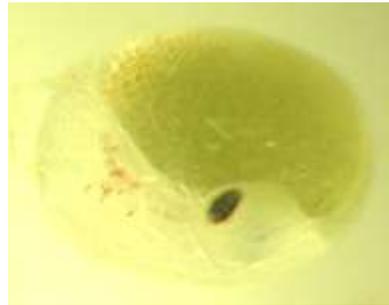
2



3



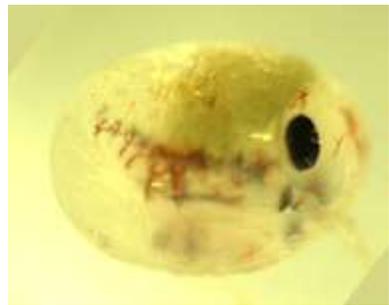
4



5



6



7



1 mm

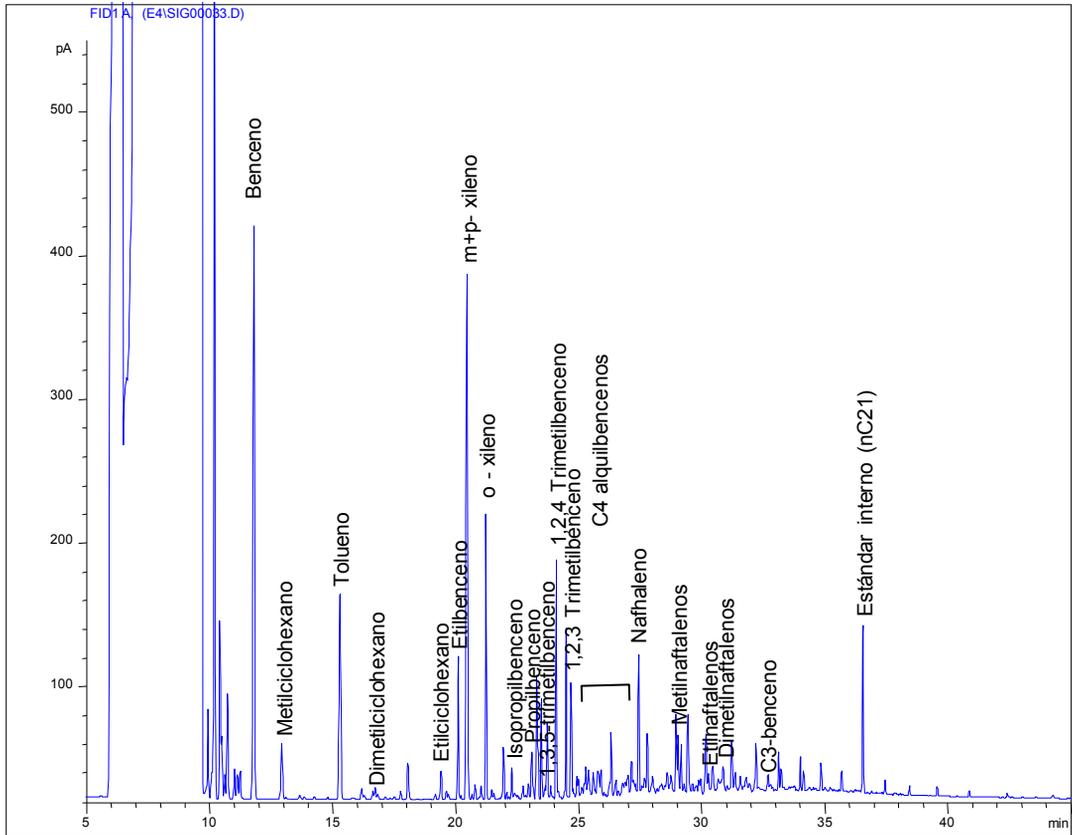


Figura IV.1. Cromatograma de la solución de WSF preparada a partir de petróleo crudo liviano Punta Loyola luego de 24 h de agitación y 48 h de decantación.

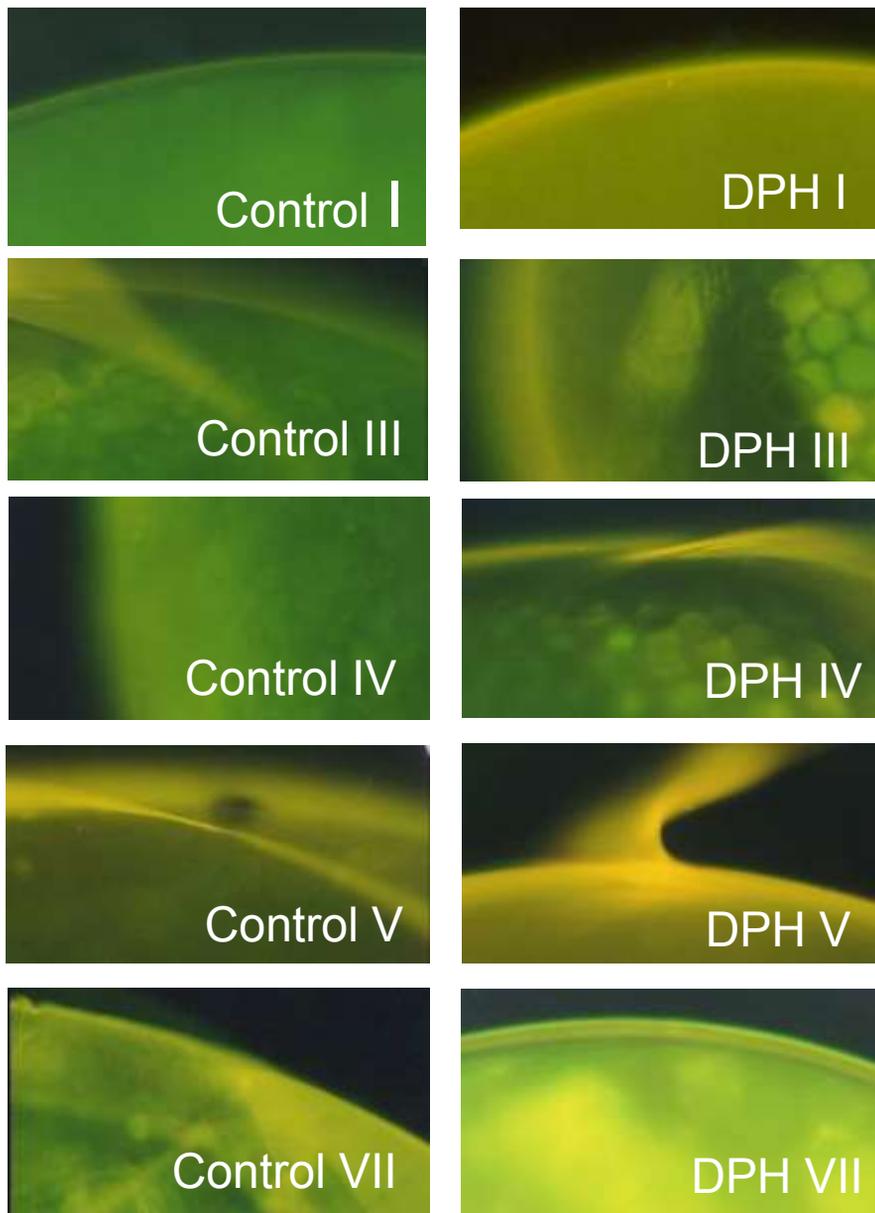


Figura IV.5. Ensayo de permeabilidad de la cáscara en huevos controles de diferentes estadios de desarrollo expuestos al fluoróforo DPH durante 24 h.