

ARTÍCULO

Variaciones temporales de las defensas antioxidantes e índices proteína:ADN y ARN:ADN en el poliqueto *Eurythoe complanata*

Temporal variations of antioxidant defenses and protein:DNA and RNA:DNA indices in the polychaete *Eurythoe complanata*

Edgar Zapata-Vívenes^{1*}, Osmar Nusetti¹ y Leida Marcano¹

¹Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Avenida Universidad, Cerro Colorado Cumaná, Venezuela. *ezapatavivenes@gmail.com

Abstract. - Some antioxidant responses and molecular index of growth (protein:DNA and RNA:DNA) were determined in the polychaete *Eurythoe complanata* collected from Gulf of Cariaco (Venezuela) during December 2009 ($26.03 \pm 0.64^{\circ}\text{C}$), February ($23.96 \pm 0.67^{\circ}\text{C}$), June ($27.82 \pm 0.50^{\circ}\text{C}$) and October 2010 ($29.93 \pm 0.37^{\circ}\text{C}$). Also, the number of individuals with signs of tissue regeneration was counted. Concomitantly, a bioassay of acclimatization was carried out at 24 and 28°C during 36 days. Muscular tissue was used to determine enzymatic activities of catalase (CAT), glucose-6-P dehydrogenase (G6PDH), glutathione-S-transferase (GST); oxidative damage (TBARS), metallothionein (MT) and thiols (-SH) concentrations. DNA, RNA and proteins (PT) concentrations and their related indexes were determined. During 'no upwelling' season (June and October 2010), when the mean temperature exceeds 28°C, there were increases in CAT, TBARS and DNA. G6PDH, GST, MT and -SH did not vary seasonally or in acclimatizing bioassays. Similarly, in this season a number of individuals collected with new setigers were observed. RNA:DNA and PT:DNA indices demonstrate a continuous growth of the species throughout the year and a significant increase of protein synthesis in low temperatures season (upwelling), respectively. Somatic growth, lipoperoxidative damage and antioxidant capacity in *E. complanata* are stimulated in seasons of maximal temperature.

Key word: Molecular indices, temperature, catalase, lipid peroxidation

Resumen. - Algunas respuestas antioxidantes e índices instantáneos de condición (proteínas:ADN y ARN:ADN) fueron determinados en el poliqueto *Eurythoe complanata* colectado en el Golfo de Cariaco (Venezuela) durante diciembre 2009 ($26,03 \pm 0,64^{\circ}\text{C}$); febrero ($23,96 \pm 0,67^{\circ}\text{C}$), junio ($27,82 \pm 0,50^{\circ}\text{C}$) y octubre 2010 ($29,93 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$). También se estimó el número de ejemplares colectados con señales de regeneración tisular. Paralelamente, fue llevado a cabo un bioensayo de aclimatación a 24 y 28°C por un lapso de 36 días. El tejido muscular se usó para determinar las actividades de las enzimas: catalasa (CAT), glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH), glutatión-S-transferasa (GST); y niveles de daño oxidativo (TBARS), metalotioneínas (MT) y grupos tioles totales (-SH). Además, fueron determinados los niveles de ADN, ARN y proteínas, y sus índices relacionados. En la temporada de no surgencia (junio y octubre 2010), caracterizada por temperaturas promedio que sobrepasan los 28°C, fueron observados incrementos en CAT, TBARS y ADN. Sin embargo, las actividades de G6PDH, GST, MT y -SH no presentaron diferencias estacionales ni variaron en los bioensayos de aclimatación. De igual forma, en la temporada de no surgencia se observó un mayor número de individuos con señales de regeneración. Los índices ARN:ADN y PT:ADN demuestran un crecimiento continuo de la especie durante todo el año y un aumento en la síntesis de proteínas sólo en temporadas de bajas temperaturas (surgencia), respectivamente. La capacidad antioxidante, el daño lipoperoxidativo y el crecimiento somático en *E. complanata* son estimulados en las temporadas de temperaturas máximas.

Palabras clave: Índices moleculares, temperatura, catalasa, peroxidación lipídica

INTRODUCCIÓN

Eurythoe complanata (Pallas, 1766) es un poliqueto errante de relativa abundancia en el golfo de Cariaco (Venezuela), que habita asociado a arrecifes coralinos, fondos arenosos someros, debajo de piedras y corales muertos (Liñero-Arana & Díaz 2010). *E. complanata* es una especie que ha sido utilizada como modelo biológico en la estandarización de protocolos ecotoxicológicos, a través de biomarcadores moleculares y celulares (sistema inmune y antioxidante, poder

de regeneración de tejidos, y la capacidad corporal de acumular xenobióticos) aplicados a la evaluación de sedimentos marino-costeros impactados por contaminantes (Méndez & Páez-Osuna 1998, Nusetti *et al.* 1998, 2005; Zapata-Vívenes *et al.* 2005, Vásquez-Núñez *et al.* 2007). Sin embargo, no existe información sobre sus respuestas bioquímicas basales mediadas por los cambios ambientales, en especialmente la temperatura.

Las temperaturas en el golfo de Cariaco varían asociadas a eventos de surgencia costera, oscilando entre 20 a 24°C durante enero a junio (surgencia), para luego observarse un ascenso de temperatura de 27 a 29°C a partir de julio y hasta principios de noviembre (no surgencia) (Penchaszadeh *et al.* 2000, Rueda-Roa & Muller-Karger 2013). Se conoce que las fluctuaciones térmicas que se registran en el agua de mar inciden directamente en la temperatura corporal de *E. complanata* (Kudenov 1974), siendo éste un factor ambiental influyente en la actividad basal y tasa metabólica de los organismos marinos (Guderley & St-Pierre 2002, Keller *et al.* 2004).

La temperatura del mar influye directamente el control respiratorio y crecimiento en los organismos; tales procesos fisiológicos pueden conllevar la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Abele & Puntarulo 2004, Buttemer *et al.* 2010, Freire *et al.* 2011). La sobreproducción de ERO puede causar daños a nivel molecular tales como peroxidación de los lípidos de membranas, daños al ADN e inhibición enzimática (Hermes-Lima 2004). Sin embargo, existen una gama de moléculas antioxidantes que pueden atenuar la acción de las ERO, por ejemplo compuestos ricos en grupos sulfhidrilos (glutación reducido-SH y metalotioneínas-MT) y las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutación reductasa (GR) y glutación peroxidasa (GPx). Adicionalmente, se encuentra la enzima glutación-S-transferasa (GST) que utiliza como sustrato al glutación reducido (GSH) para facilitar la ruta de desintoxicación de xenobióticos y de compuestos endógenos como lípidos peroxidados (Oakley 2011). También, la enzima glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH) produce NADPH y pentosas que funcionan como poder reductor para la enzima glutación reductasa (GR) y para la síntesis de ácidos nucleicos, respectivamente (Singh *et al.* 2012).

El crecimiento de los organismos es una medida integral de su metabolismo, siendo sensible a factores estresantes externos. *E. complanata* es un organismo de crecimiento corporal continuo con un alto poder de regeneración (Zapata-Vívenes 2001). Este proceso implica una inversión de moléculas energéticas vinculadas con la síntesis de biomoléculas destinadas a la división y crecimiento celular, lo que conlleva a cambios en su composición bioquímica (Yáñez-Rivera & Méndez 2014). De igual manera, la determinación de los niveles de macromoléculas relacionadas (proteínas, ARN y ADN) y sus respectivos cocientes se ha hecho de uso extensivo como índices moleculares de condición en organismos acuáticos (Nuseti & Morales 1988). Estos cocientes biomoleculares pueden ser afacetados por la

condición nutricional del organismo (Mendoza *et al.* 2002), cambios de la temperatura (Lemus & Chung 2006) y presencia de tóxicos (Zapata-Vívenes *et al.* 2015).

Se hace necesario conocer cómo pueden ser influidas las respuestas antioxidantes e índices instantáneos de condición por los cambios temporales de la temperatura, tales parámetros moleculares son comúnmente referidos como biomarcadores o herramientas para la evaluación de calidad ambiental. En referencia a lo antes expuesto, en esta investigación se evaluó como varían estacionalmente las respuestas antioxidantes, daño oxidativo a lípidos e índices moleculares de crecimiento en el poliqueto *E. complanata* colectados en distintas temporadas ambientales.

MATERIALES Y MÉTODOS

ORGANISMOS

Los ejemplares de *Eurythoe complanata* fueron colectados en aguas someras de la franja costera de la zona sur del Golfo de Cariaco, en las adyacencias de la ensenada de Turpialito (11°22'30"N, 64° 04'50"O), durante diciembre 2009 (26,03 ± 0,64°C), febrero (23,96 ± 0,67°C), junio (27,82 ± 0,50°C) y octubre 2010 (29,93 ± 0,37°C) (Fig. 1). Al mismo tiempo, se estimó el porcentaje individuos colectados con signos de regeneración y número de nuevos setígeros como índices de crecimiento.

Una vez transportados al laboratorio, a cada individuo se le disecó el tracto intestinal, y su porción muscular (tegumento) fue almacenada durante 3 días a -20°C. Durante los meses de colectas se usó un termógrafo para estimar la temperatura del agua de mar.

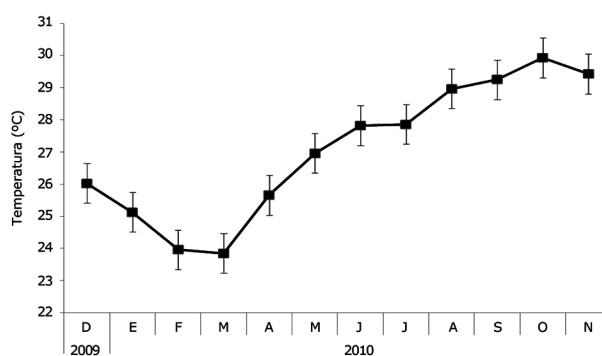


Figura 1. Registro de temperaturas durante diciembre 2009 a noviembre 2010 en el Golfo de Cariaco / Temperatures during December 2009 to November 2010 in the Gulf of Cariaco

BIOENSAYO REFERENCIAL

Dos grupos de organismos ($n= 20$; por triplicado) fueron mantenidos, por separados, en acuarios a diferentes temperaturas 24°C y 28°C (variación diaria entre $0,1$ a $0,6^{\circ}\text{C}$) por un período de 36 días. Tales temperaturas simulan los promedios en las épocas de surgencia y estratificación (no surgencia) que ocurren en el Golfo de Cariaco, respectivamente. Tanto en los organismos colectados en las distintas temporadas como en los ejemplares aclimatados a las dos temperaturas se procedió a medir los niveles de compuestos antioxidantes (metalotioneínas -MT y grupos sulfhidrilos totales -SH), daño oxidativo a lípidos, actividad enzimática de G6PDH, GST y CAT; ADN, ARN y proteínas, y sus respectivos cocientes relacionados. También fue estimado el porcentaje individuos con signos de regeneración

METALOTIONEÍNAS (MT)

Los tejidos se homogenizaron en proporción 1:8 en buffer Tris-HCl 20 mol L^{-1} pH 8,6, contenido de sacarosa 500 mmol L^{-1} , leupectina $10\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, ácido fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) $0,5\text{ mmol L}^{-1}$ y ditioneitol (DTT) 2 mmol L^{-1} a 4°C . El homogenizado fue centrifugado a 2.000 g por 30 min. Por cada mililitro del sobrenadante se le adicionó $1,5\text{ mL}$ de etanol absoluto (-20°C) y $80\text{ }\mu\text{L}$ de cloroformo, y luego se centrifugó a 6.000 g por 10 min (4°C). El sobrenadante resultante se mezcló con $40\text{ }\mu\text{L}$ de HCl al 37% y 3 mL de etanol frío, y fue mantenido a -20°C por 1 hora. Una nueva centrifugación se realizó a 6.000 g por 10 min. Posteriormente, el precipitado obtenido se resuspendió con etanol 87%, cloroformo 1% y buffer de homogenización, y posteriormente se centrifugó a 6.000 g por 10 min. El precipitado se mezcló con $150\text{ }\mu\text{L}$ de NaCl $0,25\text{ mol L}^{-1}$, $150\text{ }\mu\text{L}$ HCl $0,90\text{ mol L}^{-1}$ y $150\text{ }\mu\text{L}$ EDTA 4 mmol L^{-1} ; luego se agregó a las muestras una solución contentiva de NaCl 2 mol L^{-1} , ácido 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) a $0,4\text{ mmol L}^{-1}$ y buffer fosfato de sodio 200 mmol L^{-1} pH 8,6. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 30 min, luego se centrifugó a 3.000 g x 30 min. Se estimaron los niveles de MT ($\mu\text{moles de MT g}^{-1}$ de masa húmeda) utilizando una curva patrón de glutatión reducido (GSH) a 412 nm (Viarengo *et al.* 1997).

TIOLES TOTALES (-SH)

La determinación de tioles solubles se realizó por método de Ellman (1958). Se tomaron 100 mg de las distintas regiones corporales, se homogenizaron con 2 mL del buffer 100 mmol L^{-1} Tris ácido etilendiamino-tetracetato (EDTA) pH 8,0. Se

centrifugó a 5.000 g durante 5 min. Del sobrenadante obtenido, se tomaron $200\text{ }\mu\text{L}$ más $200\text{ }\mu\text{L}$ de ácido tricloroacético al 10% (ATC) y se colocó a 4°C por 15 min, luego se centrifugó durante 15 min a 2.000 g . Se tomaron $200\text{ }\mu\text{L}$ del sobrenadante y se le agregaron $800\text{ }\mu\text{L}$ de Tris-HCl pH 8,9 y $80\text{ }\mu\text{L}$ de DTNB. Posteriormente, fueron leídos en un espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm , usando GSH como sustancia de referencia.

PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La peroxidación lipídica se estimó por el protocolo propuesto por Ohkawa *et al.* (1979). Los tejidos fueron homogenizados en una concentración de 50 mg mL^{-1} en buffer fosfato de sodio 100 mmol L^{-1} pH 7,5; 4°C . El extracto se centrifugó a 4°C , 6.000 g por 20 min. Doscientos μL del homogeneizado se incubaron en baño de agua a 37°C con agitación constante durante 15 min. A cada tubo se le añadió $250\text{ }\mu\text{L}$ de una solución constituida por ATC 12,5% y HCl $0,8\text{ mol L}^{-1}$. Luego, se le agregó $500\text{ }\mu\text{L}$ de solución de ácido tiobarbitúrico al 1%. Se colocaron en un baño de agua a 90°C con agitación constante por 30 min, y posteriormente colocados en baño de hielo por 10 min. Luego, se centrifugó a 1.500 g durante 10 min a temperatura ambiente. Las sobrenadantes de las muestras fueron leídas a 535 nm . La concentración de las sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se calculó usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano como estándar.

ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

Para la determinación de las actividades enzimáticas se usó el protocolo propuesto por Nusetti *et al.* (2001). Los tejidos se homogenizaron en una relación 1:8 mL g^{-1} del buffer de Tris-HCl (hidroximetil-metilamina) 20 mmol L^{-1} pH 7,6 conteniendo EDTA 1 mmol L^{-1} , DTT 4 mmol L^{-1} , sacarosa 500 mmol L^{-1} , KCl 150 mmol L^{-1} y PMSF 1 mmol L^{-1} . El extracto resultante se centrifugó inicialmente a 2.000 g por 10 min a 4°C . El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10.000 g durante 30 min a 4°C . El volumen final colectado se usó como fuente de enzimas. La actividad de las enzimas antioxidantes se determinó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S, bajo condiciones de temperatura controlada a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Los ensayos enzimáticos fueron realizados por triplicado en un volumen final de $1,0\text{ mL}$.

Las estimaciones de pendiente y actividad enzimática específica (U g^{-1} de masa húmeda del tejido) se realizaron en el programa UV Winlab Lambda 25 bajo ambiente Windows.

GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH; EC 1.1.1.149)

La velocidad de reacción se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 340 nm como resultado de la reducción de NADP⁺ por min a 25°C a pH 7,8. Para tal fin se añadió en la cubeta de reacción: Buffer Imidazol-HCl 50 mol L⁻¹, a pH 7,5, MgSO₄ 5 mol L⁻¹; 0,05 mol L⁻¹ NADP⁺ y 100 µL de extracto. La reacción se inició con glucosa-6-fosfato 5 mmol L⁻¹.

GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA (GST, EC 2.5.1.18)

Se determinó siguiendo el ascenso en la concentración del complejo formado por GSH y 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), a una longitud de onda de 340 nm (Coef. de Extinción= 9,6 mM⁻¹cm⁻¹). Mezcla de incubación consistió en Na₂HPO₄ 100 mmol L⁻¹ pH 6,5, CDNB 2,5 mmol L⁻¹ disuelto en etanol, GSH 67 mmol L⁻¹.

CATALASA (CAT, EC.1.11.1.6)

Se determinó por el descenso de la concentración del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a una longitud de onda de 240 nm (Coef. de Extinción= 40 M⁻¹cm⁻¹). La mezcla de incubación estuvo constituida por buffer fosfato KH₂PO₄/K₂PO₄ 50 mmol L⁻¹ a pH 7,5 y H₂O₂ 50 mmol L⁻¹.

BIOMOLÉCULAS E ÍNDICES MOLECULARES

La concentración de proteínas (PT) fue valorada según el método de Lowry *et al.* (1951) usando albumina de suero de bovino como estándar. El ARN fue determinado por el método de revelación por Orcinol (Cambell & Sargent 1967), y el ADN mediante la reacción de Difenilamina (Burton 1956); ambos valorados en fosforo inorgánico (Buckley & Bulow 1987). Se usó como sustancia referencial ARN de levadura (*S. cereviceae*) y ADN de timo de bovino. Adicionalmente, se estimaron los cocientes de crecimiento instantáneo ARN:ADN y Proteínas:ADN (Bulow 1987).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Después de análisis previos de normalidad de los datos y homogeneidad de las varianzas por métodos de Shapiro-Wilk y Levene (Sokal & Rohlf 2012), respectivamente, se procedió a realizar un análisis de varianzas de una vía (ANOVA) usando el programa computarizado Statgraphics Plus versión 5.1, en el cual se determinaron las diferencias entre las respuestas bioquímicas en los distintos meses de colectas y su contrastes con los bioensayos de aclimatación. Sólo las actividades de G6PDH, PT/ARN y ADN fueron ajustadas a Log10 para normalización de datos.

Tabla 1. Porcentaje de individuos con indicios de regeneración y número de segmentos (anteriores y/o posteriores) en *E. complanata* colectados en los distintos meses. El asterisco (*) muestra diferencias significativas al 95% de confianza / Percentage of individuals with regeneration indications and number of segments (anterior and posterior) in *E. complanata* collected in several months. The asterisk (*) shows significant differences to 95%

	Porcentaje de regeneración (%)	Nº de segmentos
Diciembre	32	6,90 ± 2,07
Febrero	33	6,63 ± 1,92
Junio	56	9,00 ± 3,68 *
Octubre	52	10,00 ± 3,55 *

RESULTADOS

CRECIMIENTO

El porcentaje en individuos colectados con indicios de regeneración (nuevos setíferos) en los distintos meses se presenta en la Tabla 1. Se observó que la regeneración es un proceso común en los individuos colectados en cualquier época del año, sin embargo los mayores promedios de número de setíferos recién formados por cada individuo (set ind⁻¹) fueron encontrados en junio (56%; 9,00 ± 3,68 set ind⁻¹) y octubre 2009 (52%; 10,00 ± 3,55 set ind⁻¹) (Fs= 14,56; P < 0,05).

METALOTIONEÍNAS Y TIOLES TOTALES

Las concentraciones de MT no presentaron diferencias significativas entre los ejemplares colectados en los distintas temporadas, ni en los poliquetos expuestos a 24°C y 28°C bajo condiciones controladas en el laboratorio (Fs= 2,09; P > 0,05). En el ambiente, los promedios de MT más elevados fueron encontrados en junio y octubre (Fig. 2A). De igual manera, no se observaron diferencias entre los niveles de grupos tioles totales (-SH) cuantificados en la pared corporal del poliqueto colectados en distintos meses (Fs= 0,58, P > 0,05). Los promedios de -SH totales oscilaron entre 41,09 y 58,07 µmoles g⁻¹, tanto para los organismos colectados en el ambiente como para los expuestos a distintas temperaturas (24 y 28°C) en el laboratorio (Fig. 2B).

PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La variación de temperatura ambiental entre diciembre 2009 a octubre 2010 produjo cambios significativos en los niveles de lípidos peroxidados (Fs= 11,14, P < 0,001). Se muestran los incrementos en los niveles de TBARS en octubre, en un ascenso concomitante al aumento en la temperatura del mar. Incrementos similares fueron encontrados en los organismos aclimatados a 28°C, en contraste a los organismos aclimatados a 24°C (Fig. 2C).

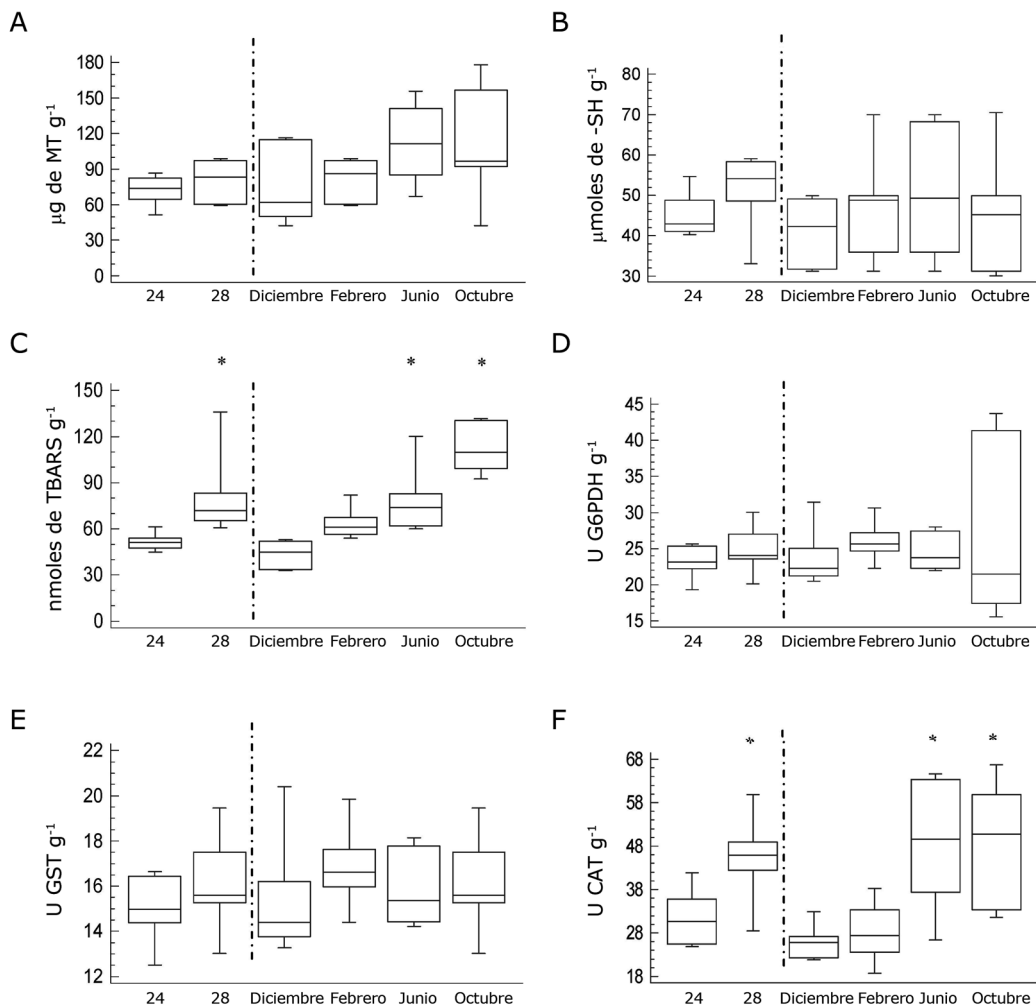


Figura 2. A) Niveles de metalotioneínas, B) Niveles de tioles totales, C) Niveles de TBARS, D) Actividad de glucosa-6- fosfato deshidrogenasa, E) Actividad de glutación-S-transferasa, F) Actividad de catalasa en *E. complanata* colectado en distintas temporadas ambientales y sometidos a bioensayo de aclimatación a 24 y 28°C por 36 días. (*) muestra diferencias significativas al 95% de confianza / A) Metallothionein concentrations, B) Total thiols concentrations, C) TBARS concentrations, D) Glucose-6P dehydrogenase activity, E) GST activity, F) CAT activity in *E. complanata* collected in different seasons and under environmental acclimatization bioassay 24 and 28°C for 36 days

ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

La actividad de las enzimas G6PDH y GST no mostraron variabilidad con respecto a los cambios estacionales ni bioensayos de aclimatación (Figs. 2D & 2E, respectivamente). No obstante, la actividad de CAT incrementó significativamente durante junio y octubre 2010, al igual que los poliquetos mantenidos durante 36 días a una temperatura promedio de 28°C. Los promedios más bajos fueron encontrados en diciembre 2010 y febrero 2011 similar a los poliquetos expuestos a 24°C (Fig. 1F).

BIOMOLÉCULAS E ÍNDICES MOLECULARES

Las concentraciones de ADN se incrementaron en los organismos expuestos a 28°C concomitantemente con los individuos colectados en el ambiente en junio y octubre (Fig. 3A). Los niveles de ARN no mostraron variabilidad con respecto a los cambios de temperaturas en el ambiente ni bajo condiciones controladas ($F_s = 1,97$, $P > 0,05$) (Fig. 3B). Los promedios de proteínas totales (PT) oscilaron entre $118,66 \pm 16,16$ a $140,46 \pm 41,21$ mg de PT g^{-1} para junio y febrero, respectivamente. A su vez, no fueron encontrados cambios significativos en los niveles de PT de organismos expuestos a temperaturas controladas (Fig. 3C).

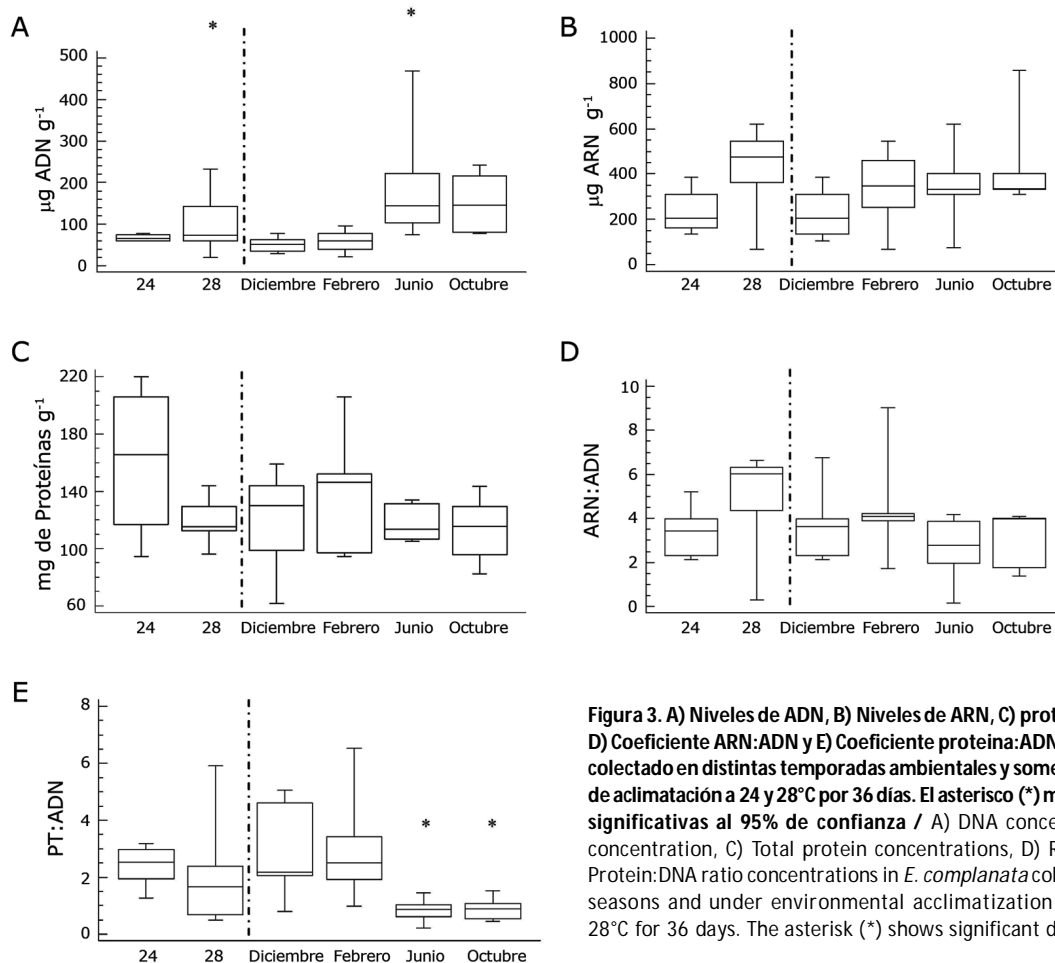


Figura 3. A) Niveles de ADN, B) Niveles de ARN, C) proteínas totales (PT), D) Coeficiente ARN:ADN y E) Coeficiente proteína:ADN en *E. complanata* colectado en distintas temporadas ambientales y sometidos a bioensayo de aclimatación a 24 y 28°C por 36 días. El asterisco (*) muestra diferencias significativas al 95% de confianza / A) DNA concentration, B) RNA concentration, C) Total protein concentrations, D) RNA:DNA ratio, E) Protein:DNA ratio concentrations in *E. complanata* collected in different seasons and under environmental acclimatization bioassay 24 and 28°C for 36 days. The asterisk (*) shows significant differences to 95%

El cociente ARN:ADN en *E. complanata* no presentó variaciones con respecto a los meses de colectas ni en los bioensayos de aclimatación (Fig. 3D). Los niveles de PT:ADN se mantuvieron con promedios aumentados durante diciembre y febrero, presentando un ligero descenso en julio y octubre, con respecto a todos los grupos experimentales ($F_s = 2,82$; $P > 0,05$). En los bioensayos de aclimatación no se observaron cambios en los índices de condición (Fig. 3E).

DISCUSIÓN

Los incrementos en la actividad de CAT y niveles de lipoperoxidación muestran que *E. complanata* sometido a ambientes con temperaturas mayores o iguales a 28°C puede desarrollar una condición de estrés oxidativo. Los cambios de la temperatura que se suscitan en el golfo de Cariaco, desde febrero (23,96°C) hasta octubre (29,93°C) pueden tener incidencia sobre el estatus antioxidante de *E. complanata*. En

la temporada de junio a octubre, donde se registran las máximas temperaturas, se hace evidente el incremento de la actividad de CAT, haciendo notar el rol preponderante de la enzima para controlar de los niveles fisiológicos de las especies reactivas del oxígeno (ERO), especialmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La capacidad de respuesta de esta enzima en pos de los cambios térmico en el ambiente forman parte de las respuestas de ajustes fisiológicos por aumento de ERO, vinculado posiblemente con una elevada tasa metabólica y respiración celular (Abele & Puntarulo 2004).

Al parecer, en la temporada más caliente, el poliqueto tiende a ajustar sus defensas antioxidantes en orden de mantener las concentraciones de ERO a niveles basales, sin embargo no parecen ser suficientes para contrarrestar el daño oxidativo en los lípidos (LPO). De manera similar, incrementos en las actividades de las enzimas antioxidantes y otros compuestos han sido reportados en especies de poliquetos tales como *Nereis*

diversicolor (Abele-Oeschger *et al.* 1994), *Arenicola marina* (Buchner *et al.* 1996) y en el camarón *Palaemon elegans* (Madeira *et al.* 2016). También, se ha reportado que la actividad de CAT incrementa en las temporadas cálidas en el cangrejo *Lithodes santolla* (Slechvezov *et al.* 2015). En verano, los mejillones *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* y *Bathymodiolus azuricus* incrementan SOD, CAT y GPx, inclusive LPO; en cambio, durante el invierno la tendencia es opuesta (Viarengo *et al.* 1991, Wiston & Di Giulio 1991, Company *et al.* 2006).

Los efectos estacionales sobre las respuestas antioxidantes han sido revisados en otras especies: *Perna perna* (Wilhelm-Filho *et al.* 2001), *Modiolus modiolus* (Lesser & Kruse 2004), *M. galloprovincialis* (Borkoviæ *et al.* 2005), *Laeonereis acuta* (Ferreira-Cravo *et al.* 2007), *Nacella magellanica* (Malanga *et al.* 2007), *Callinectes amnicola* (Olakolu *et al.* 2012) y *Palaemon elegans* (Vinagre *et al.* 2014). Sin embargo, en algunas investigaciones se demuestra que las defensas antioxidantes parecieran no presentar un patrón fijo con respecto a cambios estacionales. Algunas enzimas tienden al descenso en organismos expuestos a bajas temperaturas, por ejemplo la xantina oxidasa (XO) en mejillones del océano Atlántico y la actividad de GST en el pez *Zoarces viviparus* en el mar Báltico (Ronisz *et al.* 1999). Sin embargo, en el músculo blanco del pez *Mullus barbatus*, las enzimas SOD y GST incrementan sus actividades en invierno, y CAT, GR y GPx en primavera (Mathieu *et al.* 1991, Pavloviæ *et al.* 2009). Existe complejidad en la interpretación de la actividad de las enzimas antioxidantes, ya que también pueden observarse niveles elevados en presencia de contaminantes (Nusetti *et al.* 2005, Zapata-Vívenes *et al.* 2005).

Por otro lado, los compuestos -SH, MT y las enzimas GST y G6PDH no mostraron variaciones frente a los cambios de temperaturas en las temporadas ambientales examinadas; al parecer, estos marcadores moleculares presentan poca variación estacional, aunque pueden ser modificados por otros factores externos o fisiológicos. En contraste en branquias de *L. santolla*, los niveles de GSH, tripéptido que contiene un -SH, disminuyen en relación con el incremento de la temperatura del agua y el estado reproductivo durante los meses de septiembre y diciembre. Sin embargo, en el músculo de esta especie GST decrece en septiembre e incrementa en julio asociado a una condición post-muda (Schvezov *et al.* 2015). Algunos detalles similares han sido reportados en el mejillón marrón *P. perna* (Wilhelm-Filho 2001) y en el anfípodo *Gammarus locusta* (Gismodi *et al.* 2012). Algunas de tales respuestas bioquímicas han sido útiles para en estudio de áreas impactadas por xenobióticos y su variación temporal. Se ha demostrado incrementos de MT y GST en el poliqueto *Laeonereis acuta* que habita en zonas contaminadas y

encontrándose más elevadas en verano (Geracitano *et al.* 2004). A pesar que no existió cambios en las actividades de G6PDH, tal enzima puede garantizar los precursores de nucleótidos para la replicación del ADN o la síntesis de proteínas vinculadas con el crecimiento somático de *E. complanata*.

Los niveles de ADN indican una mayor proliferación celular en poliquetos colectados en la temporada de temperaturas más elevadas (no surgencia) y en los organismos aclimatados a 28°C, coincidiendo con una significativa frecuencia de organismos con señales de regeneración. Al parecer, durante el período de no surgencia se estimula la autotomía en esta especie, registrándose cerca del 30-41% de ejemplares fragmentados. Estos resultados muestran una posible relación entre la temperatura y el ciclo de reproducción asexual en *E. complanata*; aspectos biológicos que ameritan un sistema de defensas antioxidante eficiente. Los procesos de auto-fragmentación y regeneración en poliquetos pueden ser gatillados por la temperatura (Pires *et al.* 2015); detalles similares han sido reportados para *E. complanata* colectados en el golfo de México (Kudenov 1974).

Los promedios de biomoléculas tales como ARN y proteínas (PT), e índice ARN:ADN, a pesar que no presentaron variaciones con respecto a los cambios de temperaturas anuales, indican que *E. complanata* presenta un crecimiento continuo durante todo el año. Adicionalmente, el índice PT:ADN deja mostrar un aumento en la división celular durante los meses de estratificación y un incremento de la síntesis de proteínas en las temporadas de descenso de temperatura (surgencia). La temperatura es un factor determinante sobre la actividad metabólica y las concentraciones de biomoléculas implicadas en el crecimiento (PT, ARN y ADN) y sus cocientes relacionados. Sin embargo, los niveles de proteínas en *E. complanata* presentaron sus mayores promedios en los organismos expuestos a baja temperatura. Segnini & Chung (1991), Chung (1997), Lemus *et al.* 1993 y Lemus & Chung (2006) reportaron incremento en los niveles ARN en juveniles de *Oreochromis mossambicus* y *Petenia kraussii* aclimatados a 22°C con respecto a los organismos sometidos a 30°C, mostrando una relación positiva entre los valores de ARN y crecimiento corporal.

Los ascensos de la temperatura del agua en los períodos de no surgencia pueden estimular la autotomía y regeneración tisular en *E. complanata*. Al parecer, los procesos fisiológicos donde se vincula una elevada tasa metabólica existe la posibilidad de conllevar a una condición de estrés oxidativo (Schvezov *et al.* 2015). En tal sentido, es posible que el sistema de defensa de antioxidante en *E. complanata* ajuste su capacidad de removedor de ERO influenciados directamente por las variaciones de temperatura; asociado también a los procesos

reproductivos asexuales (autotomía). El incremento en la lipoperoxidación (LPO), paralelamente a la actividad de CAT en *E. complanata*, sugiere ajustes metabólicos contra la acción de ERO, demandando respuestas compensatorias antioxidantes para proteger la viabilidad funcional del tejido y los procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento. En síntesis, las temperaturas que se registran en las aguas superficiales del golfo de Cariaco inducen cambios significativos en la actividad de CAT y daños oxidativos, que coinciden con el incremento de las tasas de crecimiento corporal en los poliquetos. Al parecer, el estatus basal antioxidante *E. complanata* puede variar en relación a cambios térmicos ambientales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, a la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, y al Instituto Oceanográfico de Venezuela. Se aplicaron las normas internacionales, nacionales, y/o institucionales para el cuidado y uso de animales de experimentación. Esta investigación se adhiere a las pautas de ASAB/ABS (2012) para el uso de animales en la investigación.

LITERATURA CITADA

- Abele-Oeschger D, R Oeschger & H Theede. 1994.** Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Marine Ecology Progress Series* 106: 101-110.
- Abele D & S Puntarulo. 2004.** Formation of reactive species and induction antioxidant defense systems in polar and temperature marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 138: 405-415.
- ASAB/ABS. 2012.** Guidelines for the treatment of animals in behavioral research and teaching. Association for the study of animal behaviour and animal behavior society. *Animal Behavior* 83: 301-309
- Borkoviæ S, J Šaponjiæ, S Pavloviæ, D Blagojeviæ, S Miloševiæ, T Kovačeviæ, R Radojiçiæ, M Spasiæ, R Žikiæ & Z Saiçiæ. 2005.** The activity of antioxidant defense enzymes in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 141: 366-374.
- Buchner T, D Abele-Oeschger & H Theede. 1996.** Aspects of antioxidant status in the polychaete *Arenicola marina*: tissue and subcellular distribution and reaction to environmental hydrogen peroxide and elevated temperatures. *Marine Ecology Progress Series* 143: 141-150.
- Buckley LJ & FJ Bulow. 1987.** Techniques for estimation of RNA, DNA, and protein in fish. In: Summerfelt RC & GE Hall (eds). *Age and growth in fish*, pp. 345-354. Iowa State University Press, Ames.
- Bulow F. 1987.** RNA-DNA ratios as indicator of growth in fish. In: Summerfelt JR & Cobb CS (eds). *Age and growth in fish*, pp. 255-367. Iowa State University Press, Ames.
- Burton K. 1956.** A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemistry Journal* 62: 315-323.
- Buttner WA, D Abele & D Costantini. 2010.** The ecology of antioxidants & oxidative stress in animals from bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology* 24: 971-983.
- Cambell PN & JR Sargent. 1967.** Estimation of ARN by orcinol method of mejbum (1939). In: Cambell PN & JR Sargent (eds). *Techniques in protein biosynthesis* 1: 301-302. Academic Press, London.
- Company R, A Serafima, R Cosson, A Fiala-Me'dioni, D Dixond & MJ Bebianno. 2006.** Temporal variation in the antioxidant defense system and lipid peroxidation in the gills and mantle of hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Deep-Sea Research I* 53: 1101-1116.
- Chung KS. 1997.** Respuestas fisiológicas de peces tropicales a cambios de temperatura. *Saber* 9(1): 36-39.
- Ellman GL. 1958.** A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 74: 443-450.
- Ferreira-Cravo C, M Piedras, FM Moraes, JLR Ferreira, DPS De Freitas, MD Machado, MA Geracitano & JM Monserrat. 2007.** Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the stuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). *Chemosphere* 66: 1367-1374.
- Freire CA, AF Welker, JM Storey, KB Storey & M Hermes-Lima. 2011.** Oxidative stress in estuarine and intertidal environments (temperate and tropical). In: Abele D, JP Vazquez-Medina & T Zenteno-Savin (eds). *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, pp. 41-57. Wiley Blackwell, Chichester.
- Geracitano L, JM Monserrat & A Bianchini. 2004.** Oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effects. *Marine Environmental Research* 58: 625-630.
- Gismondi E, JN Beisel & C Cossu-Leguille. 2012.** Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environmental Research* 118: 47-52.
- Guderley H & J St-Pierre. 2002.** Going with the flow or life in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change. *Journal of Experimental Biology* 205: 2237-2249.
- Hauschild K & MK Grieshaber. 1997.** Oxygen consumption and sulfide detoxification in the lugworm *Arenicola marina* (L.) at different ambient oxygen partial pressures and sulfide concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 167: 378-388.

- Hermes-Lima M. 2004.** Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB (ed). Functional metabolism: regulation and adaptation, pp. 319-368. John Wiley & Sons, New York.
- Keller M, AM Sommer, HO Pörtner & D Abele. 2004.** Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. Journal of Experimental Biology 207: 2529-2538.
- Kudenov JD. 1974.** The reproductive biology of *Eurythoe complanata* (Pallas, 1766) (Polychaete: Amphinomidae). PhD Dissertation, Arizona University, 128 pp. <http://arizona.openrepository.com/arizona/bitstream/10150/288256/1/azu_td_7423371_sip1_m.pdf>
- Lemus M & K Chung. 2006.** Effect of copper on the RNA/DNA ratio at different temperatures in juveniles of *Petenia kraussii* (Pisces: Cichlidae). Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela 45(1): 9-15.
- Lemus MJ, KS Chung & GJ Holt. 1993.** Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de juveniles de *Petenia kraussii* (Pisces:Cichlidae): Relación ARN/ADN. Revista de Biología Tropical 41(Supl. 1): 45-48.
- Lesser MP & VA Kruse. 2004.** Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: Metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. Comparative Biochemistry and Physiology A 137: 495-504.
- Linero-Arana A & O Diaz. 2010.** Amphinomidae y Euprosinidae (Annelida: Polychaeta) de la costa nororiental de Venezuela. Latin American Journal of Aquatic Research 38(1): 107-120.
- Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr & RJ Randal. 1951.** Protein measurement with folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.
- Madeira D, V Mendonça, C Vinagre & MS Diniz. 2016.** Is the stress response affected by season? Clues from an in situ study with a key intertidal shrimp. Marine Biology 163(41): 1-12.
- Malanga G, MS Estévez, J Calvo, D Abele & S Puntarulo. 2007.** The effect of seasonality on oxidative metabolism in *Nacella (Patinigera) magellanica*. Comparative Biochemistry and Physiology A 146: 551-558.
- Mathieu A, P Lemaire, S Carriere, P Drai, J Giudicelli & M Lafaurie. 1991.** Seasonal and sex linked variations in hepatic and extrahepatic biotransformation activities in striped mullet (*Mullus barbatus*). Ecotoxicology and Environmental Safety 22: 45-57.
- Méndez N & F Paéz-Osuna. 1998.** Trace metals in two populations of the fireworm *Eurythoe complanata* from Mazatlan bay: effect of body size on concentrations. Environmental Pollution 102: 279-285.
- Mendoza AR, GC Aguilera & ML Carreón. 2002.** Ácidos nucleicos para evaluar las condiciones de larvas de peces. Ciencia UANL 5(2): 210-217.
- Muller-Karger FE, CR McClain, TR Fisher, WE Esaias & R Varela. 1989.** Pigment distribution in the Caribbean Sea: observations from space. Progress in Oceanography 23: 23-69.
- Nusetti O & D Morales. 1988.** Crecimiento en algunos tejidos del mejillón *Perna perna* (L.1758): composición de ADN, relaciones ARN/ADN y reservas energéticas. Acta Científica Venezolana 39: 289-293.
- Nusetti O, R Salazar-Lugo, J Rodríguez-Grau & J Vilas. 1998.** Immune and biochemical responses of the polychaete *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentrations of copper. Comparative Biochemistry and Physiology C 119: 177-183.
- Nusetti O, M Escalpés, G Salazar, S Nusetti & S Pulido. 2001.** Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short term copper exposure. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 66: 576-581.
- Nusetti O, E Zapata-Vívenes, M Esclapés & M Rojas. 2005.** Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) exposed to used vehicle crankcase oil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 48: 1-6.
- Oakley A. 2011.** Glutathione transferases: a structural perspective. Drug Metabolism Review 43(2): 138-151.
- Ohkawa H, N Ohishi & K Yaki. 1979.** Assays for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 95: 331-358.
- Olakolu FC, AA Hassan & SK Akindele. 2012.** Seasonal variation of oxidative stress biomarkers in gills and muscle of blue crabs *Callinectes amnicola* from Lagos lagoon. European Journal of Scientific Research 80(3): 406-415.
- Pavlović SZ, SS Borkovič-Mitić, TB Radovanović, BR Perendija, SG Despotović, J Gavrić & Z Saičić. 2009.** Activity of oxidative stress biomarkers in the white muscle of red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic sea. Archives of Biology Sciences 61(4): 693-701.
- Penchaszadeh P, C León, H Álvarez, D Bone, P Castellano, M Castillo, T Díaz, M García-Guardilla, M Lemus, F Losada, A Martín, P Miloslavich, C Paredes, D Pérez, M Sebastiani, D Stecconi, V Roa & A Villamizar. 2000.** Venezuela. In: Sheppard CR (eds). Seas at the millennium; An environmental evaluation 1: 643-659. Pergamon, Oxford.
- Pires A, E Figueira, A Moreira, A Soares & R Freitas. 2015.** The effects of water acidification, temperature and salinity on the regenerative capacity of the polychaete *Diopatra neapolitana*. Marine Environmental Research 106: 30-41.
- Ronisz D, DGJ Larsson & L Forlin. 1999.** Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). Comparative Biochemistry and Physiology C 124: 271-279.

- Rueda-Roa DT & FE Muller-Karger. 2013.** The southern Caribbean upwelling system: Sea surface temperature, wind forcing and chlorophyll concentration patterns. *Deep-Sea Research I* 78: 102-114.
- Schvezov N, GA Lovrich, O Florentín & MC Romero. 2015.** Baseline defense system of commercial male king crab *Lithodes santolla* from the Beagle Channel. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 181: 18-26.
- Segnini MI & KS Chung. 1991.** Respuestas fisiológicas de *Petenia kraussii* (Pisces: Cichlidae) sometidos a cambios de temperatura. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela* 30: 5-15.
- Singh S, A Anand & PK Srivastava. 2012.** Regulation and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase: A review. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 4(1): 1-19.
- Sokal R & J Rohlf. 2012.** *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, 937 pp. WH Freeman and Company, San Francisco.
- Vásquez-Núñez R, N Méndez & C Green-Ruiz. 2007.** Bioaccumulation and elimination of Hg in the fireworm *Eurythoe complanata* (Annelida: Polychaeta) from Mazatlan, México. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52(4): 541-548.
- Viarengo A, L Canesi, M Pertica & DR Livingstone. 1991.** Seasonal variation in the antioxidant defense system and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 100: 187-190.
- Viarengo A, E Ponzano, F Dondero & R Fabbri. 1997.** A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Marine Environmental Research* 44(1): 69-84.
- Vinagre C, D Madeira, V Mendonça, M Dias, J Roma & MS Diniz. 2014.** Effect of temperature in multiple biomarkers of oxidative stress in coastal shrimp. *Journal of Thermal Biology* 41: 38-42.
- Wilhelm-Filho D, T Tribes, C Gaspari, FD Claudio, MA Torres & ARM Magalhaes. 2001.** Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* 203: 149-158.
- Wiston GW & RT Di Giulio. 1991.** Proxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19: 137-161.
- Yáñez-Rivera B & N Méndez. 2014.** Regeneration in the stinging fireworm *Eurythoe* (Annelida): Lipid and triglyceride evaluation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 459: 137-143.
- Zapata-Vívenes E. 2001.** Regeneración tisular y estrés oxidativo en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) expuestos a concentraciones subletales de una fracción de lubricantes usados de motores de vehículo. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Zapata-Vívenes E, O Nusetti, L Marcano, M Escalpés & L Arredondo. 2005.** Respuestas inmunológicas y cicatrización en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidae) expuesto a cobre. *Ciencias Marinas* 31(1): 1-9.
- Zapata-Vívenes E, G Sánchez & L Marcano. 2015.** Reservas energéticas e índices moleculares de condición en *Lima (ctenoides) scabra* (Born, 1778) expuesta a lubricantes usados de motores de automóviles. *Zootecnia Tropical* 6(4): 1-10.

Recibido el 25 de agosto de 2016 y aceptado el 6 de octubre de 2017

Editor: Claudia Bustos D.