

Reservas energéticas e índices moleculares de condición en *Lima (Ctenoides) scabra* expuesta a lubricantes usados de motores de automóviles

Energetic reserves and molecular index of condition in *Lima (Ctenoides) scabra* exposed to crankcase oil

Edgar Zapata-Vívenes^{1*}, Gabriela Sánchez² y Leida Marcano¹

¹Universidad de Oriente, UDO. Departamento de Biología. Sucre, Venezuela. *Correo electrónico: ezapata@udo.edu.ve. ² Instituto Socialista de la Pesca y Acuicultura, ISOPESCA. Venezuela.

RESUMEN

Los lubricantes usados de motores de automóviles son fuente potencial de contaminantes que pueden afectar adversamente a la biota en áreas costeras. Los bivalvos que habitan asociados a arrecifes coralinos han sido reconocidos como organismos sensores para evaluar el impacto de sustancias químicas estresantes mediante el uso de biomarcadores, en especial cambios en su composición bioquímica. Con el objetivo de determinar los niveles de los sustratos energéticos (proteínas, lípidos y carbohidratos) e índices moleculares de condición (ARN/ADN y Proteína/ADN) en el manto de la almeja flama Lima (*Ctenoides*) *scabra* expuesta a una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV), se realizó un bioensayo estático con concentraciones subletales de 0, 10⁻³%, 10⁻²% y 10⁻¹%, durante 7 y 13 días. Los individuos fueron colectados en el golfo de Santa Fe, estado Sucre, Venezuela, y mantenidos en un sistema de acuarios, con renovaciones interdiarias de contaminantes y alimentos (microalgas), bajo condiciones controladas. El contenido de carbohidratos y proteínas, y los coeficientes moleculares de condición mostraron incrementos en los organismos expuestos a la FALUMV durante algunos de los períodos de exposición, sin embargo los niveles de lípidos totales no variaron en relación a los tratamientos evaluados. En el manto de *L. scabra* se evidenciaron ciertos ajustes bioquímicos de importancia, tales como la acumulación de macromoléculas energéticas e incremento en los niveles de los índices moleculares de condición, lo que es indicativo de una posible producción de proteínas vinculadas con la defensa bioquímica en presencia de mezclas complejas de xenobióticos.

Palabras clave: ARN/ADN, bivalvos, composición bioquímica, Proteínas/ADN, xenobióticos.

Recibido: 28/10/14 Aprobado: 03/06/15

ABSTRACT

Used crankcase oil of automobiles is a potential source of hazardous contaminants, which upon reaching coastal ecosystems may affect adversely the biota. The bivalve associated to coralline reefs have been recognized as biological sensors to assessing the impact of stressing chemical substances in these marine ecosystems by means of use of biomarkers, especially changes in chemistry composition. In order to determine energetic substrate levels (protein, lipid and carbohydrate) and molecular ratios of condition (RNA/DNA and Protein/DNA) in the mantle of fire scallop Lima (*Ctenoides*) *scabra* exposed to water-soluble fraction (WSF), obtained from a mixture of used lubricants of automobile engines, a static bioassay was realized with sublethal concentrations of 0, 10⁻³%, 10⁻²% y 10⁻¹%, during 7 and 13 days. Individuals were collected from Gulf of Santa Fe, Sucre state, Venezuela; and maintained in seawater aquaria system with changes of WSF and food (microalgae) inter-daily, under controlled conditions. Carbohydrate and protein levels, molecular ratios of condition showed increase in organisms exposed to WSF, during some exposure periods, however lipid levels did not differ in relation to the treatments. In the mantle of *L. scabra* certain biochemical adjustments of importance were evidenced, such as accumulation of energetic macromolecules and molecular ratios increased, indicating that production of protein may be associated to molecular defense against complex mixtures of xenobiotics.

Key words: RNA/DNA, bivalves, biochemical composition, Protein/DNA, xenobiotic.

INTRODUCCIÓN

Los lubricantes usados de motores de vehículos (LUMV) son mezclas de sustancias altamente contaminantes, constituidos principalmente por hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales pesados y compuestos policlorados (GESAMP, 1993; ATSRD, 1997). Una vez extraídos del cárter del motor son descargados de forma directa en acueductos de autolavados, estaciones de servicios y talleres mecánicos, teniendo como destino final la franja marino-costera. Los ecosistemas costeros de la región oriental de Venezuela no están exentos de ser impactados por la influencia de tales sustancias, evidenciándose en las últimas décadas ligeros incrementos del contenidos de sus constituyentes en sedimentos superficiales (Martínez, 2006; Dakdouk-Ortiz, 2009; Romero, 2010).

Los efectos que producen los compuestos hidrosolubles de los LUMV sobre la biota han sido demostrados bajo condiciones controladas, usando bioensayos toxicológicos agudos o crónicos. Se ha reportado que estas fracciones acuosas provocan alteraciones bioquímicas y celulares en diversas especies tales como: poliqueto *Eurythoe complanata* (Nuseti *et al.*, 2005), pez *Thalassophryne maculosa* (Marcano *et al.*, 2006), y en los bivalvos *Pinctada imbricata* (Nuseti *et al.*, 2004), *Lima scabra* (Zapata-Vívenes *et al.*, 2009) y *Perna viridis* (Martínez-Gil, 2011). Tales especies han sido propuestas como organismos centinelas en la evaluación de los cambios que se suscitan en las zonas marino-costeras, especialmente en presencia de contaminantes.

La almeja flama *Lima (Ctenoides) scabra* (Born, 1778), comúnmente llamada concha roja, es una especie representativa de zonas arrecifales de la región noreste de las costas Venezolanas. Este organismo habita incrustado a corales escleractíneos ramificados, dejando ver un manto rojizo franjeado con un velo de largos tentáculos llamativos, normalmente extendidos, que sobresalen desde sus conchas (Lodeiros y Freitas-Valbuena, 2008; Freitas *et al.*, 2012). El manto es un órgano de suma importancia en este bivalvo, ya que participa en la formación de la concha, actividad sensorial, movimientos para apertura y cierre de las valvas, incluso

para el nado. Este tejido reserva cantidades significativas de moléculas energéticas tales como carbohidratos, lípidos y proteínas (PT), destinadas a diversas funciones fisiológicas, crecimiento y reproducción; sin embargo el contenido y la utilización de tales moléculas pueden variar bajo condiciones de estrés crónico en presencia de contaminantes.

Los índices moleculares ARN/ADN y proteínas/ADN han sido de uso frecuente para estimar la condición nutricional de manera instantánea en distintos tejidos de peces e invertebrados (Moss, 1994; Bracho *et al.*, 2000); en eventos biológicos que demanden altos gastos energéticos (Nuseti y Morales, 1988; Lodeiros *et al.*, 1996) y posibles efectos de contaminantes (Acosta y Lodeiros, 2003; Narváez *et al.*, 2005; Zapata-Vívenes, 2013). Las relaciones entre los niveles de tales macromoléculas pueden indicar la condición metabólica, tasa molecular de crecimiento y síntesis de proteínas en los tejidos. En tal sentido, en este trabajo se evaluaron las concentraciones de los combustibles energéticos (PT, lípidos y carbohidratos totales) e índices moleculares de condición (ARN/ADN y PT/ADN) en el manto de *L. scabra* expuestos a concentraciones subletales de una fracción acuosa de aceites usados de motores de vehículos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Individuos sexualmente maduros, en su mayoría hembras, de *L. scabra* (5,5-6,5 cm longitud de valvas) fueron colectados manualmente en zonas coralinas del Golfo de Santa Fe (estado Sucre, Venezuela) a profundidades entre 2 y 5 m. Los organismos fueron mantenidos durante una semana en acuarios (50x 40x 40 cm) como período de aclimatación bajo condiciones controladas. Cada acuario estuvo contentivo a una densidad de 1 individuo por cada 2 litros de agua de mar filtrada con miliporo (45 µm), aeración constante (90-95%), salinidad (36 UPS), pH (7,8-8,2) y temperatura (25°C ± 2). La alimentación consistió de una mezcla de microalgas en proporciones similares (*Tetraselmis chuii* y *Chaetoceros gracilis*), la misma fue administrada *ad libitum* diariamente.

Bioensayos de exposición

Los organismos fueron expuestos a 0, 10^{-3} ; 10^{-2} y $10^{-1}\%$ de una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV), durante 7 y 13 días, en un sistema estático de acuarios, bajo condiciones controladas descritas anteriormente. La solución madre fue obtenida de una mezcla de lubricantes usados de cárter de cigüeñal de motores de vehículos y agua de mar filtrada, en una relación 1:9 v/v, dejándose reposar por 2 horas y que, posteriormente, se filtró a través de un papel Whatman N° 1 bajo un sistema de vacío. Las mezclas originales de lubricantes usados fueron recolectadas en una estación de gasolina local. Los recambios del agua de mar, alimento y solución de lubricantes fueron realizados de manera interdiaria, para mantener disponible la concentración de los contaminantes y remoción de heces y/o productos de desecho metabólicos. Transcurrido cada período, se procedió a disecar el manto de seis a ocho ejemplares por cada tratamiento, los mismos fueron almacenados a -40° C hasta el momento del análisis, por un período no mayor a una semana.

Biomoléculas

Las concentraciones de proteínas (PT) en el manto fueron valoradas según el método de Lowry *et al.* (1951), usando albumina de suero de bovino como estándar. El contenido de carbohidratos fue determinado por método desarrollado por Van Handel (1965), utilizando como estándar glucosa anhidra. La cantidad de lípidos totales fueron cuantificados gravimétricamente por métodos de Bligh y Dyer (1959). El ARN fue determinado por el método de revelación por Orcinol (Cambell y Sargent, 1967), y el ADN mediante la reacción de Difenilamina (Burton, 1956); ambos valorizados en fósforo inorgánico (Buckley y Bulow, 1987). Se usó como sustancia referencial ARN de levadura (*S. cerevicea*) y ADN de timo de bovino, respectivamente. En adición, se estimaron los cocientes de crecimiento instantáneo ARN/ADN y Proteínas/ADN (Bulow, 1987).

Análisis Estadísticos

Para el procesamiento y comparación de los datos se utilizó un análisis de varianza de dos

vías (Statgraphics Plus versión 5.1 ambiente Windows), para determinar las diferencias entre los tratamientos estudiados. Para contraste *a posteriori* se utilizó una prueba de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PT, carbohidratos y lípidos totales

En las biomoléculas determinadas, se evidenció un efecto de interacción entre las concentraciones de FALUMV y los períodos de exposición sobre el contenido de proteínas totales (PT) ($F_s=4,66$; $P<0,01$), mostrando los mayores promedios en organismos expuestos a las concentraciones de $10^{-2}\%$ durante los 7 días y los ejemplares expuestos a 10^{-3} y $10^{-2}\%$ durante los 13 días. PT en los organismos expuestos a la mayor concentración de exposición ($10^{-1}\%$) no mostró diferencias con respecto a los organismos controles en ambos períodos de exposición (Cuadro 1).

El contenido de carbohidratos mostró un ligero incremento en relación a las concentraciones de exposición ($F_s=7,79$; $P<0,001$) y los períodos de exposición ($F_s=34,97$; $P<0,001$), específicamente para las concentraciones 10^{-3} y $10^{-1}\%$ durante los 7 días, y 10^{-2} y $10^{-1}\%$ durante los 13 días. Los lípidos, sin embargo, no presentaron variación en relación a los tratamientos ni efectos durante los dos períodos de evaluados ($F_{s_t}=0,36$ y $F_{s_p}=0,05$ respectivamente; $P>0,05$), tal como se observa en el Cuadro 1.

En *L. scabra* se denota un incremento significativo en el contenido de los carbohidratos y PT totales en los organismos expuestos a la fracción acuosa de lubricantes usados de motores de vehículos (FALUMV) durante ambos períodos, posiblemente asociado a la activación de las rutas metabólicas, p. e. la síntesis de proteínas, y eventos bioquímicos que involucran altos gastos de energía como respuestas moleculares de homeostasis antes una condición de estrés químico, lo cual permite la tolerancia de los organismos a concentraciones bajas de la mezcla de contaminantes. Otro factor fundamental es la dieta de microalgas *T. chuii* y *C. gracilis* administrada *ad libitum* durante el ensayo, lo que favorece cualquier potencial déficit nutricional. Este detalle demuestra que

Cuadro 1. Niveles de proteínas, carbohidratos y lípidos en el manto de *L. scabra* expuesta a distintas concentraciones de FALUMV durante 7 y 13 días.

		Concentraciones (%)Días			
		0	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹
Proteínas	7	230,80 ± 36,61	195,37 ± 32,90	276,77 ± 49,65	241,34 ± 32,60
	13	192,49 ± 12,01	292,10 ± 95,83	250,91 ± 76,93	189,62 ± 11,72
Carbohidratos	7	7,07 ± 2,23	13,33 ± 1,39	8,67 ± 1,46	12,55 ± 1,62
	13	6,70 ± 0,50	7,32 ± 0,94	12,36 ± 1,03	12,34 ± 1,71
Lípidos	7	23,59 ± 12,69	22,14 ± 11,49	44,77 ± 30,79	26,91 ± 14,99
	13	22,81 ± 6,89	22,83 ± 15,43	35,11 ± 30,72	36,17 ± 31,15

Resultados son expresados como promedio ± DE.

Unidades: mg para PT, carbohidratos y lípidos están relacionados por gramo de tejido húmedo.

la tasa de ingesta de los alimentos disponible en el acuario no fue afectada por la mezcla de lubricantes.

En adición, los promedios en los niveles del cociente ARN/ADN confirman la condición de salud de los organismos expuestos a la mezcla de xenobióticos (Clemmesen, 1994; Chícharo y Chícharo, 2008; Olivar *et al.*, 2009). Se ha evidenciado que los índices de condición fisiológica tiende a incrementar en organismos presentes en hábitats con alta disponibilidad de materia orgánica (Belmar *et al.*, 2008).

Generalmente los organismos marinos cuando están expuestos a xenobióticos activan rutas de metabolización y desintoxicación que ameritan un gasto energético considerable, por lo que en muchas ocasiones el metabolismo basal es afectado (Rainbow, 1995). Es común encontrar en el manto de bivalvos colectados en su medio natural y cultivos, durante el período de alta disponibilidad de alimento, algunos cambios en los índices moleculares de condición y cantidades significativas de glucógeno en pos a los ciclos reproductivos y energéticos (Lodeiros *et al.*, 1996; Lodeiros y Himmelman, 1999). Los carbohidratos en el manto, al igual que los lípidos, cumplen un papel de vital importancia en la producción y desarrollo de gametos (Martínez, 1991).

ADN, ARN y Coeficientes

Los niveles de ADN se muestran poco disminuidos en sus promedios por acción de los incrementos de las concentraciones de exposición a FALUMV, no obstante no existen diferencias estadísticas significativas ($F_s=2,57$; $P>0,05$), presentando similar tendencia en los dos períodos de exposición ($F_s=0,87$; $P>0,05$). Contrariamente, el contenido de ARN incrementa sustancialmente sólo en el primer período de exposición (7 días) a las concentraciones 10⁻³ y 10⁻² ($F_s=27,5$; $P<0,01$), para alcanzar niveles basales durante los 13 días (Cuadro 2). El coeficiente ARN/ADN incrementó en relación a las concentraciones de las FALUMV para las concentraciones baja y media de exposición ($F_s=7,47$; $P<0,01$). A pesar de que, al final de los 13 días, se observó una reducción significativa en paralelo a las concentraciones de lubricante. De igual manera, el coeficiente Proteínas/ADN incrementó concomitantemente en relación a las concentraciones de exposición ($F_s=9,96$; $P<0,001$), manteniendo una respuesta similar para ambos períodos de exposición ($F_s=3,27$; $P>0,05$), observándose los mayores promedios a la concentración de 10⁻¹% durante los 13 días de exposición (Cuadro 2).

El incremento de los cocientes moleculares determinados en el manto de *L. scabra* expuestos a FALUMV en los períodos agudo (7

Cuadro 2. Niveles de ADN, ARN y coeficientes ADN/ARN y PT/ADN en el manto de *L. scabra* expuesto a FALUMV durante 7 y 13 días.

		Concentraciones (%) Días	0	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹
ADN	7		8,39 ± 1,13	5,65 ± 2,13	6,95 ± 2,38	5,08 ± 1,93
	13		7,51 ± 1,59	6,26 ± 2,05	8,33 ± 1,45	4,07 ± 1,67
ARN	7		21,79 ± 2,37	44,31 ± 1,68	69,48 ± 4,16	23,40 ± 1,32
	13		21,71 ± 2,01	22,99 ± 1,24	21,79 ± 1,81	23,40 ± 1,39
ARN/ADN	7		2,65 ± 0,52	8,74 2,96	11,79 ± 6,48	4,78 ± 0,69
	13		3,02 ± 0,77	4,19 ± 1,27	2,70 0,58	1,21 ± 1,26
PT/ADN	7		28,10 ± 6,70	39,50 ± 17,65	48,68 ± 32,4	48,93 ± 10,69
	13		30,60 11,12	49,17 26,95	30,67 9,24	67,64 3,34

Resultados son expresados como promedio ± DE. Unidades: mg para PT, y µg para ARN y ADN, relacionados por gramo de tejido húmedo.

días) y crónico (13 días) indica la activación en la producción de proteínas, como posible respuesta de defensa bioquímica en presencia de mezclas complejas de xenobióticos. Generalmente, los componentes que se presentan con mayor concentración y disponibilidad en las FALUMV son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y los metales pesados, por ejemplo Pb, Zn, Cu, Cr, Ni y Cd (Vasquez-Duhalt, 1989; Nusetti *et al.*, 2005); los mismos pueden ingresar con gran facilidad al manto de *L. scabra*. Los niveles de proteínas totales (PT) e índices moleculares de condición relacionados indican que posiblemente su síntesis se encuentre vinculada a la producción de moléculas con funciones altamente específicas, las cuales pudieran contrarrestar el estrés químico. Se ha demostrado que el ingreso de metales pesados en distintos órganos de los bivalvos puede activar la producción de metalotioneínas (MT) y otras proteínas de alto peso molecular, las cuales poseen una alta capacidad de enlazar iones metálicos, regulando sus niveles tóxicos y protegiendo a la células contra daños oxidativos (Zapata Vivenes y Nusetti, 2007; Lemus *et al.*, 2014).

El incremento en la síntesis de PT y ARN en organismos en presencia de las concentraciones subletales de la FALUMV coinciden con los resultados hallados por Miliou *et al.* (1998), donde después de exponer al pez guppie *Poecilia*

reticulata a un tratamiento a 1,5 mg/L y 0,5 mg/L de cadmio durante 10 y 20 días respectivamente, se observaron aumentos en las relaciones PT/ARN/ADN. De igual manera, Mckee y Knowles (1986) evidenciaron incrementos en la relación PT/ARN/ADN y lípidos/ADN después de exponer *Daphnia magna* a 0,5 µg/L del insecticida fenvalerato por 7 días, pero con descensos en los promedios de los radios PT/ARN y glucógeno/lípidos. El contenido de ADN en *L. scabra* expuestos a FALUMV denota una baja división celular en este tejido; tales promedios estables ayudan a incrementar los valores de los radios de crecimiento relacionados.

La toxicidad de la FALUMV depende de la concentración de los productos químicos presentes, los mismos varían dependiendo de la marca, tipo, uso de combustible del motor (gasolina o diesel), condición y uso prolongado del motor (Pruell y Quinn, 1988; ATSDR, 1997). Es común encontrar en FALUMV elevadas concentraciones de compuestos tales como naftalenos, benzaldehídos, alcoholes bencílicos, tiofenos, ftalatos, fenoles y diversos compuestos misceláneos; sustancias que pueden conllevar al desarrollo de perturbaciones oxidativas, sobrevivencia y reproducción en los organismos contaminados (Lotufo, 1997; Nusetti *et al.*, 2005).

De manera independiente, se ha demostrado que los constituyentes de las FALUMV pueden tener

efectos toxicológicos en distintos organismos. Por ejemplo, en individuos adultos de *C. finmarchicus* (copépodos) expuestos a naftaleno puede incrementar la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (Hansen *et al.*, 2008). En los bivalvos *P. imbricata*, *P. viridis* y *L. scabra* se reportan cambios en sus sistema antioxidante en organismos expuestos a fracciones acuosas de lubricantes y formulaciones de petróleos pesados (Nusetti *et al.*, 2004; Zapata-Vívenes *et al.*, 2009; Martínez-Gil, 2011).

L. scabra puede tolerar concentraciones relativamente bajas de la FALUMV, modulando los mecanismos de defensas moleculares en presencia de mezclas complejas contaminantes. Los niveles de proteínas encontrados pueden constituir una fuente de energía alternativa para el mantenimiento del organismo bajo condiciones de estrés metabólico, una vez que los carbohidratos y lípidos han sido agotados (Hawkins y Bayne, 1991). Yeung (2009) muestra que el cociente ARN/ADN, proteínas totales y el contenido de glucógeno en el mejillón verde *P. viridis* no son alterados por concentraciones subletales de cobre y cadmio, aunque se reducen los niveles de lípidos totales. Contrariamente en otros casos, el metabolismo puede ser mermado a objeto de compensar el efecto tóxico de sustancias extrañas en su entorno, trayendo como consecuencia cambios en su reproducción y crecimiento (Zapata-Vívenes, 2013).

La disminución del cociente ARN/ADN en los organismos expuestos a FALUMV durante el último período de experimentación muestra los efectos detrimentales que pueden provocar a largo plazo las concentraciones subletales usadas. Diversos estudios han reportado correlaciones negativas entre los radios moleculares de crecimiento en organismos marinos expuestos a agentes estresantes y tóxicos. Wang y Stickle (1988) reportan una relación inversa entre el contenido de proteínas, lípidos y ARN, y un decrecimiento en los radios ARN/ADN y PT/ADN en el cangrejo azul *Callinectes sapidus* expuesto a una fracción acuosa de petróleo durante 21 días de ensayo.

Similarmente, tanto el contenido de ARN como ARN/ADN decrecen en el pez guppie expuesto a 0,5 mg Cd/L por 30 días Miliou *et al.*, 1998. Acosta *et al.* (2013) observó un descenso en

el radio ARN/ADN en el mejillón *Perna viridis* expuesta a cadmio, relacionada con la regulación del metal y el posible gasto metabólico producto del proceso de contrarrestar el efecto tóxico. Antón *et al.* (2008) mostraron una significativa reducción en el índice ARN/ADN en *Donax denticulatus* expuesto a 2 mg/L de Cd durante 21 días, asociado a una reducción de la tasa de síntesis de ARN y gasto energético. Tong *et al.* (2010) reportaron una reducción en el índice ARN/ADN en el anfípodo *Melita longidactyla* expuesto a 1,2 diclorobenceno durante tres semanas de exposición. Kerambrum *et al.* (2012) observaron disminución en el mismo parámetro en el pez *Dicentrarchus labrax* expuesto a un petróleo crudo liviano.

CONCLUSIONES

En el manto de *L. scabra* se observó almacenamiento carbohidratos como principal sustrato energético y cambios en el contenido de ARN y PT, lo que presume ajustes en la condición fisiológica que garantizan la funcionabilidad del órgano, a pesar de las condiciones desfavorables en el entorno. Los cambios en los niveles de macromoléculas energéticas y radios ARN/ADN y PT/ADN evidencian ajustes bioquímicos de importancia en el manto de *L. scabra*, asociados a un incremento en la síntesis de proteínas como respuesta de defensa molecular en presencia de bajas concentraciones de mezclas complejas de xenobióticos.

LITERATURA CITADA

- Acosta, V. y C. Lodeiros. 2003. Índice ARN/ADN en poblaciones de la almeja *Tivela mactroides* (Bivalvia: Veneridae) provenientes de localidades con diferentes niveles de contaminación. Revista Científica FCV-LUZ, 13(5): 378-382.
- Acosta, V., C. Lodeiros, O. Nusetti y M. Lemus 2013. Bioacumulación y efecto del cadmio en juveniles del mejillón verde *Perna viridis* (L. 1758) (Mytiloidea: Mytilidae). Saber, 25 (1): 39-45.
- Antón, Y., M. Lemus y K. Chung. 2008. Índice ARN/ADN como indicador de la condición fisiológica en ejemplares de *Donax*

- denticulatus* expuestos a dosis subletales de cadmio. *Saber*, 20 (2): 149-154.
- ATSRD Agency for toxic substances and diseases registry. 1997. Used mineral-based crankcase oil CAS # 80020509. ToxFAQs. U.S. Department of Health and Human services. Atlanta, GA.
- Belmar, D., M. Lemus, J. Armas y C. Zapata. 2008. Efectos de los efluentes del central azucarero de Cumanacoa sobre la condición fisiológica y biomarcadores de contaminación en el gasterópodo *Pomacea glauca* (LINNÉ, 1758). *Rev. Invest. Mar.*, 29(1):33-38.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911- 917.
- Buckeley, L. J. and F. J. Bullow. 1987. Techniques for estimation of RNA, DNA, and protein in fish. En: Summerfelt R. C. y G. E. Hall (Ed): *Age and growth in fish*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 345-354.
- Burton, K. 1956. A study of the conditions and mechanisms of the diphenilamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62: 315-323.
- Bulow, F. J. 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish. En: R. C. Summerfelt y G. E. Hall (Ed): *Age and growth in fish*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 355-367.
- Bracho, B. M. A., B. M. I. Segnini, I. Viñoles y K. S. Chung. 2000. Efecto de la alimentación sobre la condición fisiológica del mejillón *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae), según el cociente ARN/ADN. *Rev. Biol. Trop.*, 48 (1): 171-182.
- Cambell, P. N. and J. R. Sargent, 1967. Estimation of ARN by orcinol method of mejbum (1939). En: *Techniques in protein biosynthesis*. Vol. I: Cambell P.N. y J.R Sargent, (Ed). Academic Press. London, pp. 301-302.
- Chícharo, M. A. and L. Chícharo. 2008. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived: indices in marine ecology. *Int. J. Mol. Sci.*, 9: 1453-1471.
- Clemmesen, C. 1994. The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. *Mar. Biol.*, 118: 377-382.
- Dakdouk-Ortiz, S. 2009. Determinación del contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los sedimentos superficiales del saco del golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciado en química. 74 p.
- Freites, L., C. Lodeiros, M. Guevara, J. Alió y C. Graziani. 2012. Experiencias en el cultivo de organismos marinos en el golfo de Cariaco, Venezuela. *Saber*, 24 (1): 5-24.
- GESAMP(IMO/FAO/UNESCO/WMO/IAEA/UN/ UNEP). 1993. Joint group of experts on the scientific aspects on marine pollution. Impact of oil and related chemical and wastes on the marine environment. GESAMP Reports and Studies No. 50, London, International Maritime Organization.
- Hansen, B., D. Altin, S. Vang, T. and A. Olsen. 2008. Effects of naphthalene on gene transcription in *Calanus finmarchicus* (Crustacea: Copepoda). *Aquat. Toxicol.*, 86(2):157-65.
- Hawkins, A. and B. Bayne. 1991. Nutrition of marine mussel: factors influencing the relative utilizations of protein and energy. *Aquaculture*, 94: 177-196.
- Kerambrun, E., S. Le Floch, W. Sanchez, H. Guyon, T. Meziane, F. Henry and R. Amara. 2012. Responses of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to acute concentrations of crude oil, as assessed by molecular and physiological biomarkers. *Chemosphere*, 87 (7): 692-702.
- Lemus, M., E. Evaristo, R. Salazar-Lugo y K. Chung. 2014. Modulación de la síntesis de metalotioninas en *Perna viridis* preexpuestos a cobre y expuestos a cadmio. *Saber*, 26 (1): 10-17.

- Lotufo, G. R. 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: Effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Mar. Environ. Res.*, 44: 149-166.
- Lodeiros, C., R. Fernandez, A. Bonmati, J. Himmelman and S. Chung. 1996. Relation of RNA/DNA ratios to growth for the scallop *Euvola (pecten) ziczac* in suspended culture. *Mar. Biol.*, 126:245-251.
- Lodeiros, C. and J. Himmelman. 1999. Reproductive cycle of the bivalve *Lima scabra* (Pterioidea:Limidae) and its association with environmental conditions. *Rev. Biol. Trop.*, 3: 411-418.
- Lodeiros, C. y L. Freites-Valbuena, 2008. Estado actual y perspectivas del cultivo de moluscos bivalvos en Venezuela. **En:** Lovatelli, A., A. Farias e I. Uriarte (Ed). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 135–150.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randal. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Marcano, L., O. Nusetti, E. Zapata-Vívenes, S. Nusetti and M. M. Esclapés. 2006. No. 6 Fuel oil effects on antioxidant enzymes and immunological responses in the fish *Thalassophryne maculosa* (Pisces: Batrochoideidae). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1 (1): 31-35.
- Martínez, G. 1991. Seasonal variation in biochemical composition of three size classes of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819. *Veliger*, 34: 335-343.
- Martínez, G. 2006. Contaminación por metales pesados en sedimentos superficiales de seis regiones marino-costera del oriente de Venezuela. Trabajo para optar a la categoría de profesor asociado. Departamento de Oceanografía, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Martínez-Gil, I. 2011. Estrés oxidativo, metabolismo aeróbico y anaeróbico en *Perna viridis* (Linnæus, 1758), pre-expuesto a concentraciones subletales de la fracción hidrosoluble de aceite usado de motor de vehículo. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Magíster Scientiarum en Biología Marina. Departamento de Biología Marina, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Mckee, M. and C. Knowles. 1986. Effects of fenvalerate on biochemical parameter, survival, and reproduction of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 12(1): 70-89.
- Miliou, H., N. Zaboukas and M. Moraitou-Apostolopoulou. 1998. Biochemical composition, growth, and survival of the guppy, *Poecilia reticulata*, during chronic sublethal exposure to cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 35(1):58-63.
- Moss, S. 1994. Use of nucleic acids as indicators of growth in juvenile white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.*, 120:359-367.
- Narváez, N., C. Lodeiros, O. Nusetti, M. Lemus y A. Maeda-Martínez. 2005. Incorporación, depuración y efecto del cadmio en el mejillón verde *Perna viridis* (L.1758) (Mollusca: Bivalvia). *Ciencias Marinas*, 31: 91-102.
- Nusetti, O. y D. Morales. 1988. Crecimiento en algunos tejidos del mejillón *Perna perna* (L.1758): composición de ADN, relaciones ARN/ADN y reservas energéticas. *Acta Cien. Ven.*, 39: 289-293.
- Nusetti, O., M. M. Esclapés, S. Nusetti, E. Zapata, L. Marcano y C. Lodeiros. 2004. Defensas inmunológicas y estrés oxidativo en el bivalvo marino *pinctada imbricata* expuesto a niveles subletales de fuel oil No. 6." *Interciencias*, 29(5): 1-6.
- Nusetti, O., E. Zapata-Vívenes, M. M. Esclapés and A. Rojas. 2005. Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae)

- exposed to used vehicle crankcase oil. Environ. Contam. Toxicol., 48(4): 1-9.
- Olivar, P. M., M. V. Díaz and M. A. Chícharo. 2009. Tissue effect on RNA:DNA ratios of marine fish larvae. Scientia Marina, 73(1):171-182.
- Pruell, R. and J. Quinn. 1988. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbon in crankcase oil. Environ. Poll., 49: 89-97.
- Rainbow, P. S. 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Mar. Poll. Bull., 31: 183-192.
- Romero, D. 2010. Distribución y comportamiento de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y pesticidas organoclorados en sedimentos superficiales del sector oriental del golfo de Cariaco, Venezuela. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título Magíster Scientiarum en Ciencias Marinas mención Oceanografía Química. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Sokal, R. and J. Rohlf. 1981. Biometry: The principles and practice of statistic in biological reasearch. Second Edition. W.H. Freeman & Co. New York. 859 p.
- Tong, E., J. Van de Merwe, J. Chiu and R. Wu. 2010. Effects of 1,2-dichlorobenzene on the growth, bioenergetics and reproduction of the amphipod, *Melita longidactyla*. Chromosphere, 80: 20-27.
- Van-Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. Anal. Biochem., 11: 256-265.
- Vazquez-Duhalt, R. 1989. Environmental impact of used motor oil. Sci. Total Environ., 79(1):1-23.
- Wang, S. Y. and W. B. Stickle. 1988. Biochemical composition of the blue crab *Callinectes sapidus* exposed to the water-soluble fraction of crude oil. Mar. Biol., 98(1): 23-30.
- Yeung, W. 2009. Evaluation of RNA/DNA ratio in the green-lipped mussel *Perna viridis* as a potential biomonitoring tool. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Philosophy at the University of Hong Kong.
- Zapata-Vívenes, E. and O. Nusetti. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. J. Shell. Res., 26 (2): 1-10.
- Zapata-Vívenes, E., G. Sánchez, O. Nusetti and L. Marcano. 2009. Modulations of antioxidant defenses in the fire scallop *Lima scabra* (Pterioidea: Limidae) exposed to used vehicle crankcase oil. 6 th SETAC Biennial Latin America Meeting. Lima, Perú.
- Zapata-Vívenes, E. 2013. *Eurythoe complanata* Pallas 1766 (*Polychaeta*: Amphinomidae) como organismo sensor de contaminación en costas del estado Sucre, Venezuela. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias Marinas. Universidad de Oriente. 160 p.