BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Universidad de Santiago de Compostela

Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, Lmk

María Fe Montero Torreiro

Tesis de Doctorado

Facultad: Farmacia

Directora: Dr. María Paz García Martínez

2000

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOXÍA MOLECULAR
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA Y DE POSIBLES BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN EN EL ERIZO DE MAR, *Paracentrotus lividus*, Lmk.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

María Fe Montero Torreiro
TESIS DOCTORAL
Santiago de Compostela, 2000

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

MARÍA PAZ GARCÍA MARTÍNEZ, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA:

Que la presente memoria titulada **"Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, Lmk."**, presentada por la Licenciada en Farmacia María Fe Montero Torreiro para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, y hallándose concluida, autorizo su presentación a fin de que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Santiago de Compostela, noviembre del año dos mil.

Fdo. Paz García Martínez

Fdo. María Fe Montero Torreiro

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el marco del proyecto de investigación titulado **"Análisis del valor nutritivo y estudio de marcadores bioquímicos de contaminación en las gónadas del erizo de mar, *Paracentrotus lividus*"**, financiado por la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia (1997-99) (XUGA 20304A97).

María Fe Montero Torreiro ha sido Becaria de Tercer Ciclo (1994-96) y Predoctoral (1996-99) de la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia y Becaria de Investigación de la Diputación de A Coruña (1999-2000).

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Recoged desde ahora las rosas de la vida,
porque el tiempo jamás suspende su vuelo
y la misma flor que hoy se abre,
mañana estará marchita.

Primera estrofa del poema **"A las vírgenes, para que aprovechen el tiempo"**, de Robert Herrick.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Quisiera agradecer de forma especial a todas las personas que me han ayudado en la elaboración de esta Tesis Doctoral.

A la Doctora Paz García Martínez, directora del presente trabajo y que me inició en el campo de la Ecotoxicología Marina.

A José Luis Catoira y Gonzalo Mosquera, biólogos de la Consellería de Pesca de la Xunta de Galicia, por la ayuda prestada en la recolección de las muestras.

A la Doctora Cinta Porte del C.S.I.C. de Barcelona y al Doctor Dave Livingstone del Plymouth Marine Laboratory (Reino Unido), por aceptarme de forma temporal en sus centros de investigación.

A todas las compañeras y compañeros que han pasado por el Departamento de Bioquímica todos estos años.

A mi familia.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	difosfato de adenosina
Ah	receptor aril hidrocarburo
ANOVA	análisis normal de varianza
$ARN_{(m)}$	ácido ribonucleico (mensajero)
ATP	trifosfato de adenosina
BaP	benzo(a)pireno
BSA	seroalbúmina bovina
Cap.	capítulo
CAT	catalasa
cit	citosol
cytcred	citocromo c reductasa
d	densidad
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
E^o	potencial estándar de reducción
Ed.	editor
Eds.	editores
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EH	epóxido hidrolasa
EROD	etoxirresorufina O-deetilasa
EROs	especies reactivas del oxígeno
e.s.	error estándar
FAD	flavín adenín dinucleótido
ferrired	ferricianuro reductasa
Fig.	Figura
Figs.	Figuras
FMN	flavín mononucleótido
g	aceleración de la gravedad
GK	ATP: glicerol 3-fosfotransferasa
GOD	glucosa oxidasa
GPO	L-glicerol-3-fosfato: oxígeno 2-oxidorreductasa
GPX	glutatión peroxidasa
GSH	glutatión reducido
GST	glutatión S-transferasa
IG	índice gonadal
KD	kilodaltons
K_m	constante de Michaelis-Menten
LPX	lípidos que han sufrido peroxidación
LSPX	lípidos susceptibles de peroxidación
LTs	lípidos totales
MD	menadiona
MDA	malonildialdehído
MFO	monooxigenasa de función mixta
mic	microsomas
mit	mitocondrias
MRP	"multidrug resistant related protein"
NADH	dinucleótido de nicotínamida y adenina reducido

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotínamida y adenina reducido
NF	nitrofurantoína
N.O.	noroeste
N.P.	actividad no perceptible
PAHs	hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCBs	bifenilos policlorados
p.e.	por ejemplo
PF	peso fresco
POD	peróxido de hidrógeno oxidorreductasa
pp.	páginas
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
PQ	paraquat
PS	peso seco
PUFA	ácidos grasos poliinsaturados
P/V	peso/volumen
Q	quinona
rpm	revoluciones por minuto
r_s	coeficiente de correlación de Spearman
S.O.	suroeste
SOD	superóxido dismutasa
SPSS	"statistical package for social sciences"
TBA	test del ácido tiobarbitúrico
TBARS	especies reactivas del ácido tiobarbitúrico
Tm	toneladas métricas
TMOP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UGT	UDP-glucuronosil transferasa
vis-UV	visible-ultravioleta
V_{max}	velocidad máxima
vol.	volumen
3-MC	3-metilcolantreno
4-HNE	4-hidroxinonenal

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL 1

1.1 Importancia de los biomarcadores en el control de la contaminación 3

1.1.1 Principales contaminantes existentes en el medio acuático 3

1.1.2 La formación de oxirradicales inducida por contaminantes 5

1.1.3 Mecanismos de defensa frente a los oxirradicales 8

1.1.4 Los biomarcadores de contaminación 8

1.2 El erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, Lmk. 11

1.2.1 Clasificación 11

1.2.2 Biología general 11

1.2.3 Hábitat y distribución geográfica 13

1.2.4 Importancia comercial: captura y cultivo en criadero 13

1.3 Justificación del presente estudio 15

1.4 Objetivos del presente estudio 15

1.5 Procedencia y procesado de las muestras 16

1.6 Aparatos y reactivos empleados 17

1.6.1 Aparatos 17

1.6.2 Reactivos 17

1.7 Análisis estadístico 18

2. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA 19

2.1 Introducción 21

2.1.1 Ciclo reproductivo en equinodermos 21

2.1.2 Composición bioquímica y ciclos bioquímicos en equinodermos 22
2.1.3 Objetivos del presente capítulo 23

2.2 Materiales y métodos 24
2.2.1 Determinación del índice gonadal 24
2.2.2 Determinación de agua y cenizas 24
2.2.3 Determinación de la glucosa libre y el glucógeno 24
2.2.4 Determinación de proteínas 25
2.2.5 Determinación de los lípidos totales, acilglicéridos y colesterol 25

2.3 Resultados 29
2.3.1 Medidas biométricas e índice gonadal 29
2.3.2 Contenido en agua y cenizas 31
2.3.3 Contenido en glúcidos, proteínas y lípidos totales 33
2.3.4 Contenido en triglicéridos y colesterol 36
2.3.5 Relación entre los componentes bioquímicos entre sí y con el índice gonadal 40

2.4 Discusión 44
2.4.1 Ciclo gonadal 44
2.4.2 Niveles de los componentes bioquímicos 46
2.4.3 Variación estacional en la composición bioquímica y posible relación de los componentes bioquímicos entre sí y con el ciclo reproductor 50

3. ESTUDIO DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA 55

3.1 Introducción 57
3.1.1 El proceso de la peroxidación lipídica 57
3.1.2 La peroxidación lipídica como biomarcador de contaminación 60
3.1.3 Objetivos del presente capítulo 61

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

3.2 **Materiales y métodos** 62

3.2.1 Preparación de las muestras 62

3.2.2 Determinación de los lípidos que han sufrido peroxidación (LPX) 62

3.2.3 Determinación de los lípidos susceptibles de peroxidación (LSPX) 64

3.2.4 Estudio *in vitro* con metales pesados 65

3.2.5 Estudio *in vitro* con xenobióticos 67

3.3 **Resultados** 69

3.3.1 Pruebas para la elección de las condiciones óptimas de medida de la peroxidación lipídica 69

3.3.2 Variación estacional en los niveles de peroxidación lipídica 72

3.3.3 Relación entre el índice gonadal, los niveles de lípidos totales y la peroxidación lipídica 75

3.3.4 Influencia *in vitro* de los metales pesados en la peroxidación lipídica 76

3.3.5 Influencia *in vitro* de los xenobióticos en la peroxidación lipídica 81

3.4. **Discusión** 84

3.4.1 Niveles de peroxidación lipídica 84

3.4.2 Variación estacional de la peroxidación lipídica 87

3.4.3 Influencia *in vitro* de los metales pesados en la peroxidación lipídica 91

3.4.4 Influencia *in vitro* de los xenobióticos en la peroxidación lipídica 96

4. ESTUDIO DE LAS ENZIMAS REDUCTASAS ASOCIADAS AL SISTEMA MFO 101

4.1 **Introducción** 103

4.1.1 Metabolismo oxidativo de fase I, II y III 103

4.1.2 Estructura y función del sistema MFO 103

4.1.3 El sistema MFO como biomarcador de contaminación 108
4.1.4 Objetivos del presente capítulo 108

4.2 Materiales y métodos 109
4.2.1 Preparación de las fracciones subcelulares 109
4.2.2 Determinación de las NAD(P)H reductasas dependientes de citocromo c 111
4.2.3 Determinación de las NAD(P)H reductasas dependientes de ferricianuro 111
4.2.4 Determinación de las proteínas 112
4.2.5 Estudio *in vitro* con metales pesados 113
4.2.6 Estudio *in vitro* con xenobióticos 114

4.3 Resultados 116
4.3.1 Variación estacional de los niveles de actividad total de las reductasas asociadas al sistema MFO 116
4.3.2. Distribución subcelular de las reductasas asociadas al sistema MFO 122
4.3.3 Relación entre los niveles de actividad total y de las fracciones subcelulares de las reductasas asociadas al sistema MFO 131
4.3.4 Influencia *in vitro* de metales pesados sobre las reductasas asociadas al sistema MFO 136
4.3.5 Influencia *in vitro* de xenobióticos sobre las reductasas asociadas al sistema MFO 140

4.4 Discusión 146
4.4.1 Niveles de actividad totales y de las fracciones subcelulares de las reductasas asociadas al sistema MFO 146
4.4.2 Variación estacional de la actividad de las reductasas asociadas al sistema MFO 149
4.4.3 Influencia *in vitro* de metales pesados sobre las reductasas asociadas al sistema MFO 152
4.4.4 Influencia *in vitro* de xenobióticos sobre las reductasas asociadas al sistema MFO 156

CONCLUSIONES 165

BIBLIOGRAFÍA 169

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

1.1 IMPORTANCIA DE LOS BIOMARCADORES EN EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN

1.1.1 Principales contaminantes existentes en el medio acuático

En el medio acuático están presentes numerosos contaminantes que pueden provocar efectos dañinos sobre los organismos que habitan en él. La distribución de dichos contaminantes en el medio acuático está determinada por tres procesos básicos: su acumulación en el sustrato béntico, su distribución en la columna de agua y su captación por parte de los organismos, bien a través de las branquias o del sistema digestivo (Malins y Ostrander, 1991). Estos compuestos, una vez que entran en el interior de los organismos, pueden seguir varias rutas, tales como la acumulación a largo plazo, la producción de efectos tóxicos de forma directa o indirecta tras su biotransformación y la excreción al medio externo. Todos estos efectos pueden tener repercusión sobre células, tejidos, organismos e, incluso, poblaciones (Narbonne y Michel, 1993).

Los contaminantes, atendiendo a su naturaleza química, se suelen dividir en dos grandes grupos: **metales pesados** (de naturaleza iónica y solubles en agua) y **xenobióticos orgánicos** (de naturaleza apolar y poco solubles en agua).

Los **metales pesados** están ampliamente difundidos en el medio externo, debido a sus numerosas aplicaciones. Muestran, en general, una alta toxicidad sobre tejido neuronal, hepático y renal, provocada en parte por el daño oxidativo en dichos tejidos debido a la generación de oxirradicales (Stohs y Bagchi, 1995). Las diferencias específicas en esta toxicidad se deben a las distintas propiedades físico-químicas de los metales dentro de los organismos vivos. A continuación, se presenta una breve descripción de aquellos más importantes y que son objeto de estudio en la presente memoria:

-La característica típica de la intoxicación por **cobre** es la necrosis hepática. Sus aplicaciones prácticas son variadas e incluyen desde su uso en la industria eléctrica y del automóvil hasta su empleo como fungicida y algicida, estimándose la producción global anual en unos 13,6 millones de Tm (ATSDR, 1990).

-La presencia del **cadmio** en el medio ambiente se debe, principalmente, a actividades de galvanización y a su uso en pinturas y en baterías. Es tóxico para el hígado, el riñón y el sistema nervioso central.

-Las principales aplicaciones del **mercurio** son la minería (antiguamente se empleaba en la extracción de oro), como fungicida, como componente de ciertos medicamentos y la producción de plásticos. La producción mundial de mercurio está estimada entre 10.000 y 15.000 Tm anuales (Clarkson y Marsh, 1982). Las principales vías de contaminación son a través de la piel, por la dieta y por contacto con vías respiratorias. Afecta sobre todo a los sistemas nervioso, renal y gastrointestinal, pudiendo dar lugar a úlceras y hemorragias.

-El **plomo** está presente en polvo, agua, pinturas, cosméticos, remedios caseros,... y puede provocar, entre otros efectos, disfunciones hematológicas, gastrointestinales y neurológicas.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

De igual manera que los metales pesados, los **xenobióticos orgánicos** que están presentes en el medio ambiente son muy abundantes y de muchos tipos:

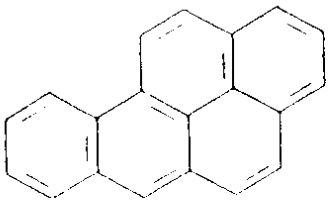
-Los **PAHs** (hidrocarburos aromáticos policíclicos) pueden tener un origen pirrolítico (resultado de la combustión incompleta de la materia orgánica), petrogénico (consecuencia de derrames de petróleo) o diagénico (por procesos geoquímicos de aromatización de la materia sedimentaria) (Biosca, 1997). Muchos de ellos son cancerígenos, como es el caso del **benzo(a)pireno**.

-Los **PCBs** (bifenilos policlorados) han sido usados como refrigerantes, lubricantes…. pero actualmente están prohibidos en numerosos países debido a sus numerosos efectos tóxicos tales como mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis (EPA, 1980).

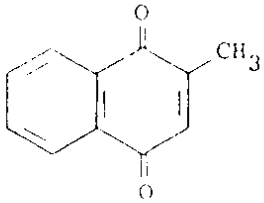
-Los **compuestos quinónicos**, entre los que se encuentra la **menadiona**, se originan no sólo por procesos de combustión, sino también como consecuencia del metabolismo de ciertos PAHs a través del sistema MFO de organismos acuáticos (ver **capítulo 4**), como es el caso de las **dionas de benzo(a)pireno** (Lemaire y Livingstone, 1993). Sus efectos dañinos incluyen la necrosis celular, la estimulación de la captación de glucosa por las células del músculo esquelético y la inhibición de la secrección de insulina por parte del páncreas (Chan *et al*., 1986).

-Los **compuestos nitroaromáticos** (como la **nitrofurantoína**) se usan como explosivos, plásticos, colorantes, pesticidas o medicamentos. Existen evidencias que demuestran su toxicidad sobre los pulmones (Suntres y Shek, 1992).

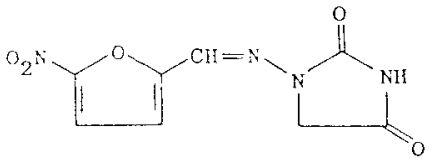
-Los **bipiridilos** (como el **diquat** y el **paraquat**) son utilizados frecuentemente como pesticidas en huertas, plantaciones y bosques (Eisler, 1990). Son altamente tóxicos y su ingestión accidental puede provocar fibrosis pulmonar.



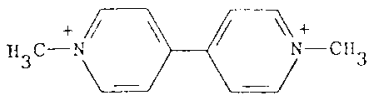
Benzo(a)pireno



Menadiona



Nitrofurantoína



Paraquat

Fig. 1.I. Estructura química de los **xenobióticos orgánicos** utilizados en el presente estudio.

1.1.2 La formación de oxirradicales inducida por contaminantes

Las especies reactivas del oxígeno o EROs son especies altamente reactivas procedentes de la reducción parcial de la molécula de O_2. Las principales EROs son el radical anión superóxido ($\mathbf{O_2^{\cdot-}}$), el peróxido de hidrógeno ($\mathbf{H_2O_2}$) y el radical hidroxilo ($\mathbf{OH^{\cdot}}$). Los efectos dañinos que provocan en la célula son numerosos y afectan a todo tipo de biomoléculas. Entre ellos destacan la peroxidación lipídica, la inactivación enzimática y la formación de aductos del ADN (Livingstone, 1991).

Algunos **metales pesados**, tales como el **hierro** y el **cobre**, pertenecientes al grupo de los llamados metales de transición, están implicados directamente en la formación de oxirradicales y, por tanto en la peroxidación lipídica, a través de la reacción de Haber-Weiss:

$$Fe^{+3}\ (Cu^{+2}) + O_2^{-} \rightarrow Fe^{+2}\ (Cu^{+1}) + O_2 \qquad \textbf{(a)}$$

$$Fe^{+2}\ (Cu^{+1}) + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3}\ (Cu^{+2}) + OH^{\cdot} + OH^{-} \quad \textbf{Reac. de Fenton (b)}$$

$$O_2^{-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + O_2 \qquad \textbf{Reacción de Haber-Weiss (c)}$$

Otros metales, como el **mercurio**, el **plomo** y el **cadmio**, basan su mecanismo de acción en su capacidad para reaccionar y eliminar grupos tiol, tanto los contenidos en pequeñas moléculas del tipo del glutatión reducido (GSH) como los ligados a proteínas, lo que puede dar lugar a la aparición de una situación de estrés oxidativo, con la formación de oxirradicales y la peroxidación de lipídos (Stohs y Bagchi, 1995).

Además de estos efectos tóxicos provocados por la presencia de **metales pesados** en organismos vivos, también aparecen otros, consecuencia del estrés oxidativo que desencadenan, tales como la modificación del metabolismo celular (transporte a través de membranas, función mitocondrial, estabilidad lisosomal o replicación del ADN) y la unión a biomoléculas solubles o integradas en la membrana (enzimas, ADN y fosfolípidos) (Labrot *et al*., 1996).

Los **xenobióticos orgánicos**, según Lemaire y Livingstone (1993), pueden intervenir en la formación de oxirradicales a través del sistema monooxigenasa de función mixta (MFO) mediante una serie de mecanismos:

a) Inducción de los componentes del sistema MFO, tales como el citocromo P450 o la citocromo P450 reductasa.

b) Modificación del flujo de electrones entre las reductasas flavoproteicas y las dependientes de citocromo P450, con el resultado de un escape de electrones. Es el caso de compuestos de naturaleza lipofílica, como los PAHs, entre los que se encuentra el benzo(a)pireno.

c) Existencia de un **ciclo redox**, típico de un gran número de compuestos, algunos de los cuales se incluyen en la **Tabla 1.I**.

Clase de compuesto	Ejemplos
Quinonas	Menadiona Quinona derivada de pireno Adriamicina Mitomicina C
Bipiridilos	Paraquat Diquat
Compuestos nitroaromáticos	Nitrofurantoína Nitropireno Misonidazol
Hidroxilaminas aromáticas	N-OH-2-aminofluoreno
Complejos metálicos	Fe-EDTA Cu-bleomicina

Tabla 1.I. Algunos **compuestos orgánicos** que participan en el **ciclo redox** (Di Giulio *et al.,* 1989).

En dicho ciclo redox, un xenobiótico sufre una reducción monoelectrónica en presencia de NADH o NADPH, catalizada por enzimas pertenecientes al sistema MFO tales como la citocromo P450 reductasa y la citocromo b_5 reductasa o por otras enzimas tales como la xantín oxidasa, la ferredoxín reductasa o la NADH-ubiquinona oxidorreductasa **(d)**, seguida por una reacción del radical del xenobiótico resultante con O_2 para dar O_2^- **(e)**. Es importante señalar el hecho de que la cantidad de O_2 y de NAD(P)H consumidos no son proporcionales a la cantidad de xenobiótico presente, de manera que la producción de O_2^- es mucho mayor a la esperada por estequiometría y el daño oxidativo producido es elevado (Winston, 1990):

$$\mathbf{Q + 1\ e^-} \xrightarrow[\text{NAD(P)H + H}^+]{\text{citocromo P450 reductasa}} \mathbf{Q^\cdot} \qquad \mathbf{(d)}$$

$$\mathbf{Q^\cdot + O_2} \longrightarrow \mathbf{Q + O_2^-} \qquad \mathbf{(e)}$$

Este radical anión superóxido (O_2^-) puede entonces dar lugar, por dismutación, a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y, a través de la reacción de Haber-

Weiss, a radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$), con la consiguiente aparición de situaciones de estrés oxidativo, que podrán provocar un daño sobre la célula.

1.1.3 Mecanismos de defensa frente a los oxirradicales

Frente al daño oxidativo originado por las EROs en los seres vivos, estos han desarrollado una serie de **mecanismos de defensa antioxidante** (Winston y Di Giulio, 1991). Dichos antioxidantes se dividen, principalmente, en dos grandes grupos, los enzimáticos y los no enzimáticos.

Dentro de los **antioxidantes enzimáticos** destaca, en primer lugar, la **superóxido dismutasa** (SOD, EC. 1.15.1.1), que contribuye a la eliminación del $O_2^{\cdot-}$. Además pertenecen a este grupo, la **catalasa** (CAT, EC. 1.11.1.6) y la **glutatión peroxidasa** (GPX, EC. 1.11.1.9), que participan en la eliminación del H_2O_2, pero mientras la CAT utiliza como aceptor electrónico otra molécula de H_2O_2, la GPX prefiere ceder sus electrones al glutatión reducido (GSH).

En los **antioxidantes no enzimáticos** se integran tanto moléculas reductoras de pequeño tamaño y naturaleza hidrosoluble (el glutatión reducido y el ascorbato) como algunas vitaminas liposolubles (α-tocoferol y β-caroteno). El **glutatión reducido (GSH)** tiene numerosas funciones, tales como la de impedir que ciertos xenobióticos formen radicales reactivos uniéndose a ellos covalentemente o la de proteger a las enzimas oxidando preferentemente su grupo tiol (-SH). El **ascorbato (vitamina C)** puede actuar tanto como antioxidante (captando especies tales como el anión superóxido o los radicales alcoxilo) o como prooxidante (autooxidándose en presencia de metales). El antioxidante más importante frente a la peroxidación lipídica es el **α-tocoferol o vitamina E**, debido a su naturaleza hidrosoluble, mientras que el **β-caroteno** ofrece una protección eficaz frente al oxígeno singlete ($^1O_2$).

1.1.4 Los biomarcadores de contaminación

Debido a la falta de información real sobre las respuestas de los organismos marinos frente a los contaminantes que se obtenía utilizando únicamente los datos de bioacumulación de sustancias tóxicas en dichos

organismos, surgió la necesidad de definir el concepto de biomarcador (CNRC, 1985). Los biomarcadores serían el punto de unión entre niveles de contaminación y estado de salud ambiental, entre causas y efectos de la contaminación.

Por tanto, un **biomarcador** se podría definir como una respuesta que se puede medir a cualquier nivel de organización biológica y relacionar con niveles de contaminación (Bucheli y Fent, 1995). En la **Fig. 1.II** se muestra un resumen de las relaciones entre los principales contaminantes y biomarcadores.

Dentro de los biomarcadores se distinguen dos grandes grupos: los **de exposición**, que están más relacionados con los niveles de contaminantes, y los **de efecto**, que son indicativos de las consecuencias de dichos contaminantes sobre los seres vivos. Dentro de los primeros, destacan el sistema MFO (sistema enzimático de fase I) y las metalotioneínas, mientras que entre los segundos son importantes la peroxidación lipídica y la genotoxicidad (formación de aductos de ADN).

Por último, es importante mencionar los criterios que se han de seguir para la **elección de un biomarcador**. En primer lugar, el cambio biológico ha de deberse únicamente a la presencia de contaminantes, de ahí que sea necesario tener en cuenta la variabilidad debida a factores tales como la época del año, el sexo o la temperatura a la hora de obtener una buena medida. En segundo lugar, este cambio biológico debe estar relacionado con un efecto adverso de algún aspecto de la bioquímica o fisiología del animal, teniendo un tiempo de respuesta corto y abarcando un rango que incluya tanto las condiciones óptimas como las letales (Bayne, 1985).

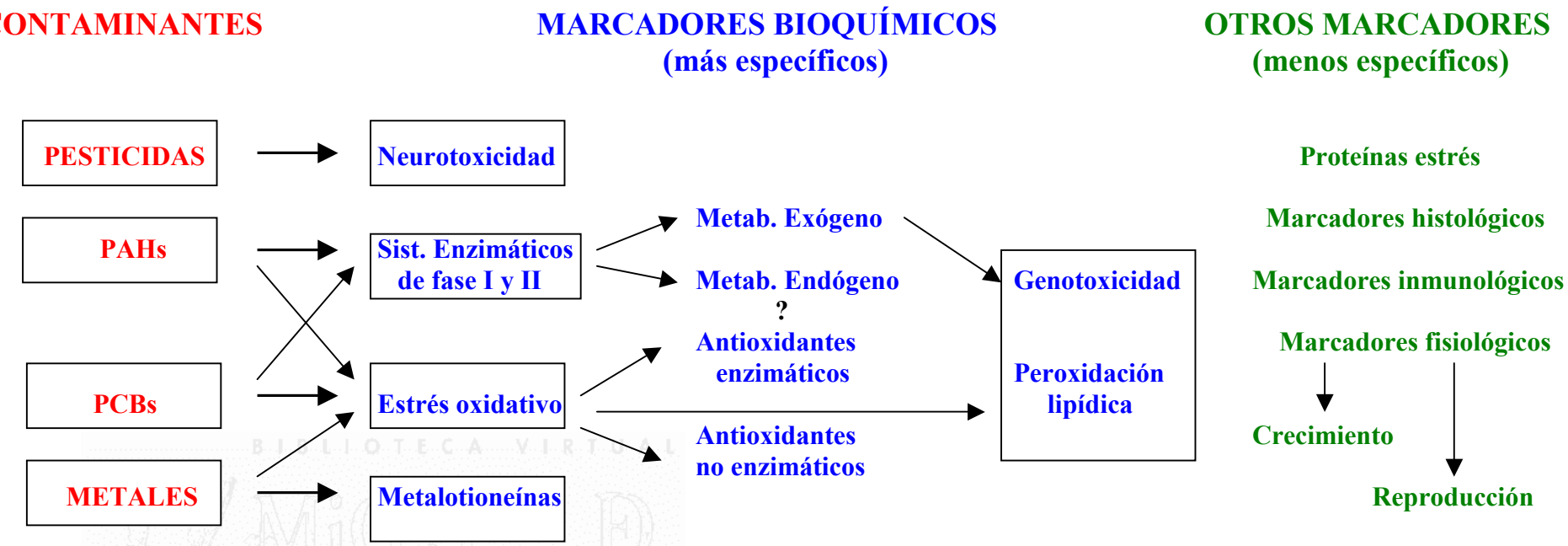


Fig. 1.II. Relación entre los principales **contaminantes** y **biomarcadores** (adaptado de Narbonne y Michel, 1993).

1.2 EL ERIZO DE MAR, *Paracentrotus lividus*, Lmk.

1.2.1 Clasificación

El erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, es un invertebrado marino perteneciente al phylum Echinodermata, al igual que las estrellas de mar y las holoturias. Su clasificación sistemática es la siguiente:

PHYLUM	Echinodermata
SUBPHYLA	Echinozoa
CLASE	Echinoidea
SUBCLASE	Euechinoidea
SUPERORDEN	Echinacea
ORDEN	Echinoida
FAMILIA	Echinidae
GÉNERO	Paracentrotus
ESPECIE	*Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

1.2.2 Biología general

Las principales características de *Paracentrotus* sp. son:

-Un cuerpo con una simetría pentarradiada.

-Un endoesqueleto calcáreo formado por dos tipos de placas unidas a una testa rígida.

-Un conjunto de cavidades internas complejas, entre las que destaca el sistema ambulacral, llenas de agua de mar y que facilitan el desplazamiento y la comunicación con el medio externo.

-Una estructura característica en la boca, denominada linterna de Aristóteles, formada por una serie de piezas calcáreas y que les permite desmenuzar tanto alimentos tiernos como estructuras mineralizadas.

-Un estado larvario nadador (larva "pluteus"), que da lugar a la forma adulta a través de una metamorfosis compleja.

En la **Fig. 1.III** se puede apreciar un esquema de la estructura interna del erizo de mar, así como un detalle del endoesqueleto.

Paracentrotus lividus es una especie eminentemente herbívora y se alimenta fundamentalmente de grandes algas. En Galicia, los ejemplares de la zona intermareal consumen principalmente *Lytophyllum incrustans* y algas pardas incrustantes, mientras que en la zona infralitoral se nutren de *Laminaria* sp.

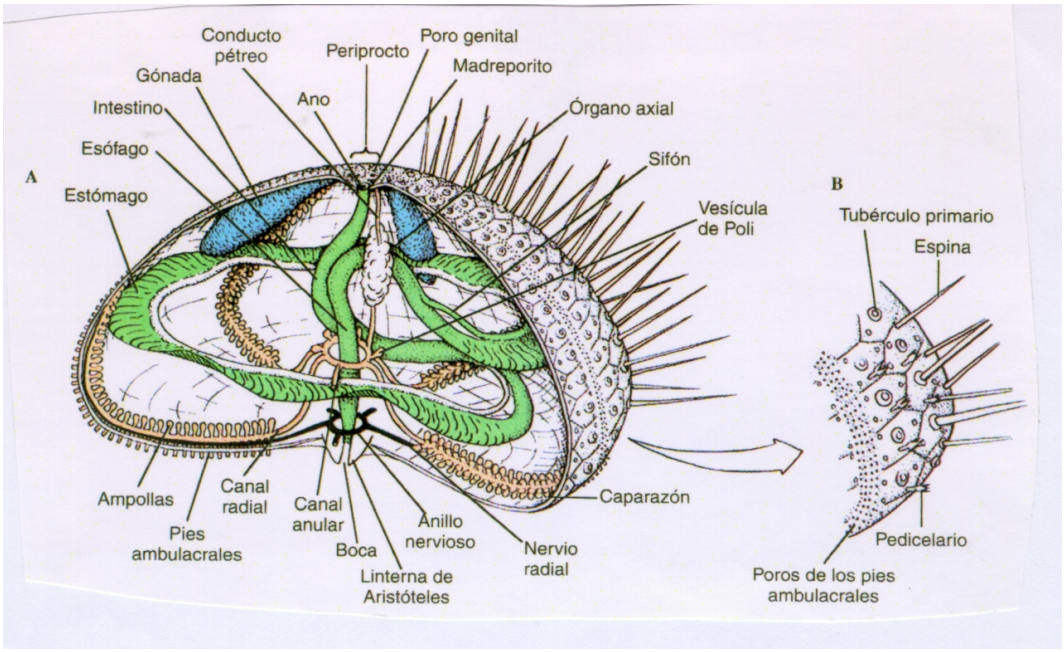


Fig. 1.II. A: **Estructura interna** de un erizo de mar, el sistema vascular acuífero aparece sombreado. **B**: Detalle de una parte del **endoesqueleto** (Hickman *et al*., 1998).

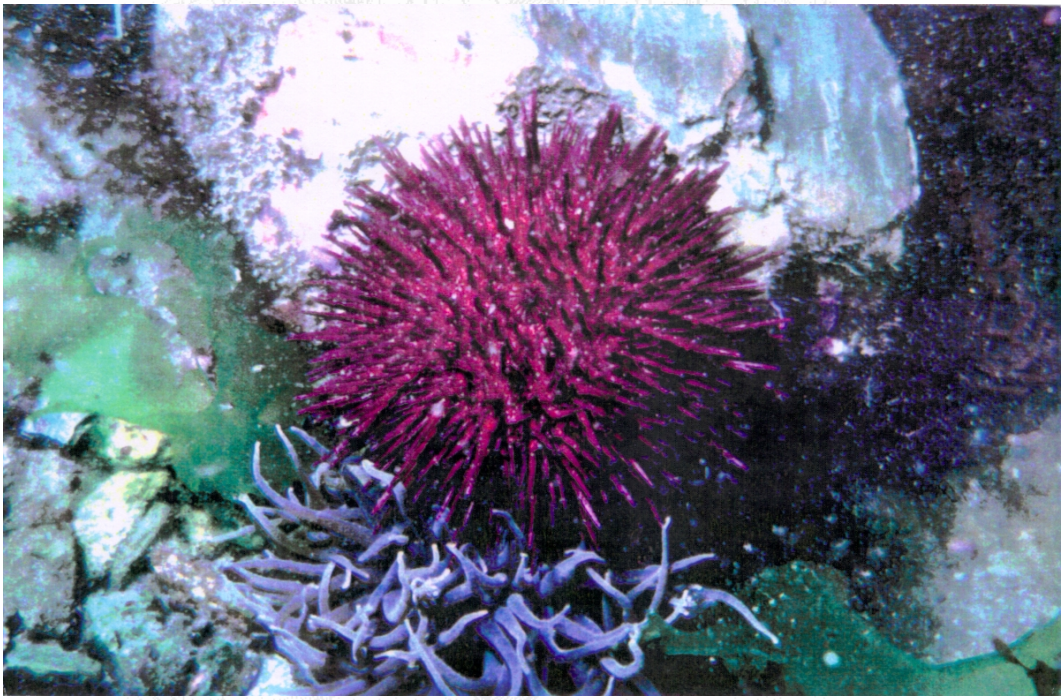


Fig. 1.IV. Colocación predominante *de Paracentrotus lividus* en la población natural (Urgorri *et al*., 1994).

y rodofíceas como la *Palmaria palmata* (Gabín-Sánchez y Lorenzo de Dios, 1993).

La locomoción en los erizos de mar se lleva a cabo por la acción conjunta de los pies ambulacrales y las espinas de la cara inferior, que están articuladas sobre el caparazón por medio de músculos (Le Gall, 1991). Asimismo, estos animales presentan un fototactismo negativo, es decir, se protegen de la luz situándose en grietas, algas y conchas.

Las cinco gónadas que posee *P. lividus* están situadas en las áreas interambulacrales, siendo estos animales dioicos, aunque sin dimorfismo sexual externo. En su ciclo reproductivo se pueden distinguir dos etapas bien diferenciadas: por un lado la de maduración, en la cual las gónadas acumulan reservas nutritivas y aumentan de tamaño y, por otro lado, la fase de desove, durante la cual se produce la liberación de la totalidad del contenido gonadal al mar, con vistas a una posible fecundación externa de los gametos y posterior formación de larvas, que acabarán dando lugar a ejemplares adultos. En general, en dicho período influyen una serie de factores externos, tales como la temperatura, el fotoperíodo, el alimento o la acción de las olas (Spirlet *et al.*, 1998).

1.2.3 Hábitat y distribución geográfica

El erizo de mar, *P. lividus*, se distribuye por todo el mar Mediterráneo y costas atlánticas europeas, desde el S.O. de Irlanda hasta las costas de Marruecos, Islas Canarias, Madeira y Azores.

Es una especie propia de fondos rocosos desde la zona intermareal baja (charcas de marea) hasta una profundidad máxima, en Galicia, de 150 m en Fisterra, aunque las mayores densidades de población se sitúan hasta los 8 m de profundidad (Besteiro y Urgorri, 1988). En la **Fig. 1.IV** se aprecia la disposición típica de *P. lividus* en una población.

1.2.4 Importancia comercial: captura y cultivo en criadero

Existen dos formas de obtención del erizo de mar para su consumo: la captura y el cultivo en criadero.

1.2.4.1 Captura

Es el método más empleado. Tradicionalmente, se realizaba con truel y con ayuda de un espejo, pero la visibilidad era escasa. En la actualidad, se lleva a cabo la explotación subacuática, en la cual un submarinista provisto de una saranda recoge los erizos, mientras que otra persona desde una embarcación realiza el seguimiento.

La producción mundial de erizos de mar y otros equinodermos se ha situado, en estos últimos 10 años, en torno a las 100.000 Tm, siendo las capturas en 1997 de 109.174 Tm (FAO, 1998). Los principales países productores son tres: Chile (con la especie *Loxechinus albus*), Japón (*Strongylocentrotus intermedius* y *S. nudus*) y Estados Unidos de América (*S. franciscanus* y *S. droebachiensis*) (Keesing y Hall, 1998).

En cuanto a Europa, que es la zona donde se explota la especie *Paracentrotus lividus*, los datos de producción en el año 1997 fueron del orden de las 1.000 Tm, siendo los principales países productores Francia e Irlanda. Sin embargo, debido a la sobreexplotación que ha tenido lugar en los últimos años, se ha hecho necesaria su importación desde otros países (Serrao, 1988).

Galicia es la región de España con un mayor volumen de capturas, que fueron de unas 500 Tm/año de media entre los años 1996 y 1998, con un valor en primera venta de 56,6 millones de pesetas en 1998. Estas cifras deben ser corregidas por el furtivismo observado para *P. lividus*, con lo cual la media anual se situaría en unas 600 Tm/año, muy lejos de las 800 Tm/año producidas en la campaña de 1990-91 (Catoira, 1999). Las lonjas que acaparan un mayor porcentaje de producción son las de Cangas, Porto do Son, Camariñas y Lira-Carnota. La extracción de erizos está sujeta al Plan Xeral de Explotación Marisqueira de la Xunta de Galicia, delimitando el período de captura entre el 2 de Enero y el 30 de Abril y entre el 1 de Octubre y el 30 de Diciembre y regulando la talla mínima de dicha especie a 5,5 cm de diámetro ecuatorial sin púas (Urgorri *et al*., 1994).

1.2.4.2 Cultivo en criadero

El cultivo en criadero de erizos de mar se ha comenzado a desarrollar como consecuencia del aumento de demanda. En Japón está ya implantado desde

los años sesenta, pero a nivel europeo sólo se han realizado algunas experiencias piloto en Francia y, más recientemente, en Galicia (Le Gall, 1991; Catoira, 1999).

En primer lugar, se realiza una inducción a la puesta de ejemplares adultos, bien por métodos eléctricos o por métodos químicos. A continuación, se lleva a cabo la fecundación de los óvulos introduciendo 1 ml de solución de esperma por 30 ml de solución de óvulos, para evitar la polispermia. En 24 horas, se forman larvas "pluteus", que pasan a ser cultivadas en tanques cilíndricos con temperatura controlada y con alimentos a base de microalgas marinas. Al cabo de un mes, ya se dispone de erizos jóvenes, que son estabulados y trasladados a zonas de engorde, con sistemas de circulación de agua, bien en toboganes de cultivo en cautividad o bien en jaulas de cultivo situadas en un polígono de bateas, siendo alimentados con macroalgas del tipo *Litophyllum* sp. y *Laminaria* sp. (Catoira, 1999).

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE ESTUDIO

A la vista de todo lo anteriormente expuesto, se ha considerado necesario realizar el presente estudio por varias razones:

1. Ausencia de estudios referidos al **valor nutritivo** del erizo de mar, *P. lividus*, pese a su creciente importancia económica en la comunidad autónoma de Galicia.
2. Necesidad de búsqueda de **nuevas especies bioindicadoras de contaminación** en el medio marino.

1.4 OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO

Por tanto, se han planteado los siguientes objetivos en el presente estudio:

1. Estudio del **ciclo gonadal** y de la variación estacional de la **composición bioquímica** en los distintos tejidos de *Paracentrotus lividus*.
2. Estudio de la **peroxidación lipídica** en *P. lividus*, su distribución tisular, su variación estacional, así como la posible influencia *in vitro* de algunos metales pesados y xenobióticos sobre dicho parámetro, con vistas a la evaluación de su posible uso como biomarcador de contaminación.

3. Estudio de las **enzimas reductasas asociadas al sistema MFO** en *P. lividus*, su distribución tisular y subcelular, su variación estacional y la posible influencia *in vitro* de algunos metales pesados y xenobióticos sobre dicho parámetro, con vistas a la evaluación de su posible uso como biomarcador de contaminación.

1.5 PROCEDENCIA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Los erizos de mar, *P. lividus,* (n≥30) de tamaño comercial (ver **resultados**) se recogieron mensualmente, mediante la técnica de buceo, en Lorbé, Ría de Ares-Betanzos (Galicia, N.O. España) (**Fig. 1.V**), a una profundidad entre 4 y 8 m y entre los meses de noviembre de 1994 y octubre de 1995.

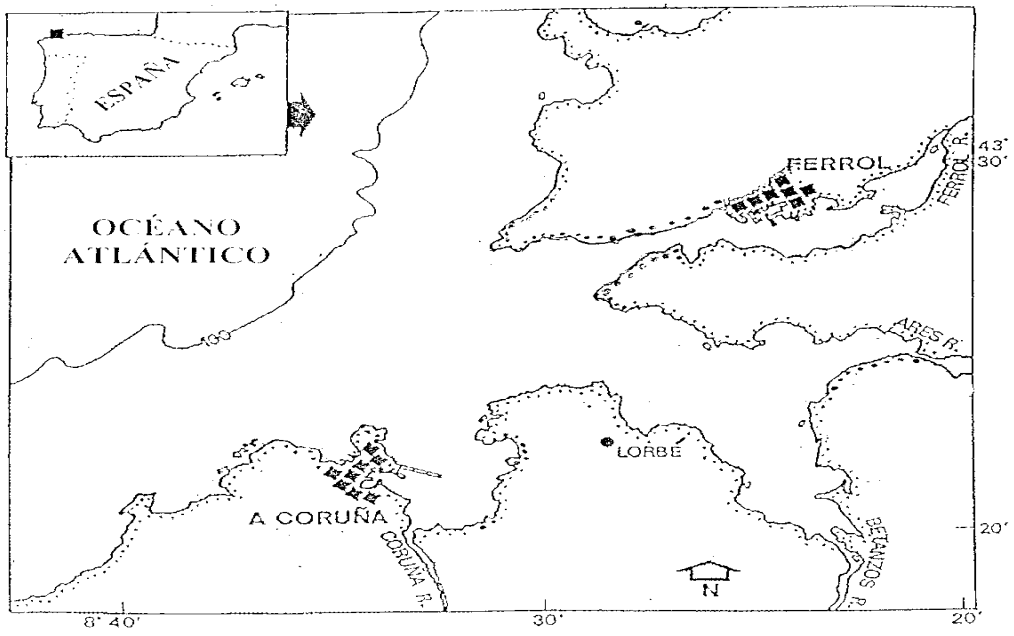


Fig. 1.V. Mapa de la zona de **recogida de las muestras** de *Paracentrotus lividus* (adaptado de Biosca, 1997).

Los animales se llevaron inmediatamente al laboratorio, donde se realizó la disección en las 24 horas siguientes a fin de evitar el desove. Se midió la altura y diámetro de cada uno de los individuos, así como su peso total y el de las gónadas, previamente extraídas y secadas con papel de filtro. Posteriormente, se congelaron en nitrógeno líquido tanto las gónadas como el contenido digestivo en forma de pool y se almacenaron en un congelador a -70 ºC hasta su uso.

1.6 APARATOS Y REACTIVOS EMPLEADOS

1.6.1 Aparatos

Las pesadas de precisión se hicieron en una balanza analítica eléctrica marca Sartorius, modelo 2405, con cinco cifras decimales y aquellas que no requerían precisión en granatario.

Para las medidas de pH se usó un micropHmetro marca Crison modelo 2001, que da la medida entre 0 y 14 unidades, con un ajuste de dos decimales.

La homogeneización del material liofilizado se llevó a cabo en tubos Corex mediante un homogeneizador marca Ommi, modelo 2000, con un Macro Generador modelo 10010L.

Los homogeneizados de tejido fresco se realizaron en un homogeneizador de teflón Potter-Elvehjem, conectado a un motor eléctrico, que permitía alcanzar velocidades entre 2.000 y 2.500 rpm.

Para la centrifugación de las muestras se empleó una centrífuga refrigerada de alta velocidad, marca Sorvall, modelo RC-5B, con un rotor SA-600, capaz de alcanzar una fuerza centrífuga máxima de 20.000 rpm. Los tubos de centrífuga utilizados fueron de policloruro, excepto para la medida de la peroxidación lipídica que fueron de polipropileno, más resistentes al ácido metasulfónico y al acetonitrilo.

Para la obtención de la fracción microsomal fue necesario el uso de una ultracentrífuga refrigerada, marca Beckman, modelo L8-70M, con un rotor SW-40, que podía alcanzar velocidades entre 1.000 y 70.000 rpm.

En las medidas de absorbancias se usó un espectrofotómetro de barrido de doble haz visible-ultravioleta, marca Philips, modelo PU-8740. Las cubetas utilizadas en estas medidas fueron de plástico, para un volumen de 1 ml.

También se necesitaron baños de agua termostatizados a 45º ± 1ºC y 25º ± 1ºC para la incubación de las muestras.

1.6.2 Reactivos

Los reactivos fueron suministrados por las casas comerciales Merck, Sigma y Probus siendo estos, como mínimo, productos de calidad análisis. En cada capítulo se describen con mayor detalle los reactivos empleados.

1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo a través del programa informático SPSS (versión 6.1) para Windows.

Los resultados se expresaron como la media ± error estándar para n determinaciones, excepto en el caso de las medidas biométricas, donde se calculó la media ± desviación estándar.

Los datos se procesaron por medio del análisis de varianza de una sola vía (ANOVA de una vía) seguido por el test de Tukey-B, con un nivel de significación de 0,05 (Grant y Tyler, 1983). Previamente, se comprobó la normalidad y la homocedasticidad de la distribución de datos a través de los tests de Kolmogorov-Smirnoff y de Levene.

Se evaluó el grado de asociación entre los diferentes parámetros a través de los coeficientes de correlación de Spearman (r_s).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Ciclo reproductivo en equinodermos

En las especies pertenecientes al phylum Echinodermata, al igual que en el resto de invertebrados marinos, existe un ciclo reproductivo anual, que viene determinado tanto por **factores exógenos**, relacionados con el medio en el que se encuentran (la temperatura, la profundidad, la salinidad, el fotoperíodo y la biodisponibilidad de alimento) (Lares y Mc Clintock, 1991; Nichols *et al.*, 1985; Basuyaux *et al*., 1998; Walker y Lesser, 1998), como por **factores endógenos**, de tipo neuronal y endocrino (Gonor, 1973a, b).

Aunque el método más correcto para el análisis del ciclo reproductivo es el histológico, **el estudio del índice gonadal** en *P. lividus* ha demostrado ser un método que proporciona una idea bastante aproximada del ciclo gonadal de dicho equinodermo (Guettaf y San Martin, 1995). Se han establecido distintas formas de cálculo de este índice, unas a partir del peso húmedo, otras a partir del peso seco o, incluso, a partir del volumen. En el presente estudio, se ha escogido el cálculo del porcentaje en peso húmedo, ya que ha sido utilizado con anterioridad y ello permite realizar estudios comparativos.

En las gónadas de los equinoideos existen dos tipos principales de células que intervienen en el ciclo reproductivo: las **gametogénicas (oocitos y espermatocitos)**, encargadas de la formación de gametos y los **fagocitos nutritivos,** cuya función es acumular las sustancias de reserva necesarias para el esfuerzo reproductivo, así como eliminar los gametos sobrantes tras el desove (Byrne, 1990).

Las fases del ciclo reproductivo de *P. lividus,* descritas por Spirlet *et al.* (1998) para una población de dicha especie situada en la Bretaña francesa, son tres:

1. Fase de crecimiento: Las gónadas acumulan material de reserva. Tiene lugar durante finales de otoño e invierno.
2. Fase de maduración: Se produce la gametogénesis y el desove. Tiene lugar durante la primavera y principios de verano.

3. Fase de regeneración. Los gametos no emitidos son reabsorbidos por los fagocitos nutritivos, quedando las gónadas prácticamente desprovistas de células sexuales.

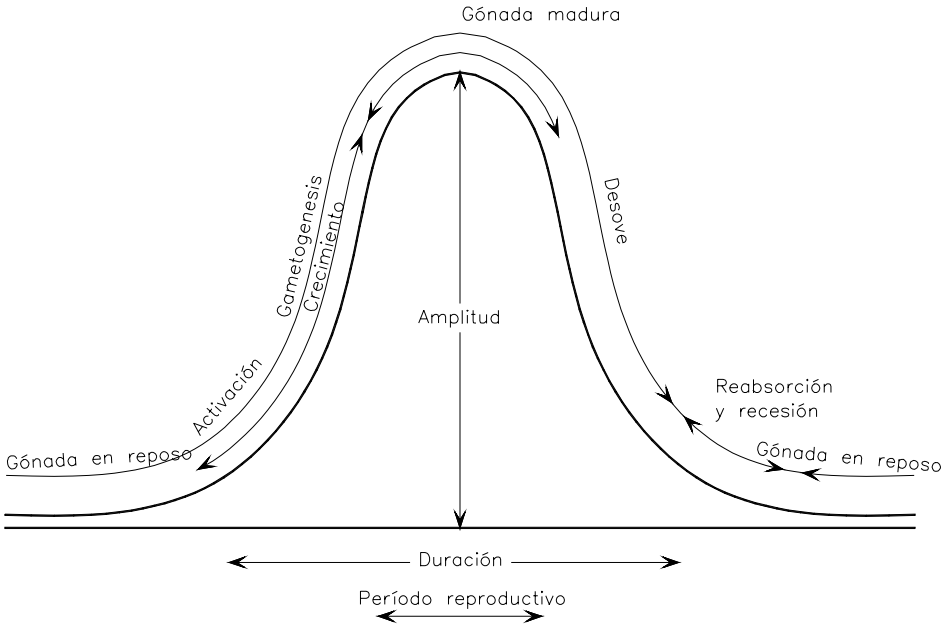


Fig. 2.I. Esquema del **ciclo reproductivo** de **equinodermos** (adaptado de Boolotian, 1966).

2.1.2 Composición bioquímica y ciclos bioquímicos en equinodermos

La composición bioquímica de los equinodermos ha sido ampliamente estudiada en numerosas especies, así como su distribución en los tejidos corporales y su variación estacional. Estas investigaciones se han llevado a cabo en animales procedentes de distintos ambientes, tanto tropicales, como de aguas templadas y polares (Lawrence y Guille, 1982; Fernandez, 1998; Mc Clintock y Pearse, 1987). En estos estudios se ha observado que los principales componentes bioquímicos de las gónadas y del contenido digestivo varían de forma estacional, mientras que los de la testa permanecen prácticamente constantes a lo largo del año.

También se han realizado otro tipo de estudios, que aportan interesantes datos sobre **el papel de los distintos principios inmediatos** en los equinodermos. Es destacable el trabajo de Fenaux *et al.* (1977) sobre la evolución de los parámetros bioquímicos del erizo de mar *Arbacia lixula* en condiciones de ayuno, así como el realizado por Fernandez (1997) sobre el efecto de la dieta en la

composición bioquímica de *P. lividus* procedente de una laguna mediterránea. En dichos trabajos se comprobó que los glúcidos y los lípidos actúan como material de reserva y que, en períodos de escasez de comida, pueden ser transformados en proteínas, que serían el principal componente estructural de los tejidos.

En algunos equinodermos marinos se ha demostrado la existencia de ciclos de almacenamiento y utilización de energía, denominados **ciclos bioquímicos**, que estarían relacionados con los ciclos reproductivos de dichos individuos. Es el caso del estudio realizado en las estrellas de mar, *Asterias rubens* y *Esclerasterias mollis,* en las que se observó un trasvase de principios inmediatos entre los ciegos pilóricos, que actuarían como reservorio, y las gónadas (Oudejans *et al*., 1979; Barker y Xu, 1991). En los erizos de mar, *P. lividus,* se ha establecido que las gónadas tienen una doble función: por una parte, la producción de gametos y, por otra, el almacenamiento de sustancias de reserva, por lo que en estos individuos el sistema digestivo no parece desempeñar ningún papel relacionado con el trasvase de energía (Giese, 1966).

Todos estos estudios son de gran importancia, tanto desde el punto de vista teórico como práctico, ya que permiten conocer no sólo los mecanismos que rigen el ciclo biológico de los equinodermos, sino también el valor nutritivo de las especies de importancia comercial, como es el caso del erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, para optimizar la época de captura y las dietas a emplear para su cultivo en criadero.

2.1.3 Objetivos del presente capítulo

A pesar de la creciente importancia económica de *Paracentrotus lividus*, existe una casi total ausencia de estudios referidos a la composición bioquímica y al posible valor nutritivo de dicho erizo de mar en las costas gallegas, por lo que se plantearon los siguientes objetivos en el presente capítulo:

- Estudio del **ciclo gonadal** del erizo de mar, *P. lividus*.

- Estudio de la **variación estacional de la composición bioquímica,** tanto de las gónadas como del contenido digestivo, en *P. lividus*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Determinación del índice gonadal

Se determina el índice gonadal (IG) para cada individuo, que se calcula como el peso fresco de las gónadas (PF gonadal) dividido por el peso total del animal (PF total), expresado como porcentaje, de acuerdo con Fenaux *et al*. (1977).

2.2.2 Determinación de agua y cenizas

Para obtener el **contenido en agua (%A)** de las muestras es necesario realizar un secado de las mismas, que se efectúa a partir del liofilizado en una estufa a 100ºC durante 48 horas hasta obtener un peso constante. El tejido se introduce en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, realizándose entonces la pesada. Las medidas se hacen por triplicado y los resultados se expresan como porcentaje en peso fresco.

La determinación del **porcentaje de cenizas (%C)** en el tejido se lleva a cabo usando el liofilizado empleado previamente para calcular el porcentaje de humedad de la muestra. Se incinera dicho tejido en una mufla a 500ºC durante toda la noche (unas 16 horas). Una vez transcurrido dicho tiempo, y cuando la temperatura de la mufla es inferior a 100ºC, se pasa la muestra a un desecador hasta temperatura ambiente y posteriormente se realiza la pesada. Grove *et al*. (1961) recomiendan que, para evitar las pérdidas de sodio y potasio, no se superen los 550 ºC ni las 24 horas. Las medidas se realizan también por triplicado. Los resultados se expresan como porcentaje en peso seco.

2.2.3 Determinación de la glucosa libre y el glucógeno

Para la **determinación del glucógeno (%G)** se usa el método descrito por Keppler y Decker (1984) y modificado por Pazos-Castelos (1993). La enzima utilizada es la glucoamilasa (exo-1,4-α-D-glucosidasa, E.C.3.2.1.3.) del hongo *Aspergillus niger*, que hidroliza no sólo los enlaces α-1,4, sino también los α-1,6 glucosídicos del glucógeno y del almidón **(a)**. Los ensayos se realizan en un baño de hielo a 4ºC, ya que a temperatura ambiente la glucosa disminuye rápidamente por acción de la glucoamilasa (Beninger, 1982).

$$\text{Glucógeno} \xrightarrow{\text{glucoamilasa}} \text{Glucosa} \quad \textbf{(a)}$$

El sistema GOD-POD (glucosa oxidasa-peroxidasa) se ha establecido como el más eficaz actualmente para la **cuantificación de la glucosa libre y la procedente de la hidrólisis del glucógeno** (Pazos-Castelos, 1993). Se basa en una serie de reacciones enzimáticas de la glucosa **(b** y **c)**, que dan un compuesto coloreado, con un máximo de absorbancia a 510 nm:

$$\text{D-glucosa} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} \text{D-gluconato} + H_2O_2 \quad \textbf{(b)}$$

$$H_2O_2 + \text{hidroxibenzoato sódico} + \text{4-amino antipirina} \xrightarrow{\text{POD}} H_2O + \text{complejo quinónico} \quad \textbf{(c)}$$

Ambas enzimas (GOD y POD), así como el hidroxibenzoato sódico y la 4-aminoantipirina, proceden de un kit comercial "Glucinet" de laboratorios Sclavo, siendo necesario disolverlos en un tampón fosfato pH 7,5. Se usa un patrón de glucosa de 1 mg/ml. Todos los ensayos se realizan por triplicado. Los resultados se expresan como porcentaje en peso seco.

2.2.4 Determinación de proteínas

El análisis elemental CHN es el método empleado, usando un analizador elemental Carlo Erba modelo 1108 del Servicio de Análisis Elemental de la Universidad de Santiago de Compostela y siendo el patrón la acetanilida. El factor de conversión del nitrógeno en proteína elegido es 6,25, que corresponde al 16% de contenido en nitrógeno en la proteína (Beukema y de Bruin, 1979; Beninger, 1982). Todos los ensayos se realizan por triplicado. Los resultados se expresan como porcentaje en peso seco.

2.2.5 Determinación de los lípidos totales, acilglicéridos y colesterol

2.2.5.1 Extracción lipídica

El procedimiento empleado es el descrito por Folch *et al*. (1957), con modificaciones de Beninger y Lucas (1984), mediante el cual se obtienen los lípidos totales a partir de una mezcla extractora de cloroformo-metanol (2:1). El

extracto obtenido se lava con una solución salina de ClNa al 0,6% (P/V), formándose dos fases: la superior con agua, metanol e impurezas no lipídicas y la inferior con cloroformo y la fracción lipídica.

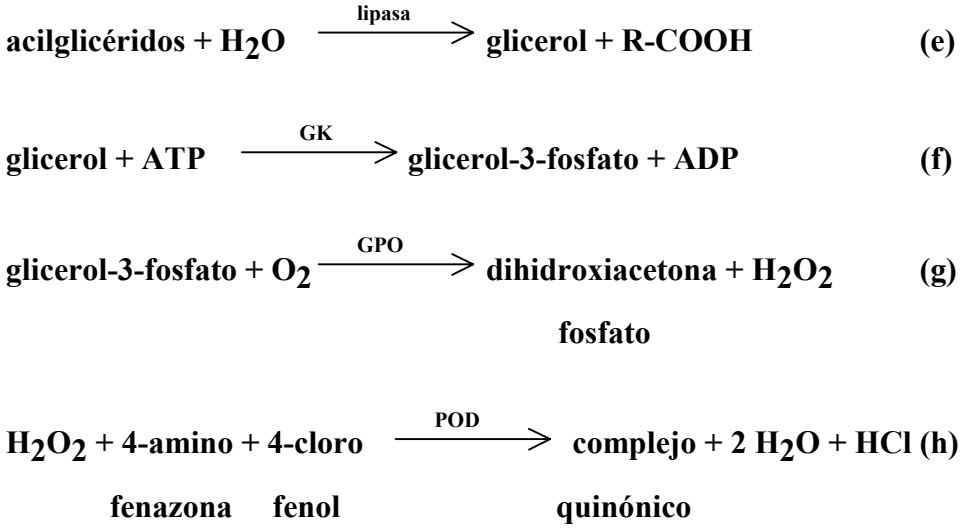
A continuación, se realiza una segunda purificación, a través de sucesivas evaporaciones en rotavapor y posteriores redisoluciones en cloroformo, con el fin de eliminar trazas de materias no solubles en cloroformo y presentes en el extracto bruto (Beninger, 1982).

2.2.5.2 Determinación de los lípidos totales

Se emplea para la cuantificación de los lípidos totales (%L) un método gravimétrico (Bligh y Dyer, 1959). Se basa en la estimación de dichos compuestos por la diferencia de peso de una cápsula de aluminio vacía y otra con el extracto lipídico, previa evaporación del cloroformo en estufa. Los ensayos se realizan por triplicado. Los resultados se expresan como porcentaje en peso seco.

2.2.5.3 Determinación de los acilglicéridos

El método usado para la determinación de los acilglicéridos se basa en la hidrólisis enzimática de los acilglicéridos por una lipasa con la consiguiente liberación del glicerol. Dicho glicerol se determina enzimáticamente a través de una serie de reacciones acopladas **(e**, **f**, **g** y **h)**, que conducen a la formación de un compuesto coloreado, con un máximo de absorbancia a 500 nm (Nägele *et al*., 1985):

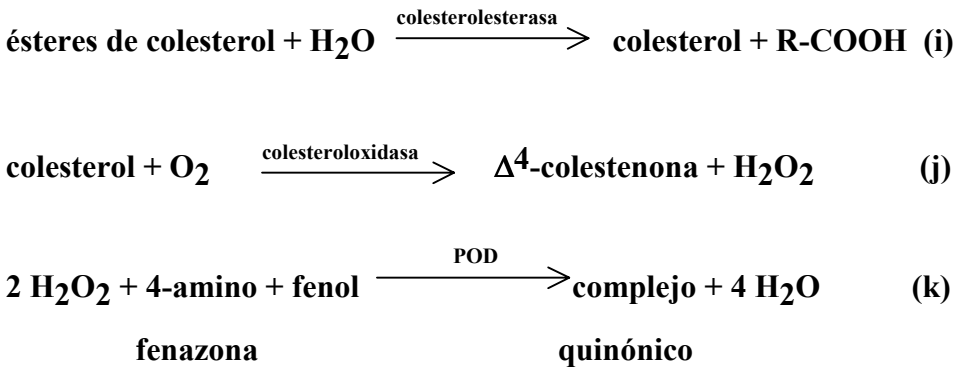


Tanto el ATP y la 4-aminofenazona, como todas las enzimas presentes, que son la lipasa (triacilglicerol acilhidrolasa, EC 3.1.1.3), la GK (ATP: glicerol 3-fosfotransferasa, EC 2.7.1.30), la GPO (L-glicerol-3-fosfato: oxígeno 2-oxidorreductasa, EC 1.1.3.-) y la POD (peróxido de hidrógeno oxidorreductasa, EC 1.11.1.7), están incluidos en el kit comercial "Triglicéridos GPO-PAP" de Boehringer Mannhein. Es importante señalar el uso del 2-propanol como disolvente en vez del cloroformo, ya que presenta la ventaja de que, además de disolver lípidos, es soluble en agua y, por tanto, un buen medio para las reacciones enzimáticas. Se usa como patrón glicerol 0,21 mg/ml. Todos los ensayos se realizan por triplicado. Puesto que la mayor parte de los acilglicéridos corresponden a triglicéridos, se ha optado por hablar de triglicéridos (%TG) en vez de acilglicéridos. El factor de conversión utilizado para transformar el glicerol en triglicéridos es 9,635. Los resultados se expresan como porcentaje en peso seco y en lípidos totales.

BIBLIOTECA VIRTUAL

2.2.5.4 Determinación del colesterol total y libre

La determinación del colesterol (%COL) se realiza por un método enzimático, en el cual el colesterol (bien sea libre o procedente de la ruptura de los ésteres de colesterol por una colesterolesterasa), a través de una serie de reacciones **(i**, **j** y **k)**, da lugar a un compuesto coloreado, con un máximo de absorbancia a 500 nm (Siedel *et al*., 1985):



El fenol y la 4-aminofenazona así como todas las enzimas, es decir, la colesterolesterasa (esterol-éster acil hidrolasa, EC 3.1.1.13), la colesteroloxidasa (colesterol:oxígeno oxidorreductasa, EC 1.1.3.6) y la peroxidasa (peróxido de hidrógeno oxidorreductasa, EC 1.11.1.7), aparecen incluidos en los kits

comerciales "F-CHOL MPR1" y "CHOL MPR2" de Boehringer-Mannheim para la determinación del colesterol libre y del colesterol total, respectivamente. Cabe señalar que, tanto la colesterolesterasa como la colesteroloxidasa, no son específicas para el colesterol, sino que son activas frente a todos los esteroles con un grupo -OH en posición 3β (Pazos-Castelos, 1993). De nuevo, se vuelve a elegir el 2-propanol como disolvente. El patrón usado es colesterol 0,5 mg/ml. Todos los ensayos se realizan por triplicado. Los resultados se expresan como porcentaje en peso seco y en lípidos totales.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Medidas biométricas e índice gonadal

El **diámetro medio de la testa** (sin espinas) oscila entre 54,47 y 60,30 mm y la **altura media de la testa** entre 25,39 y 34,72 mm (**Tabla 2.1**). El **peso fresco** (PF) **total** medio está comprendido entre 74,36 y 91,99 g, mientras que el **PF gonadal** medio muestra valores mínimos en agosto de 1995 (1,73 g) y máximos en marzo de 1995 (10,67 g), tal y como se observa en la **Fig. 2.1**.

Fecha	diámetro de testa (mm)	altura de testa (mm)	PF total (g)	PF gonadal (g)	IG
22-11-94	58,15 ± 4,16	28,60 ± 2,84	85,40 ± 14,97	3,91 ± 1,29	4,64 ± 1,52
26-12-94	59,19 ± 3,25	29,44 ± 2,03	91,41 ± 13,02	5,97 ± 1,98	6,51 ± 1,77
27-01-95	54,47 ± 3,39	27,26 ± 2,75	74,36 ± 13,25	5,76 ± 2,30	7,68 ± 2,23
28-02-95	55,25 ± 3,02	25,39 ± 2,15	77,43 ± 12,20	6,62 ± 1,97	8,62 ± 2,32
30-03-95	58,67 ± 3,98	30,31 ± 3,55	87,42 ± 12,87	10,67 ± 2,51	12,16 ± 2,01
28-04-95	58,83 ± 4,59	34,72 ± 3,48	77,85 ± 13,43	8,87 ± 2,56	11,36 ± 2,38
26-05-95	59,89 ± 4,05	34,25 ± 2,52	86,81 ± 15,53	9,72 ± 3,16	11,21 ± 3,13
28-06-95	60,17 ± 3,59	33,56 ± 2,33	89,18 ± 14,04	3,12 ± 1,25	3,54 ± 1,35
21-07-95	57,50 ± 3,23	29,31 ± 3,05	82,49 ± 12,19	3,11 ± 0,95	3,77 ± 0,99
28-08-95	55,54 ± 4,62	27,82 ± 4,65	74,88 ± 17,09	1,73 ± 0,59	2,31 ± 0,68
26-09-95	57,60 ± 4,37	32,10 ± 3,14	80,81 ± 18,80	3,10 ± 0,98	3,85 ± 0,93
30-10-95	60,30 ± 3,14	32,97 ± 3,35	91,99 ± 16,54	4,99 ± 1,48	5,43 ± 1,44

Tabla 2.1. Variación estacional de las **medidas biométricas** y del **índice gonadal** (IG) de *Paracentrotus lividus* (PF=peso fresco). Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar para 32 animales.

El **índice gonadal** (IG) de *P. lividus* muestra una clara variación estacional (**Fig. 2.2**). Los valores de dicho índice aumentan de forma acusada a partir de noviembre de 1994 (4,64), alcanzando un pico máximo en marzo de 1995 (12,16). Los niveles se mantienen durante los tres meses siguientes, comenzando a partir de mayo de 1995 un rápido descenso hasta alcanzar los valores mínimos durante los meses de junio (3,54), julio (3,77) y agosto de 1995 (2,3l) (ANOVA de una vía, $p<0,05$). A partir de septiembre de 1995 (3,85) se inicia una recuperación en el índice gonadal (**Tabla 2.l**).

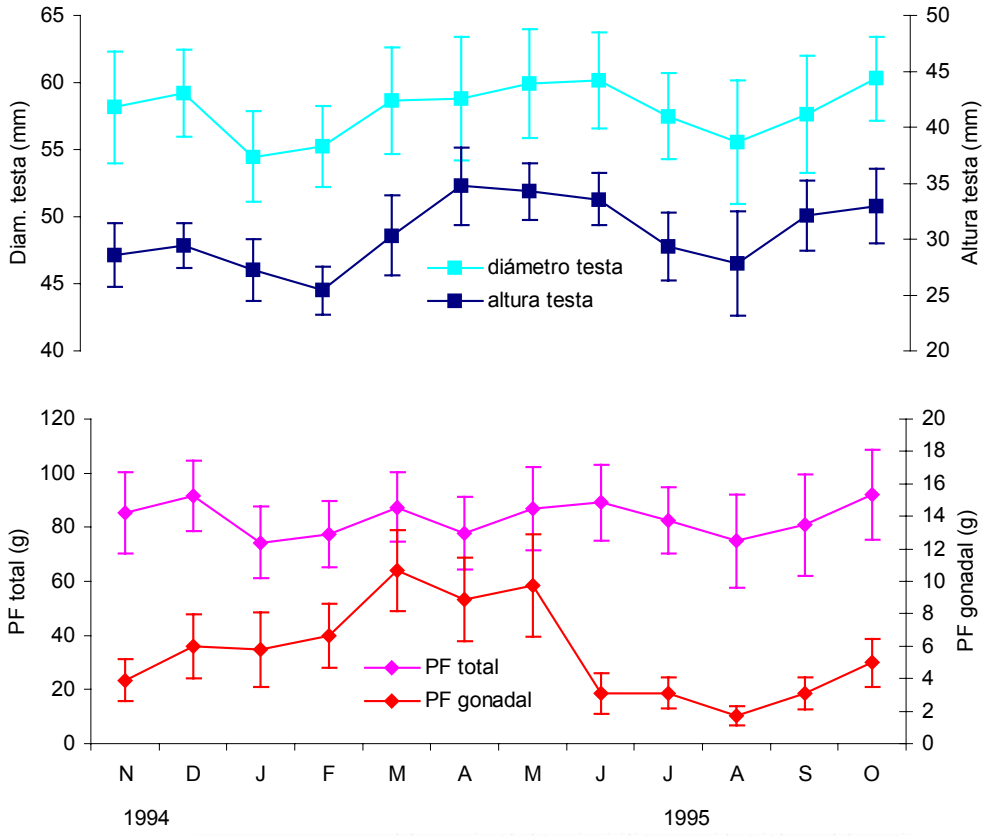


Fig. 2.1. Variación estacional de las **medidas biométricas** en *Paracentrotus lividus* (PF=peso fresco). Los resultados son la media ± desviación estándar para 32 determinaciones.

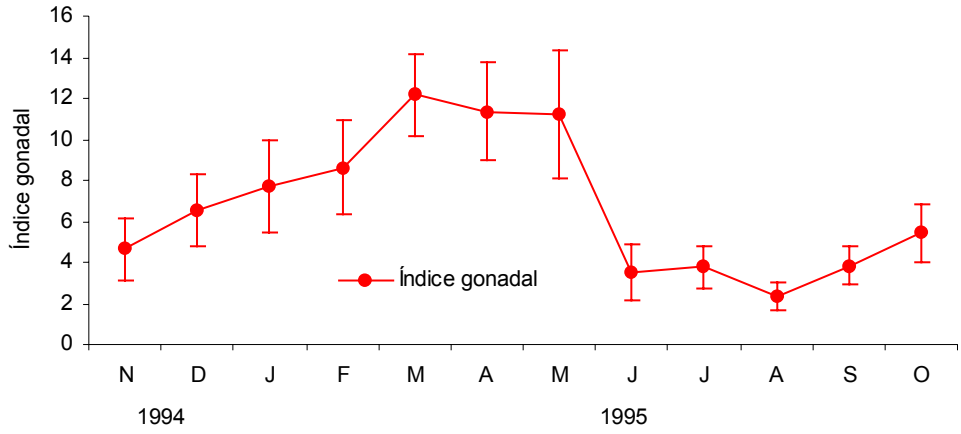


Fig. 2.2. Variación estacional del **índice gonadal** en *P. lividus*. Los resultados son la media ± desviación estándar para 32 determinaciones.

2.3.2 Contenido en agua y cenizas

El contenido en agua se expresa como porcentaje en peso fresco (mg/100 mg peso fresco, %PF) y el de cenizas como porcentaje en peso seco (mg/100 mg peso seco, %PS).

2.3.2.1 Contenido en agua

El contenido en **agua** (%A) en las **gónadas** de *P. lividus* muestra una cierta variación a lo largo del año (**Fig. 2.3**), oscilando entre un 70,32% y un 80,49% en peso fresco en los meses de noviembre de 1994 y julio de 1995, respectivamente ANOVA de una vía, $p<0,05$) (**Tabla 2.2**).

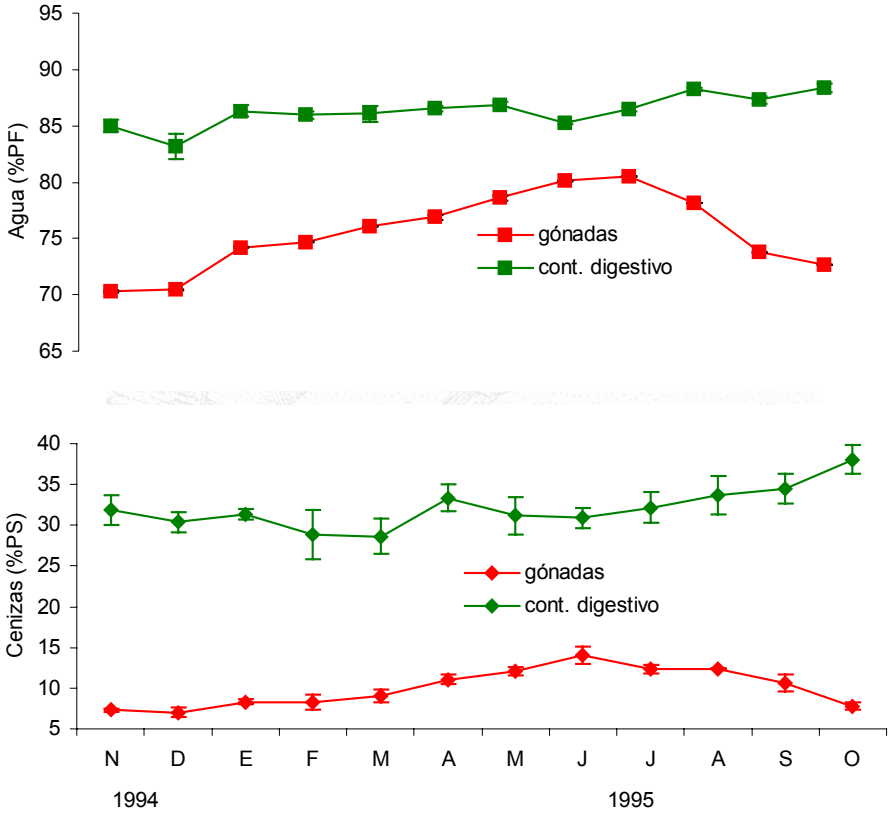


Fig. 2.3. Variación estacional del contenido en **agua** y **cenizas**, expresado como porcentaje en peso fresco (%PF) y en peso seco (%PS) respectivamente, en las **gónadas** y el **contenido digestivo** de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 3 determinaciones.

El porcentaje de **agua en el contenido digestivo** es mayor que en las gónadas de dicho animal, mostrando valores que oscilan entre el 83,13% en

diciembre de 1994 y el 88,37% en octubre del año siguiente (ANOVA de una vía, p<0,05) (**Tabla 2.2**).

	%Agua (%A)		%Cenizas (%C)	
Fecha	Gónadas	Cont. digestivo	Gónadas	Cont. digestivo
22-11-94	70,32 ± 0,09	84,99 ± 0,54	7,30 ± 0,16	31,87 ± 1,89
26-12-94	70,45 ± 0,01	83,13 ± 1,13	7,02 ± 0,61	30,41 ± 1,24
27-01-95	74,21 ± 0,03	86,30 ± 0,52	8,32 ± 0,30	31,30 ± 0,68
28-02-95	74,67 ± 0,06	85,98 ± 0,36	8,31 ± 0,93	28,92 ± 3,02
30-03-95	76,07 ± 0,02	86,07 ± 0,70	9,06 ± 0,79	28,61 ± 2,16
28-04-95	76,89 ± 0,24	86,56 ± 0,22	11,07 ± 0,60	33,37 ± 1,68
26-05-95	78,60 ± 0,23	86,90 ± 0,25	12,07 ± 0,47	31,20 ± 2,28
28-06-95	80,11 ± 0,03	85,30 ± 0,13	14,04 ± 1,04	30,90 ± 1,29
21-07-95	80,49 ± 0,01	86,44 ± 0,19	12,34 ± 0,48	32,16 ± 1,90
28-08-95	78,19 ± 0,01	88,24 ± 0,17	12,35 ± 0,07	33,67 ± 2,35
26-09-95	73,77 ± 0,06	87,29 ± 0,34	10,62 ± 1,01	34,49 ± 1,87
30-10-95	72,68 ± 0,03	88,37 ± 0,38	7,79 ± 0,48	38,08 ± 1,74

Tabla 2.2. Variación estacional del contenido en **agua** (%A) y **cenizas** (%C), expresado como porcentaje en peso fresco (%PF) y en peso seco (%PS) respectivamente, en las **gónadas** y en el **contenido digestivo** de *P. Iividus*. Los resultados se expresan como la media ± e.s. para 3 determinaciones.

2.3.2.2 Contenido en cenizas

El perfil del contenido en **cenizas** (%C) presente **en las gónadas** es similar al observado para el porcentaje de agua (**Fig. 2.3**). Presenta valores mínimos en diciembre de 1994 (7,02%) y máximos en junio de 1995 (14,04%) (ANOVA de una vía, p<0,05) (**Tabla 2.2**).

Se observan niveles altos de **cenizas en el contenido digestivo**, que están comprendidos entre un 28,61% en marzo de 1995 y un 38,08% en octubre de 1995, momento en el que se determina el valor máximo para el digestivo (ANOVA de una vía, p<0,05) (**Fig. 2.3**).

2.3.3 Contenido en glúcidos, proteínas y lípidos totales

Todos los contenidos de componentes bioquímicos que se analizan en este apartado se expresan como porcentaje en peso seco (mg/100 mg peso seco, %PS).

2.3.3.1 Contenido en glúcidos

Se determinaron los niveles de glucógeno y de glucosa libre tanto en las gónadas como en el contenido digestivo de *P. lividus*. Sin embargo, la glucosa libre no se consiguió medir en las muestras analizadas, por lo que el glucógeno parece ser el principal componente de los glúcidos presentes en *P. lividus*.

	%Glúcidos (%G)		%Proteínas (%P)		%Lípidos totales (%L)	
Fecha	Gónadas	Cont. digestivo	Gónadas	Cont. digestivo	Gónadas	Cont. digestivo
22-11-94	23,70 ± 0,58	2,87 ± 0,32	36,05 ± 0,99	25,48 ± 5,79	12,56 ± 0,28	8,94 ± 0,39
26-12-94	25,43 ± 0,41	3,82 ± 0,29	45,20 ± 0,65	29,56 ± 8,34	14,25 ± 0,30	6,83 ± 0,28
27-01-95	25,02 ± 0,72	6,09 ± 0,39	50,81 ± 2,33	35,56 ± 3,08	13,57 ± 0,46	7,64 ± 0,14
28-02-95	19,60 ± 0,41	2,98 ± 0,51	48,53 ± 0,14	36,15 ± 3,59	15,92 ± 0,34	8,08 ± 0,11
30-03-95	14,81 ± 0,98	3,24 ± 0,19	51,59 ± 1,19	42,00 ± 3,37	13,99 ± 0,27	9,06 ± 0,14
28-04-95	11,51 ± 0,74	2,84 ± 0,28	57,07 ± 1,12	41,03 ± 5,11	12,80 ± 0,75	9,92 ± 0,25
26-05-95	8,71 ± 0,62	3,08 ± 0,09	60,10 ± 1,39	32,49 ± 3,67	13,45 ± 0,84	9,31 ± 0,39
28-06-95	6,96 ± 0,50	3,51 ± 0,37	56,28 ± 0,66	36,04 ± 7,94	13,68 ± 0,06	6,66 ± 0,24
21-07-95	7,97 ± 0,31	2,65 ± 0,59	50,12 ± 3,21	24,07 ± 1,13	13,26 ± 0,33	8,62 ± 0,12
28-08-95	15,29 ± 0,68	2,27 ± 0,60	46,11 ± 0,83	27,33 ± 1,85	13,21 ± 0,24	6,40 ± 0,34
26-09-95	25,11 ± 0,30	3,17 ± 0,27	39,13 ± 0,03	31,91 ± 2,05	16,10 ± 0,78	7,70 ± 0,15
30-10-95	23,84 ± 1,53	2,83 ± 0,37	42,83 ± 0,50	26,95 ± 1,41	13,14 ± 0,45	7,29 ± 0,33

Tabla 2.3. Variación estacional del contenido en **glúcidos** (%G), **proteínas** (%P) y **lípidos totales** (%L), expresado como porcentaje en peso seco (%PS), en las **gónadas** y en el **contenido digestivo** de *P. Iividus*. Los resultados se expresan como la media ± e.s. para 3 determinaciones.

Se observa una marcada variación estacional en los niveles de **glúcidos** (%G) **en las gónadas** de *P. lividus*, con valores que oscilan entre un 6,96% en junio de 1995 y un 25,43% en diciembre de 1994 (**Tabla 2.3**) (ANOVA de una vía, $p<0,05$). Los niveles se mantienen elevados desde noviembre de 1994 hasta enero de 1995 y a partir de ese mes descienden de forma brusca, apareciendo los valores mínimos entre junio y julio de 1995, produciéndose a continuación una recuperación gradual, de manera que en septiembre-octubre de 1995 se vuelven a obtener valores similares a los de noviembre de 1994 (**Fig. 2.4**).

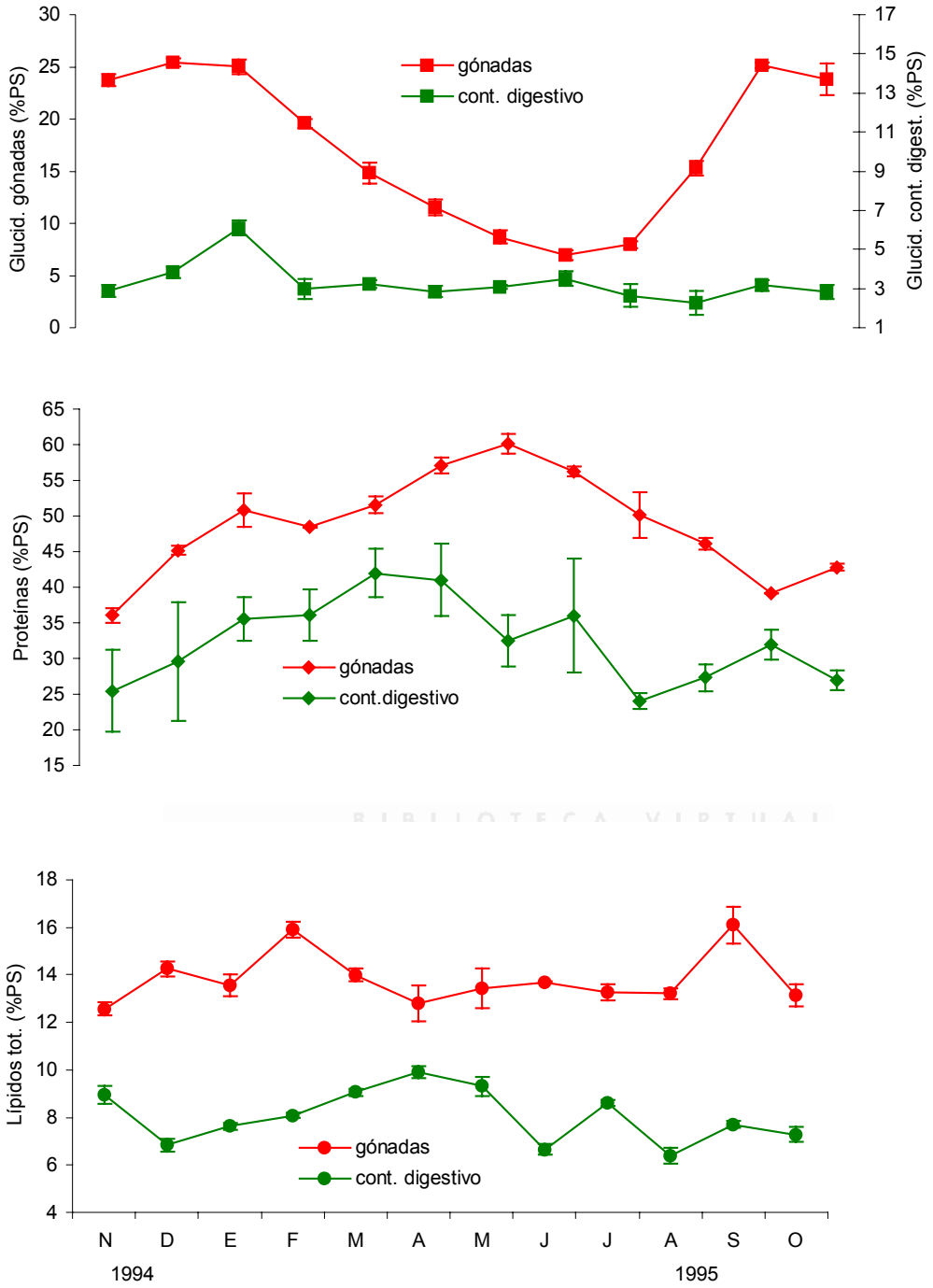


Fig. 2.4. Variación estacional del contenido en **glúcidos**, **proteínas** y **lípidos totales**, expresado como porcentaje en peso seco (%PS), en las **gónadas** y el **contenido digestivo** de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 3 determinaciones.

La cantidad de **glúcidos en el contenido digestivo** es menor que en las gónadas de *P. lividus* (**Tabla 2.3**). Presenta un valor máximo de un 6,09% en enero de 1995, que coincide con el pico más alto en los glúcidos de las gónadas. No se observa ninguna variación significativa para dichos glúcidos presentes en el digestivo en el resto del año, de manera que los niveles medidos entre febrero y octubre de 1995 rondan el 3% (ANOVA de una vía, $p<0,05$) (**Fig. 2.4**). La

relación entre los valores máximos y mínimos es de 2,7 comparado con el 3,6 obtenido para las gónadas de dicho animal.

2.3.3.2 Contenido en proteínas

El contenido de **proteínas totales** (%P) **en las gónadas** se muestra en la **Tabla 2.3**. Se observa un aumento significativo (67%) desde noviembre de 1994 hasta mayo de 1995, seguido por un acusado descenso del 35% entre mayo y septiembre de 1995 (ANOVA de una vía, $p<0,05$) (**Fig. 2.4**).

Como en el caso del glucógeno, los niveles de **proteínas** encontrados **en el contenido digestivo** de *P. lividus* son inferiores a los medidos para las gónadas de dicho animal, estando el valor máximo en un 42,00% en el contenido digestivo frente a un 60,10% en las gónadas y siendo los valores mínimos en las gónadas también superiores (36,05% frente a 24,07%) (**Tabla 2.3**). Sin embargo, la relación entre los niveles máximo y mínimo es muy similar en ambos tejidos (1,6 y 1,7 para el contenido digestivo y para las gónadas, respectivamente). Se observa un aumento continuo en los niveles de proteína del contenido digestivo de *P. lividus* desde noviembre de 1994 a marzo-abril de 1995, seguido de un descenso discontinuo, sólo interrumpido por ligeros aumentos en junio (11%) y en septiembre de 1995 (17%), para alcanzar en octubre de 1995 valores similares a los de noviembre de 1994 (ANOVA de una vía, $p<0,05$) (**Fig. 2.4**).

2.3.3.3 Contenido en lípidos totales

La variación en los niveles de lípidos totales a lo largo del período de estudio es menos evidente que en las proteínas y glúcidos.

El contenido en **lípidos totales** (%L) **en las gónadas** aumenta un 27% desde unos niveles bajos en noviembre de 1994 (12,56%) hasta un valor máximo en febrero de 1995 (15,92%) (**Fig. 2.4**), cayendo de nuevo a valores bajos en marzo de 1995. Estos niveles se mantienen bajos durante los seis meses hasta septiembre de 1995, momento en el que se aprecia un aumento del 22%, siendo los niveles de lípidos totales medidos en este mes y en febrero de 1995 del mismo orden (16,10% y 15,92%, respectivamente) (ANOVA de una vía, $p<0,05$) (**Tabla**

2.3). Este valor máximo se observa únicamente durante este mes, ya que en octubre de 1995 los niveles descienden de nuevo hasta valores menores.

El contenido en **lípidos totales** es menor **en el contenido digestivo** que en las gónadas, tal y como se observa en el resto de los componentes bioquímicos (**Tabla 2.3**). Los niveles de lípidos totales aumentan continuamente desde diciembre de 1994 hasta abril de 1995 (de 6,83% a 9,92%), iniciándose a partir de junio un descenso que continúa hasta agosto de 1995 (ANOVA de una vía, $p<0,05$). A partir de agosto comienza una recuperación del 20% de los niveles lipídicos, obteniéndose valores en octubre de 1995 similares a los medidos en diciembre del año anterior (7,29% y 6,83%, respectivamente) (**Fig. 2.4**).

2.3.4 Contenido en triglicéridos y colesterol

Los contenidos de componentes lipídicos que se analizan en este apartado se expresan como porcentaje en peso seco (mg/100 mg peso seco, %PS) y como porcentaje en lípidos totales (mg/100 mg lípidos totales, %LTs).

2.3.4.1 Contenido en triglicéridos

Los **triglicéridos** (%TG) son el principal componente lipídico determinado **en las gónadas** del erizo de mar, *P. lividus,* representando entre un 58,86% y un 77,96% del total de lípidos medidos. Los valores máximos de TG expresados como porcentaje en PS, se miden en diciembre de 1994 (11,11%), siendo estos niveles un 41% superiores al mínimo obtenido en abril de 1995 (7,86%) (ANOVA de una vía, $p<0,05$) (**Tabla 2.4**). Sin embargo, cuando se calculan los niveles de TG en función del %LTs, los valores máximos obtenidos en diciembre de 1994 (77,96%) son un 32% superiores al mínimo correspondiente al mes de mayo de 1995 (58,86%).

Se observó una relación inversa entre los niveles máximos y mínimos en %PS de **triglicéridos en las gónadas** y **en el contenido digestivo** de *P. lividus*, ya que en diciembre de 1994 se miden los valores más altos en gónadas (11,11%) y los más bajos en digestivo (1,98%), mientras que en mayo de 1995 se observan los niveles menores de TG en gónadas (7,92%) y los mayores en digestivo (3,55%) (ANOVA de una vía, $p<0,05$) (**Fig. 2.5**).

	% Triglicéridos (% TG)			
	Gónadas		Contenido digestivo	
Fecha	% PS	% LTs	% PS	% LTs
22-11-94	8,93 ± 0,22	71,10 ± 1,76	3,33 ± 0,19	37,30 ± 2,17
26-12-94	11,11 ± 0,50	77,96 ± 4,06	1,98 ± 0,04	28,94 ± 0,57
27-01-95	8,31 ± 0,86	61,23 ± 8,20	2,60 ± 0,22	34,06 ± 2,91
28-02-95	9,82 ± 0,27	61,67 ± 1,68	2,21 ± 0,21	27,38 ± 2,56
30-03-95	10,09 ± 0,20	72,12 ± 1,42	2,48 ± 0,06	27,39 ± 0,66
28-04-95	7,86 ± 0,62	61,41 ± 4,86	3,03 ± 0,15	30,54 ± 1,56
26-05-95	7,92 ± 0,15	58,86 ± 1,10	3,55 ± 0,07	38,06 ± 0,94
28-06-95	9,34 ± 0,07	68,30 ± 0,53	2,34 ± 0,01	30,54 ± 1,56
21-07-95	8,66 ± 0,68	65,31 ± 5,12	2,48 ± 0,34	28,73 ± 3,96
28-08-95	10,27 ± 0,45	77,72 ± 3,41	2,73 ± 0,25	42,68 ± 3,86
26-09-95	10,47 ± 1,88	74,68 ± 5,65	3,15 ± 0,10	40,91 ± 1,34
30-10-95	8,54 ± 0,12	64,97 ± 0,88	2,27 ± 0,13	31,14 ± 1,74

Tabla 2.4. Variación estacional del contenido en **triglicéridos** (%TG), expresado como porcentaje en peso seco (%PS) y como porcentaje en lípidos totales (%LTs), en las **gónadas** y en el **contenido digestivo** de *P. Iividus*. Los resultados se expresan como la media ± e.s. para 3 determinaciones.

Por otro lado, al expresar los valores de TG del contenido digestivo en %LTs, tanto el pico mínimo (27,38%) como el máximo (42,68%) aparecen en meses posteriores a los observados al analizar la variación de TG en %PS (en febrero y agosto de 1995 para el %LTs y en diciembre de 1994 y mayo de 1995 para el %PS) (**Tabla 2.4**). Por último, cabe destacar que el valor máximo de TG (%PS) en las gónadas es tres veces mayor que en el contenido digestivo de dicho animal (11,11% frente a 3,55%), mientras que cuando se expresan los TG en %LTs esta relación es de dos (77,96% frente a 42,68%).

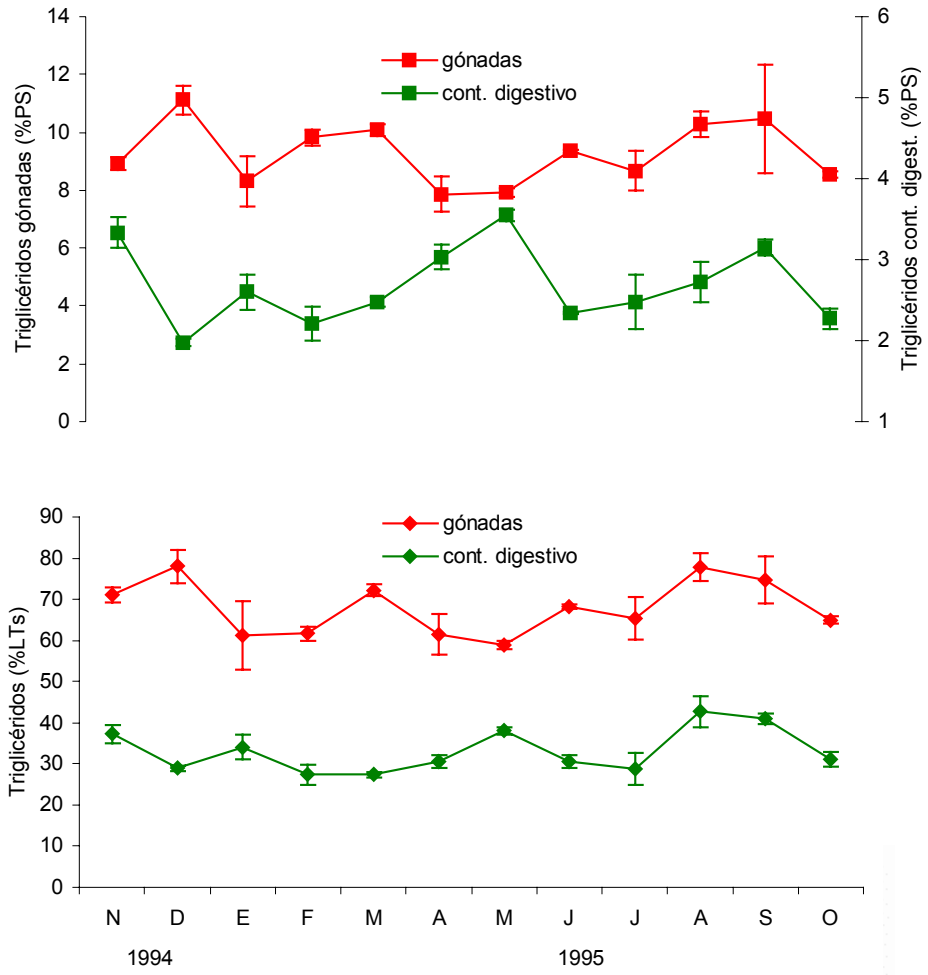


Fig. 2.5. Variación estacional del contenido en **triglicéridos**, expresado como porcentaje en peso seco (%PS) y en lípidos totales (%LTs), en las **gónadas** y en el **contenido digestivo** de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 3 determinaciones.

2.3.4.2 Contenido en colesterol total

No fue posible medir el colesterol libre ni en las gónadas ni en el contenido digestivo de *P. lividus*. Los niveles de **colesterol total** (%COL) **en las gónadas** son unas 10 veces menores que los de triglicéridos medidos en este tejido (**Tablas 2.4** y **2.5**).

El contenido en colesterol total, como porcentaje en PS, aumenta más o menos regularmente desde noviembre de 1994 (0,77%) hasta julio-agosto de 1995 (1,19%), cuando se alcanza el valor máximo, seguido por un descenso hasta el nivel mínimo (0,61%) en octubre de 1995 (ANOVA de una vía, $p<0,05$) (**Fig. 2.6**).

Se observa un perfil similar al analizar la variación estacional del colesterol total expresado como porcentaje en lípidos totales. La relación entre los valores máximo y mínimo de colesterol total, tanto expresado como %PS como determinado como %LTs, es alrededor de 2.

	% Colesterol total (% COL)			
	Gónadas		Contenido digestivo	
Fecha	% PS	% LTs	% PS	% LTs
22-11-94	0,77 ± 0,01	6,13 ± 0,05	1,32 ± 0,01	14,73 ± 0,10
26-12-94	0,87 ± 0,08	6,10 ± 0,54	1,19 ± 0,08	17,37 ± 1,23
27-01-95	0,78 ± 0,07	5,75 ± 0,48	1,12 ± 0,08	14,62 ± 1,03
28-02-95	1,03 ± 0,06	6,49 ± 0,36	1,49 ± 0,05	18,44 ± 0,57
30-03-95	0,89 ± 0,04	6,36 ± 0,29	1,39 ± 0,13	15,37 ± 1,42
28-04-95	1,13 ± 0,06	8,83 ± 0,43	1,62 ± 0,13	16,38 ± 1,36
26-05-95	1,04 ± 0,04	7,71 ± 0,27	1,21 ± 0,01	12,96 ± 0,13
28-06-95	1,06 ± 0,06	7,75 ± 0,42	1,19 ± 0,01	17,82 ± 0,18
21-07-95	1,19 ± 0,17	8,97 ± 1,30	1,43 ± 0,12	16,62 ± 1,39
28-08-95	1,16 ± 0,10	8,78 ± 0,76	1,21 ± 0,01	18,96 ± 0,14
26-09-95	0,77 ± 0,06	4,78 ± 0,38	1,25 ± 0,07	16,28 ± 0,94
30-10-95	0,61 ± 0,02	4,66 ± 0,15	1,12 ± 0,02	15,41 ± 0,30

Tabla 2.5. Variaciones estacionales del contenido en **colesterol total** (%COL), expresado como porcentaje en peso seco (%PS) y en lípidos totales (%LTs), en las **gónadas** y en el **contenido digestivo** de *P. Iividus*. Los resultados se expresan como la media ± e.s. para 3 determinaciones.

En relación con los niveles de **colesterol total**, tanto en %PS como en %LTs, **en el contenido digestivo**, se observa el hecho sorprendente de que el contenido de COL en este tejido es siempre mayor que en las gónadas (**Tabla 2.5**), mostrando un comportamiento opuesto al determinado para el resto de los componentes bioquímicos. El nivel máximo de colesterol total en el contenido digestivo (%PS) se mide en abril de 1995 (ANOVA de una vía, $p<0,05$), que coincide con el valor máximo para los lípidos totales. También se obtienen valores altos de COL en julio de 1995, como excepción a los niveles bajos observados entre mayo y octubre de 1995 (**Fig. 2.6**).

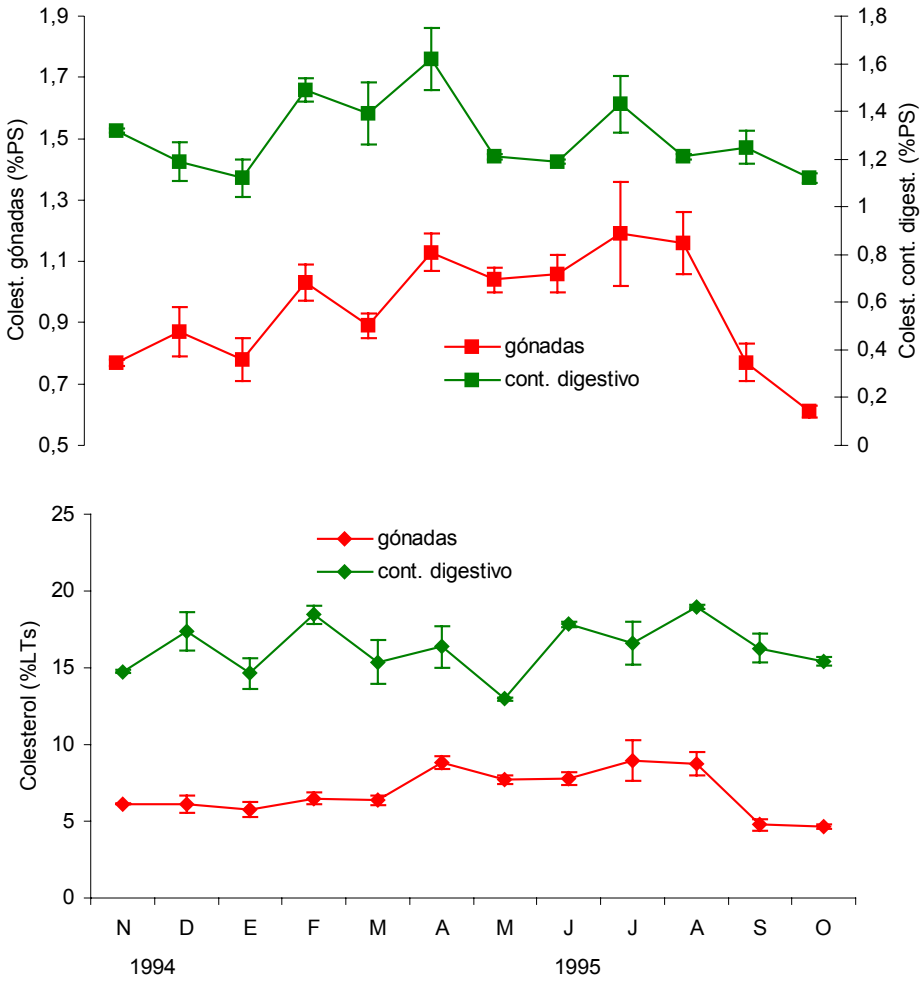


Fig. 2.6. Variación estacional del contenido en **colesterol total**, expresado como %PS y como %LTs, en las **gónadas** y el **contenido digestivo** de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 3 determinaciones.

Las variaciones de los niveles de COL en el contenido digestivo, expresado como %LTs, son, al igual que se observa en el caso de los TG en este mismo tejido, algo distintas a las de los niveles de COL en %PS, presentando el COL expresado en %LTs un valor mínimo de 12,96% en mayo de 1995 y uno máximo de 18,96% en agosto de este mismo año. En cambio, si se expresa como %PS, aparece el mínimo de 1,12% en enero de 1995 y el máximo de 1,62% en abril de este mismo año.

2.3.5 Relación entre los componentes bioquímicos entre sí y con el índice gonadal

En la **Tabla 2.6** se muestran los coeficientes de correlación de Spearman entre **el índice gonadal** y **los componentes bioquímicos** en cada tejido.

	GA	GC	GG	GP	GL	GTG	GCOL	GTG*	GCOL*	DA	DC	DG	DP	DL	DTG	DCOL	DTG*	DCOL*
IG	-0,147	-0,364	0,042	0,454	0,098	-0,357	-0,151	-0,468	-0,112	-0,126	-0,461	0,308	0,657*	0,706**	0,031	0,302	-0,410	-0,482
GA		0,916***	-0,881***	0,734**	-0,035	-0,280	0,872***	-0,287	0,818***	0,224	-0,091	-0,245	0,189	0,098	0,102	0,253	-0,116	0,259
GC			-0,790**	0,552	-0,035	-0,126	0,781**	-0,098	0,734**	0,350	0,126	-0,301	0,134	-0,049	0,259	0,204	0,168	0,343
GG				-0,706**	0,280	0,420	-0,760**	0,343	-0,825***	-0,042	0,168	0,308	-0,196	-0,301	-0,165	-0,369	0,207	-0,126
GP					-0,007	-0,531	0,606*	-0,580*	0,573	0,014	-0,392	0,189	0,629*	0,385	0,112	0,162	-0,242	-0,126
GL						0,615*	-0,130	0,259	-0,287	-0,245	-0,482	0,615*	0,399	-0,224	-0,385	-0,042	-0,294	0,224
GTG							-0,137	0,895***	-0,238	-0,266	-0,210	0,196	-0,084	-0,531	-0,364	-0,056	-0,049	0,517
GCOL								-0,091	0,963***	0,042	-0,133	-0,361	0,126	0,081	0,032	0,440	-0,186	0,494
GTG*									-0,140	-0,203	0,014	0,007	-0,273	-0,496	-0,228	-0,063	0,077	0,461
GCOL*										-0,028	-0,119	-0,441	0,098	0,238	0,140	0,566	-0,196	0,413
DA											0,755**	-0,552	-0,175	-0,014	0,336	-0,105	0,522	-0,091
DC												-0,594*	-0,545	-0,154	0,361	-0,148	0,634*	-0,021
DG													0,475	-0,105	-0,193	-0,394	-0,168	-0,287
DP														0,301	-0,088	0,260	-0,371	-0,007
DL															0,497	0,668*	-0,210	-0,552
DTG																0,197	0,702*	-0,539
DCOL																	-0,396	0,200
DTG*																		-0,256

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

* 0,01<p<0,05, ** 0,001<p<0,01, *** p<0,001

Tabla 2.6. Matriz de los coeficientes de correlación de Spearman entre el **índice gonadal** (IG) y la **composición bioquímica** (A=agua en %PF, C=cenizas en %PS, G=glúcidos en %PS, P=proteínas en %PS, L=lípidos totales en %PS, TG=triglicéridos en %PS, COL=colesterol total en %PS, TG*=triglicéridos en %LTs y COL*= colesterol total en %LTs) en las **gónadas** (G) y el **contenido digestivo** (D) de *P. lividus*.

En el caso del contenido en cenizas, aparece una correlación positiva con el porcentaje de agua (r_s=0,916, p<0,001) y el de colesterol total, tanto expresado como %PS como %LTs (r_s=0,781, 0,001<p<0,01 y r_s=0,734, 0,001<p<0,01, respectivamente) y una negativa con el nivel de glúcidos (r_s=-0,790, 0,001<p<0,01).

El valor mínimo de los niveles de glúcidos en las gónadas entre mayo y junio de 1995 muestra una correlación negativa con los valores máximos obtenidos para las proteínas gonadales en dicho período (r_s=-0,706, 0,001<p<0,01). La relación entre el contenido en glúcidos y el índice gonadal es menos evidente, pero se puede observar que el principio del descenso en los niveles de glúcidos en febrero de 1995 corresponde aproximadamente con los valores más altos obtenidos para IG entre marzo y mayo de ese mismo año (justo antes de los períodos de reproducción y desove entre mayo y junio de 1995).

No se encuentra una correlación significativa entre el contenido proteico en las gónadas y el índice gonadal, aunque los datos obtenidos revelan que el nivel máximo de las proteínas tiene lugar en mayo de 1995, justo cuando las gónadas presentan uno de sus mayores IG y que el descenso en los valores del contenido proteico aparece durante el período de desove, aumentando posteriormente a valores más altos entre septiembre y mayo de 1995.

Se observa una clara correlación entre los niveles de lípidos totales y de triglicéridos, expresados como porcentaje en PS, en las gónadas (r_s=0,615, 0,01<p<0,05). Por otro lado, los niveles de colesterol total, expresados como porcentaje en PS, en las gónadas muestran una correlación positiva con los niveles de proteínas (r_s=0,606, 0,01<p<0,05) y una negativa con los de glúcidos (r_s=-0,760, 0,001<p<0,01). Sin embargo, cuando se expresan dichos valores de colesterol total como porcentaje en LTs muestran únicamente una buena correlación con los glúcidos gonadales (r_s=-0,825, p<0,001).

Como en el caso de las gónadas, se encuentra una buena correlación entre los niveles de agua y cenizas del contenido digestivo (r_s=0,755, 0,001<p<0,01). También se observa una relación negativa entre este último parámetro y los

valores de glúcidos en el digestivo (r_s=-0,594, 0,01<p<0,05). Respecto al nivel de proteínas en el contenido digestivo, se encuentra una correlación con el nivel de dicho componente en las gónadas (r_s=0,629, 0,01<p<0,05) y, asimismo, con los valores del índice gonadal (r_s=0,657, 0,01<p<0,05).

Por otro lado, en el contenido digestivo existe una correlación clara entre los contenidos de lípidos totales y los del colesterol total, expresados como porcentaje en PS (r_s=0,668, 0,01<p<0,05). Además, también se encuentra una correlación positiva entre los lípidos totales en el digestivo y el índice gonadal (r_s=0,706, 0,001<p<0,01).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 Ciclo gonadal

En el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, se han realizado numerosos estudios sobre **su ciclo gonadal,** que varía según la zona de estudio, tal y como se muestra en la **Tabla 2.I**. Así, por ejemplo, se han observado dos períodos de desove anuales en poblaciones de la zona mediterránea (Fernandez, 1998), al igual que en una población irlandesa (Crapp y Willis, 1975); mientras que sólo se ha indicado un desove en la Bretaña francesa (Spirlet *et al*., 1998), en Irlanda (Byrne, 1990) y en el Mediterráneo Noroccidental (Lozano *et al.*, 1995). En Galicia, en estudios preliminares se apunta la existencia de un ciclo gonadal anual con un solo desove para *P. lividus* (Catoira, 1995).

Localización	IG	Nº desoves anuales	Cita
Laguna de Urbino-Córcega (Francia)	5-12 (PS/V)	Dos	Fernandez (1998)
Bretaña (Francia)	1,91-8,83 (PS)	Uno	Spirlet *et al.* (1998)
Irlanda	4,4-11,0 (PS)	Uno	Byrne (1990)
Cataluña (España)	1-4,5 (PS)	Uno	Lozano *et al*. (1995)
Marsella (Francia)	1,86-8,44 (PF)	Uno	Guettaf y San Martin (1995)
Galicia (España)	6,3-10,3 (PF)	Uno	Catoira (1995)
Galicia (España)	2,31-12,16 (PF)	Uno	Presente estudio

Tabla 2.I. Tabla comparativa del **índice gonadal** (IG), con referencia a su modo de cálculo (PS=peso seco, V=volumen y PF=peso fresco), y del **ciclo reproductivo** de ***Paracentrotus lividus*** en distintas localizaciones.

En el presente trabajo, los resultados indican la presencia de un único desove anual en la población de *P. lividus* analizada. Spirlet *et al.* (1998) ya apuntaban la coincidencia en el patrón reproductivo de la mayoría de los equinoideos de las zonas templadas, con un período de acumulación de reservas en otoño e invierno y un largo período de desove durante el verano, presentando unas diferencias más acusadas entre el IG mínimo y máximo aquellas poblaciones situadas más al Norte, probablemente debido a la mayor **diferencia de temperatura** entre el período invernal y el estival, que provocaría una mayor acumulación de reservas nutritivas durante el invierno. Esas diferencias más marcadas en las poblaciones más septentrionales también se observaron en Galicia

en el trabajo realizado por Catoira (1995), en donde la relación entre los valores máximo y mínimo de IG fue de 1,9 en la zona Norte y de 1,4 en la zona Sur. En la zona aquí estudiada, que pertenece al área norte de Galicia, la relación encontrada es también muy alta, situándose en un valor de 5,3.

Asimismo, la **disminución de la temperatura** durante el otoño se ha demostrado que actúa sobre algunos erizos de mar como un factor determinante para el inicio del crecimiento gonadal, del cual son responsables los fagocitos nutritivos, tanto en poblaciones de *P. lividus* situadas en la zona mediterránea como en la irlandesa (Régis, 1979; Byrne, 1990); mientras que el **aumento de la temperatura** que se inicia en la primavera actuaría como catalizador del inicio del proceso gametogénico en oocitos y espermatocitos, produciéndose el desove justo antes de que la temperatura alcance sus valores más elevados (entre 13ºC y 16ºC) (Spirlet *et al*., 1998). Sin embargo, se ha visto que temperaturas demasiado bajas (8ºC) o demasiado altas (24ºC) inhibían el desove en poblaciones mediterráneas de *P. lividus* (Fenaux, 1968). Existen evidencias de la influencia de la temperatura en el ciclo reproductor de este equinodermo, habiéndose observado una inducción del desove con aumentos de temperatura del agua de tan sólo 5ºC (observación personal).

Además de la temperatura, también se han realizado estudios sobre el posible papel del **fotoperíodo**, es decir, del número de horas de luz al día, en el ciclo biológico de numerosos equinoideos. Así, se ha observado una relación directa entre desove y pico máximo de duración del día (unas 15 horas) en una población de *P. lividus* en la Bretaña Francesa (Spirlet *et al*., 1998).

Otro factor que se ha demostrado que tiene gran importancia en el desarrollo gonadal es **la disponibilidad de alimento**, de forma que aquellos erizos situados en zonas intermareales, con mayor escasez de comida, presentaban un menor tamaño de gónada que los localizados en la zona submareal, que tenían más acceso al alimento (Byrne, 1990). Respecto a la población aquí observada, está situada en un área permanentemente cubierta por el agua, por lo que la disponibilidad de alimento es alta, lo que apoyaría su alto índice gonadal respecto a otros estudios realizados. Sin embargo, la cantidad y calidad de la comida no

parece tener ninguna influencia sobre el inicio de la gametogénesis, tal y como se ha comprobado en diversos trabajos (Eckelbarger y Watling, 1995).

Por último, también se han descrito **otras variables** que pueden ejercer un control sobre el ciclo reproductivo en el erizo de mar, tanto de naturaleza exógena (intensidad de la iluminación, aumento de los niveles de fitoplancton) (Pearse *et al*., 1988; Himmelman, 1975), como de naturaleza endógena (hormonas).

La mayoría de los trabajos combinan el estudio de la variación del índice gonadal con el análisis histológico de las gónadas, que da una idea más aproximada sobre el ciclo reproductivo. Es de destacar también que **el cálculo del IG** (índice gonadal) se realiza en la mayoría de los casos a partir del porcentaje en PS (peso seco), aunque en este caso el cálculo del IG se expresa como porcentaje en PF (peso fresco), presentando unos valores más altos para el máximo y el mínimo que para la población estudiada en Marsella (Francia) por Guetaff y San Martin (1995) (2,31 y 12,16 frente a 1,86 y 8,44).

2.4.2 Niveles de los componentes bioquímicos

Existen numerosos estudios sobre la composición bioquímica en distintos órganos de diversas especies de equinoideos, tal y como se muestra en la **Tabla 2.II**.

La distribución de los componentes bioquímicos encontrada en el erizo de mar, *P. lividus*, es bastante similar a la de otras especies de la clase Equinoidea, tal y como habían apuntado Mc Clintock y Pearse (1987), que observaron esta similitud en el patrón de la composición bioquímica independientemente de la especie y de la localización geográfica. En todos los animales de esta clase, las proteínas son el principal componente, apareciendo siempre los lípidos y los glúcidos en porcentajes inferiores.

El contenido de **agua en las gónadas** de *P. lividus* es similar al obtenido para *Strongylocentrotus purpuratus* (en torno a un 75% en peso fresco) (Giese, 1966), mientras que **en el contenido digestivo** es algo superior al obtenido también por Giese (1966) para esta misma especie.

Especie	Tejido	Localizac.	%A	%C	%G	%P	%L	Cita
	gónadas		65,8-77,7	---	2,0-7,3	24,0-36,9	14,2-27,9	
Strongylo-	c. digest.	Estados	75,3	---	3,10	28,3-41,7	20,3-30,0	Giese
centrotus	epitelio	Unidos	37,8	---	0,09	2,3-6,2	1,8	(1966)
purpuratus	linterna		35,4	---	0,22	3,0-9,3	1,3	
	gónadas	McMurdo	---	12,3	4,6	56,2	27,0	Mc
Abatus	c. digest.	Sound-	---	60,3	1,6	34,5	3,7	Clintock y
shackeletoni	epitelio	Antártida	---	80,1	0,8	17,4	1,8	Pearse (1987)
	gónadas	Villefran-	---	19,2	5,2	38,1	15,7	
Arbacia	*tubo* digest.	che-sur-	---	13,3	5,8	48,2	18,8	Fenaux *et*
lixula	testa	Mer	---	88,0	1,2	2,5	1,3	*al*. (1975)
		(Francia)						
	gónadas	Laguna	---	5-10	5-15	30-45	12-18	
Paracentro-	c. digest.	Urbino-	---	3-13	3,4-12,6	33-45	10,6-27,2	Fernandez
tus lividus	testa	Córcega	---	80	0,2-0,3	2,2-3,4	0,2-0,5	(1998)
		(Francia)						
Paracentro-	gónadas	Galicia	70,3-80,5	7,0-14,0	7,0-25,4	36,0-60,1	12,8-16,1	Presente
tus lividus	c. digest.	(España)	83,1-88,4	28,6-38,1	2,3-6,1	24,1-42,0	6,4-9,9	estudio

Tabla 2.II. Tabla comparativa de la **composición bioquímica**, expresada como porcentaje en peso fresco de agua (%A) y como porcentajes en peso seco de cenizas (%C), glúcidos (%G), proteínas (%P) y lípidos (%L) en distintas especies de **equinodermos**.

El porcentaje de **cenizas del tejido gonadal** de *P. lividus* es del mismo orden que el determinado por Fernandez (1998) para dicha especie (entre 7,0% y 14,0% frente a entre 5% y 10%) y algo inferior al medido en *Arbacia lixula* por Fenaux *et al.* (1975) (19,2%). Respecto a las **cenizas presentes en el contenido digestivo** del erizo de mar objeto del presente estudio, cabe destacar su alto contenido (entre 28,6% y 38,1%), unas 4 veces superior al medido en las gónadas de dicho animal y también el cuádruple de los valores medidos para dicho parámetro en un tejido similar de otros equinodermos.

Los depósitos de **glucógeno** en equinodermos están localizados principalmente en las gónadas de erizos y estrellas de mar y en los ciegos pilóricos de las estrellas y se cree que son utilizados como primera fuente de energía durante la ovogénesis (Khotimchenko *et al*., 1988). Los niveles de este compuesto se relacionan con el grado de madurez de las gónadas de manera que, durante el período de desove, desciende el contenido en glucógeno en dichos órganos. Los niveles mínimos de **glúcidos presentes en las gónadas** de *P. lividus* son similares a los encontrados en otras especies (en torno a un 5%), mientras que los máximos son un 60% superiores a los mayores medidos en el mismo tejido de la misma especie en un ambiente lagunal (Fernandez, 1998) y hasta 5 veces más altos a los determinados en el mismo órgano de la especie *Arbacia lixula* (Fenaux

et al., 1975). Respecto a los niveles de **glúcidos en el contenido digestivo**, son entre 3 y 4 veces menores que los del tejido gonadal, hecho que ya ha sido comprobado en otras especies de equinoideos. Sin embargo, en otro estudio realizado en *P. lividus* por Fernandez (1998) se midieron valores de glúcidos en el digestivo similares a los del tejido gonadal, que se justificaban por el papel del digestivo como órgano de reserva en condiciones limitantes de la cantidad de comida disponible. En el presente caso, en el que el hábitat de *P. lividus* no está limitado por la escasez de alimento, puesto que está en mar abierto, el digestivo ya no desempeña el papel de almacén de nutrientes y los niveles de glucógeno son, por tanto, menores. En cambio, en las gónadas, donde el glucógeno se requiere como primera fuente de energía durante la ovogénesis, presenta unos niveles más elevados.

Las **proteínas**, por el contrario, se cree que desempeñan un papel netamente estructural. Así, por ejemplo, Jangoux y van Impe (1977) observaron que existía un descenso en la cantidad de proteína de los ciegos pilóricos de *Asterias rubens* cuando la demanda gonadal de material estructural, en forma de aminoácidos, era alta. **El contenido proteico en el tejido gonadal** de *P. lividus* es similar al de otros equinoideos, oscilando entre un 36,0% y un 60,1%, al igual que el medido **en el contenido digestivo** (24,1%-42,0%). En cualquier caso, las proteínas son el componente bioquímico que se encuentra en mayor proporción, lo que avalaría su papel estructural dentro del erizo de mar.

Respecto a los estudios relativos a los diferentes tipos de **lípidos** presentes en equinodermos, algunos de ellos se han realizado en los lípidos contenidos en los espermatozoides, con el fin de establecer relaciones filogenéticas (Mita *et al*., 1994). **Los lípidos totales** en *P. lividus* son los que presentan una menor variabilidad a lo largo del año (entre un 12,8% y un 16,1% para las gónadas y entre un 6,4% y un 9,9% para el digestivo). Los valores **en las gónadas** vuelven a ser del mismo orden que en otros equinoideos (Fenaux *et al*., 1975; Serrazanetti *et al.*, 1995), mientras que los del **contenido digestivo** parecen ser 2 y 3 veces menores.

Oudejans y van der Sluis (1979) establecieron el papel de los **triglicéridos** en el equinodermo *Asterias rubens* como principal lípido de reserva, que sería luego utilizado por el individuo para la gametogénesis y el crecimiento gonadal. La importancia de **los triglicéridos en las gónadas** de *P. lividus* (entre un 7,9 %PS y un 11,1 %PS) parece ser bastante mayor que **en el digestivo** (entre un 2,2 %PS y un 3,5 %PS), lo que confirmaría el mayor peso de las gónadas como órgano de reserva de nutrientes, puesto que los triglicéridos son los principales lípidos con dicha función en equinodermos.

En relación a los **esteroles**, Oudejans y van der Sluis (1979) enunciaron que sus principales funciones serían la estabilización de las cadenas acilo de los fosfolípidos de membrana, así como la de ser precursores de la síntesis de esteroides. Es de destacar que en los equinoideos, tales como el erizo de mar, *P. lividus*, estos esteroles serían mayoritariamente esteroles Δ^5 (es decir, con una insaturación en el carbono 5), tales como el **colesterol**, que provendrían de la dieta, frente a los holoturioideos y los asteroideos, donde serían más frecuentes los esteroles Δ^7 y $\Delta^{5,7}$, lo que confirmaría la escasa capacidad de los equinoideos para sintetizar compuestos de naturaleza esteroídica (Serrazanetti *et al*., 1995). **Los niveles de colesterol total** medidos en *P. lividus* en este estudio son superiores a los observados por Serrazanetti *et al*. (1995) en erizos de la costa adriática, que rondaban el 0,5% del peso seco del individuo, y del mismo orden a los medidos por López-Hernández *et al.* (1999) en *P. lividus* procedentes de Galicia (0,8 %PS). Además, dichos valores son mayores **en el contenido digestivo** que **en las gónadas**, lo que podría ser indicativo de la existencia de un gran número de esteroles procedentes de la dieta, que estarían presentes en digestivo, frente a la ausencia de compuestos esteroideos sintetizados por el propio animal, que serían los que predominarían en las gónadas de *P. lividus*. Esta hipótesis se vería reforzada por el estudio realizado por López-Hernández *et al.* (1999), donde se demostró la presencia en las gónadas de *P. lividus* de pequeñas cantidades de fucosterol (esterol vegetal presente en las algas marrones) y de desmosterol (intermediario metabólico del proceso de transformación de los esteroles vegetales en colesterol), estando ambos presentes en dicho tejido en un porcentaje inferior al 1% en peso seco. Por todo ello, cabe suponer que los niveles de estos dos esteroles en el contenido digestivo del erizo de mar serán mucho mayores, por

estar relacionados directamente con la dieta, lo que explicaría los altos valores de esteroles totales encontrados, ya que el método empleado no mide sólo el colesterol, sino también otros esteroles con grupo -OH en posición 3β.

2.4.3 Variación estacional en la composición bioquímica y posible relación de los componentes bioquímicos entre sí y con el ciclo reproductor

El erizo de mar, *P. lividus*, objeto del presente estudio, presenta una clara **variación estacional en sus componentes bioquímicos**, tanto en las gónadas como en el contenido digestivo. En la mayoría de los estudios realizados en equinoideos se ha observado dicha variación estacional, como es el caso de *Arbacia lixula* (Fenaux *et al.*, 1977) y de *Paracentrotus lividus* en un ambiente lagunal (Fernandez, 1998); mientras que en otras especies de erizos de mar se comprobaron sólo variaciones mínimas en los niveles de glúcidos, lípidos y proteínas (Magniez, 1983). Este último autor enunció una posible relación entre una composición bioquímica constante y la ausencia de cambios bruscos en el desarrollo gametogénico de la gónada, puesto que en las gónadas del erizo *Abatus cordatus,* objeto de su estudio, existen gametos en diferentes estados de maduración a lo largo del ciclo reproductivo, mientras que en otras especies de equinoideos se producen variaciones más acusadas en el número de gametos maduros a lo largo del período reproductivo. El erizo de mar de las costas gallegas, *P. lividus*, parece estar incluido en este último grupo, ya que presenta unas fases definidas de desarrollo gametogénico que reflejarían, a su vez, variaciones en la composición bioquímica de las gónadas.

La temperatura no parece ser un factor determinante en la variación de la composición bioquímica en los erizos de mar, como ya enunciaron Lares y Mc Clintock (1991) en un estudio realizado en *Eucidaris tribuloides*, puesto que las variaciones térmicas moderadas no alteran las funciones de los componentes somáticos del cuerpo y, por tanto, no afectan a la composición bioquímica.

Los glúcidos presentan una clara variación estacional **en las gónadas** de *P. lividus*, con un valor máximo de 25,43% en diciembre de 1994 frente a uno mínimo de 6,96% en junio de 1995, mientras que en el contenido digestivo los niveles son casi constantes. En estudios previos se observó una acumulación de

glucógeno en las gónadas durante la gametogénesis en *P. lividus* (Fenaux *et al.*, 1977; Fernandez, 1998), encontrándose una relación clara entre el índice gonadal y el contenido en glucógeno en dicho tejido. En el presente caso la relación no es tan evidente, pero lo que sí se puede observar es que los niveles máximos de glucógeno gonadal entre diciembre de 1994 y enero de 1995 comienzan a descender aproximadamente cuando el índice gonadal comienza a alcanzar sus valores máximos entre marzo y mayo de 1995, lo que avalaría la teoría de que el glucógeno es la primera fuente de energía en ser utilizada durante el período de desarrollo gonadal y ovogénesis.

Por el contrario, **el glucógeno presente en el contenido digestivo** no parece tener relación con el ciclo reproductivo, probablemente debido al pequeño tamaño del sistema digestivo en comparación con las gónadas, tal y como ya apuntaron Lawrence y Lane (1982). Además, dicho glucógeno es una parte muy pequeña de la materia orgánica total presente en el digestivo (entre un 2,27% y un 6,09%), por lo que posiblemente esté formado únicamente por glúcidos que intervienen en el metabolismo intermediario o por carbohidratos con función meramente estructural (Bishop y Watts, 1992).

Los niveles de proteínas en el tejido gonadal presentan variaciones significativas a lo largo del período de estudio, oscilando entre un 36,05% en noviembre de 1994 y un 60,10% en mayo de 1995, coincidiendo el nivel máximo de proteínas gonadales con los valores más elevados del IG, lo que sería un indicio de los requerimientos proteicos de las gónadas durante la gametogénesis, como ya se ha observado anteriormente en *Arbacia lixula* (Fenaux *et al*., 1977) y en *P. lividus* (Fernandez, 1998). Es preciso destacar la existencia de una relación inversa entre el contenido en glucógeno y proteínas totales en las gónadas de *P. lividus*, lo que parece ser un claro indicio del empleo de las reservas de glúcidos para obtener la energía necesaria para la síntesis de proteínas, fundamentales en la formación de gametos (Fenaux *et al*., 1977).

El perfil de **proteínas totales en el contenido digestivo** es prácticamente el mismo que en las gónadas, con valores mínimos de 24,07% en julio de 1995 y máximos de 42,00% en marzo de 1995. A diferencia de otros trabajos, donde los

niveles de dichas proteínas se mantenían prácticamente constantes, en este caso se observan diferencias estadísticamente significativas, además de una correlación positiva con el índice gonadal. Estos hechos podrían ser explicados por la importancia de la dieta en la composición bioquímica del contenido digestivo así como por la relación inversa que se ha encontrado en *P. lividus* entre las velocidades de ingestión y de absorción del alimento: en primavera, cuando se darían las condiciones más favorables para el desarrollo algal y que coincidiría con la fase de gametogénesis, aparecerían los niveles máximos de contenido proteico en el digestivo como consecuencia de la alta ingesta de macrofitos, pero, sin embargo, dicho equinoideo no sería capaz de absorber tan alta cantidad de proteína, debido a la escasa musculatura asociada a *P. lividus*, por lo cual dicha proteína quedaría retenida en el sistema digestivo (Frantzis y Grémare, 1992).

La variación estacional de los **lípidos totales gonadales** no es tan evidente en *P. lividus*. En otras especies de equinoideos se ha observado, respecto a los niveles de lípidos totales en las gónadas, tanto variaciones estacionales en erizos de mar (Fernandez, 1998) como valores más o menos constantes a lo largo del año en el dólar de arena *Mellita quinquiesperforata* (Moss y Lawrence, 1972). La ausencia de un perfil claro en la variación estacional de los lípidos gonadales en *P. lividus* podría deberse, en primer lugar, a la no separación de machos y hembras en el presente estudio, ya que es conocida la distinta utilización que hacen de los lípidos los ovocitos (que los usan para producir materiales de reserva para los futuros óvulos) y los espermatocitos (que los emplean para producir la energía necesaria para la espermatogénesis) (Scheibling y Lawrence, 1982). Otra posible causa sería la heterogeneidad de las distintas clases de lípidos, pudiendo cada uno de ellos mostrar un comportamiento distinto a lo largo del año, por lo que el análisis de todos ellos en conjunto no daría una idea muy clara de los procesos que tienen lugar.

Los **lípidos totales en el digestivo**, a diferencia de los gonadales, presentan un perfil de variación estacional más claro, apareciendo los valores máximos en primavera, época del año donde se dan las condiciones más favorables para la producción de algas, base de la dieta de *P. lividus*. Por tanto, parece evidente la relación directa entre los lípidos totales del digestivo y la

biodisponibilidad de alimento, hecho que ya fue enunciado por Oudejans y van der Sluis (1979), que establecían como una de las principales causas de la variación de los niveles de lípidos totales en los ciegos pilóricos de la estrella de mar, *Asterias rubens*, la capacidad de dicho órgano para digerir y acumular los lípidos procedentes de la comida.

En algunos invertebrados marinos se ha demostrado el papel de los **triglicéridos gonadales** como indicadores del ciclo gametogénico, puesto que son los principales lípidos que se almacenarían en los ovocitos (Besnard, 1988). Sin embargo, en el presente estudio no se encuentra ninguna relación estadísticamente significativa entre el contenido en triglicéridos en las gónadas de *P. lividus* y el índice gonadal. En cambio, sí se observa una correlación positiva entre los niveles de triglicéridos y los de lípidos totales, constituyendo dichos compuestos entre un 58,86% y un 77,96% de los lípidos totales, puesto que los triglicéridos son el principal componente lipídico en las gónadas de *P. lividus*.

Los **triglicéridos en el contenido digestivo** de *P. lividus*, en cambio, parecen estar más relacionados con la disponibilidad de alimento, puesto que presentan un perfil de variación estacional similar al de los lípidos totales en dicho tejido, con máximos en primavera y mínimos en invierno. Es lógica esta similitud de perfiles, puesto que los triglicéridos son el componente mayoritario en los lípidos del digestivo, variando su porcentaje entre un 27,38% y un 42,68%. Por otro lado, es conocido el papel de los triglicéridos como "almacén de energía" en los órganos de invertebrados, por lo que cabe suponer que en períodos de escasez de alimento o con condiciones ambientales desfavorables (características típicas del período invernal) estas reservas energéticas serán utilizadas por los organismos vivos y, por tanto, sus niveles serán menores (Oudejans *et al*., 1979). Cabe destacar, además, el perfil inverso entre los triglicéridos de las gónadas y del digestivo de *P. lividus*, ya que cuando los primeros alcanzan su nivel mínimo, los segundos alcanzan el máximo, hecho que tiene lugar en el mes de mayo de 1995. Esto sería explicable por la distinta utilización que hacen ambos órganos de dichos compuestos: mientras que las gónadas los usan para la gametogénesis, el digestivo los emplean como almacén de energía en previsión de condiciones desfavorables.

Es además necesario señalar la coincidencia de la variación estacional del **colesterol total en las gónadas y en el contenido digestivo**, con máximos en primavera y mínimos en invierno, lo que nos indica una posible similitud en los factores que influyen en dicha variación estacional. Como ya se ha enunciado anteriormente, los esteroles presentes en los erizos de mar proceden principalmente de la dieta, siendo incapaces de sintetizar esteroles *de novo* (Serrazanetti *et al*., 1995). Parece claro entonces que las oscilaciones en los niveles de dichos compuestos a lo largo del año en ambos tejidos estarán claramente relacionadas con la biodisponibilidad de alimento en el medio marino.

Por último, y en cuanto a la existencia de **ciclos de energía** en los equinodermos, se ha demostrado claramente su presencia en los asteroideos, tales como la estrella de mar *Sclerasterias mollis*, en la cual los ciegos pilóricos actúan como reservorio de nutrientes que luego serán utilizados por las gónadas durante la fase de desarrollo y gametogénesis (Barker y Xu, 1991). Sin embargo, en los erizos de mar, sólo se ha observado la capacidad del aparato digestivo para actuar como tejido de reserva de nutrientes a corto plazo en la especie *Lytechinus variegatus*, propiedad que fue atribuída a cambios en el número y tamaño de las células digestivas que propiciarían la capacidad de captación y movilización de nutrientes (Klinger *et al*., 1988). En el animal objeto del presente estudio, *P. lividus*, no se ha podido demostrar este trasvase de energía, por lo que se deduce que las gónadas y el digestivo posiblemente sean órganos independientes en cuanto a requerimientos energéticos.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

3. ESTUDIO DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 El proceso de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un mecanismo bien conocido de daño celular en animales, siendo por ello utilizado en ocasiones como indicador del estrés oxidativo y biomarcador de contaminación ambiental (Di Giulio, 1991). Tras la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas biológicas se generan, entre otros, malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxialqueno (4-HNE), como productos finales de reacción. Gracias a su determinación se puede cuantificar la peroxidación lipídica y, por tanto, el estrés oxidativo en los organismos.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son fundamentales para la célula, ya que forman parte de los fosfolípidos, constituyentes principales de la bicapa lipídica de las membranas y son los responsables, en buena medida, de la fluidez de ésta. La función de estos lípidos localizados en las membranas biológicas es mantener la integridad de la célula (Muriel, 1997). Entre los lugares en los que se pueden encontrar los PUFA destacan la membrana plasmática, la membrana celular del retículo endoplasmático y la membrana de la mitocondria.

Los PUFA son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo y su degradación se denomina **peroxidación lipídica**. Esta peroxidación es el efecto más importante de los radicales libres sobre la célula, ya que la destrucción de los PUFA de la membrana junto con la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas y la ruptura de éstas, provoca un desmoronamiento de la estructura de membrana que conduce a una pérdida de la permeabilidad y, posteriormente, a la muerte celular (ver **Fig. 3.I**). La susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación depende, en gran medida, del grado de insaturación y de la posición de los dobles enlaces en la membrana, así como de la existencia de iones hierro (Ursini *et al*., 1991), ya que son estos los que catalizan en su mayoría las reacciones de oxidación, además de activar el oxígeno en la formación de las EROs.

El proceso de peroxidación lipídica consta de una serie **de reacciones en cadena**, que demuestran la capacidad de las EROs para producir reacciones bioquímicas dañinas para la célula (Livingstone, 1991). Son reacciones dañinas, porque provocan la formación de distintas especies afines, las cuales a su vez tienen la capacidad de degradar las membranas.

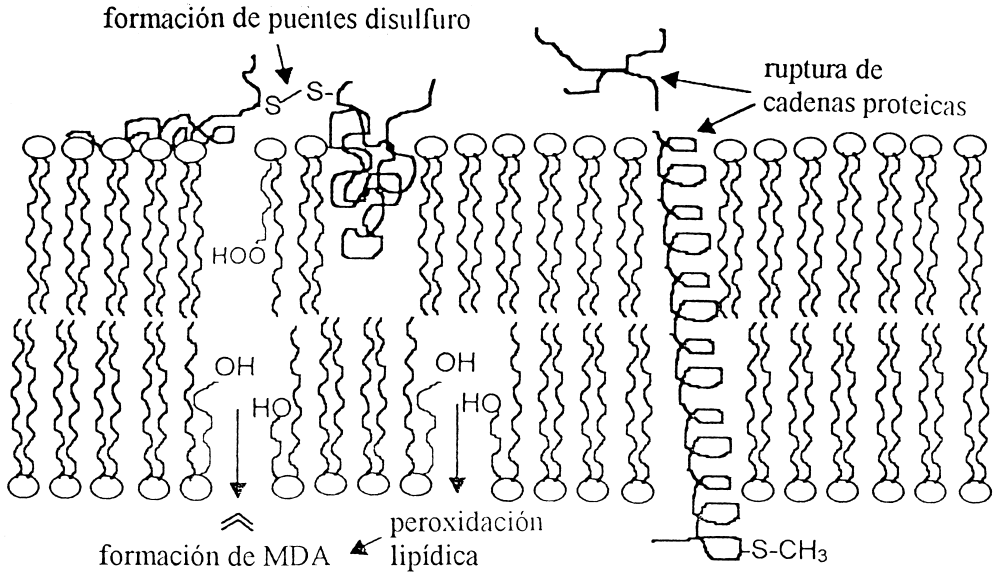


Fig. 3.I. Resultados del **daño oxidativo** provocado por las especies reactivas del oxígeno (**EROs**) sobre las **membranas** (Ogus *et al*., 1998).

La primera etapa de la peroxidación lipídica es la **iniciación**, que es favorecida por algún tipo de iniciador ($I^{\cdot}$). Este iniciador puede ser cualquier molécula con la suficiente reactividad para extraer un átomo de hidrógeno de un radical metileno ($-CH_2-$) de un PUFA, produciéndose la captación del hidrógeno por el iniciador y la formación de un radical orgánico, $R^{\cdot}$, mediante la disociación de la energía del enlace alílico en el PUFA (Minotti y Aust, 1992). Esta iniciación **(a)** se puede producir en cualquier lugar de la cadena del PUFA, aunque los carbonos con hidrógenos bis-alílicos son atacados preferentemente, ya que así se estabiliza por resonancia el radical orgánico que se forma en el carbono central (Ryan y Aust, 1992).

$$\mathbf{RH + I^{\cdot} \longrightarrow R^{\cdot} + IH} \qquad \textbf{Iniciación (a)}$$

Se han postulado distintos iniciadores de la peroxidación lipídica, siendo la teoría más extendida la que propone a las EROs como promotores de la fase de iniciación. Así destaca como iniciador, en primer lugar, el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$), que es el radical más reactivo de todos (E^{o}=1,6 V) **(b)**, siendo generado por medio de la reacción de Haber-Weiss, en la que participan el O_2^{-} y el Fe^{+3} (Minotti y Aust, 1987).

$$RH + OH^{\cdot} \rightarrow R^{\cdot} + H_2O \qquad \textbf{(b)}$$

Por el contrario, el radical superóxido (O_2^{-}) no es lo suficientemente reactivo para funcionar como un iniciador y, además, su carga le impide entrar en las membranas de naturaleza lipofílica; sin embargo, la forma protonada de este anión ($HO_2^{\cdot}$), es más reactiva **(c)** y, no sólo puede actuar como iniciador, sino que también es capaz de dañar las membranas por sí mismo, aunque esto último aún no ha sido demostrado de un modo fiable (Halliwell y Gutteridge, 1991).

$$RH + HO_2^{\cdot} \rightarrow R^{\cdot} + H_2O_2 \qquad \textbf{(c)}$$

Sin embargo, hay ciertos hechos que han cuestionado la teoría que propone al $OH^{\cdot}$ como iniciador de la peroxidación lipídica. En primer lugar, el $OH^{\cdot}$ es un agente oxidante inespecífico, que reacciona con todo tipo de biomoléculas, mientras que la peroxidación lipídica es un fenómeno de localización específica. Además, los captadores del radical hidroxilo no siempre inhiben este fenómeno peroxidativo, tal y como cabría esperar (Ryan y Aust, 1992). Estos hechos han desembocado en la aparición de otra teoría alternativa que propone al hierro como posible iniciador, el cual formaría un complejo con el oxígeno. Así, se ha postulado la existencia de especies tales como los radicales perferrilo (pero estos tienen escasa reactividad), los ferrilos, originados por la reacción de proteínas hemo con el H_2O_2 (sin embargo, la catalasa, enzima captadora de H_2O_2, no inhibe la peroxidación dependiente de hierro) o los complejos formados por Fe^{+2}-O_2-Fe^{+3} con una relación Fe^{+2}:Fe^{+3} de 1:1 (su existencia no se ha podido demostrar). Por otro lado, Aruoma *et al.* (1989) comprobaron que el Pb^{+2} y el Al^{+3} eran capaces de reemplazar al Fe^{+3} en la aceleración de la peroxidación lipídica catalizada por Fe^{+2}, lo cual indica que no es necesario un complejo de hierro para la iniciación. Respecto a la validez de ambas teorías, existen demasiadas dudas sobre cual es la verdadera, ya que las dos han sido rebatidas por distintos autores, no concluyéndose cual es el verdadero iniciador del proceso peroxidativo.

Tras esta fase de iniciación, se forma un radical lipídico $R^{\cdot}$ y comienza la **fase de propagación**. En primer lugar, el radical lipídico $R^{\cdot}$ sufre reacciones de

combinación o adición con el oxígeno, formando radicales peroxilo orgánicos ($ROO^{\cdot}$) **(d)**.

$$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot} \qquad \textbf{Adición del oxígeno (d)}$$

La importancia de estos radicales $ROO^{\cdot}$ se basa en la capacidad que tienen para captar un átomo de hidrógeno desde un enlace alílico de una molécula lipídica vecina formando hidroperóxidos (ROOH), de este modo se produce la propagación **(e)** y las reacciones encadenadas están ya en marcha.

$$ROO^{\cdot} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\cdot} \qquad \textbf{Propagación (e)}$$

A esta fase de propagación le sucede la **fase de terminación**, en la cual se produce la combinación de los productos iniciales de la peroxidación (radicales lipídicos) para dar lugar a compuestos no radicales del tipo del MDA o del 4-HNE **(f)** o a la producción de compuestos no reactivos mediante reacciones con antioxidantes tipo "scavenger", como la vitamina E **(g** y **h)**.

$$ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow ROOH + RH \quad \textbf{(f)}$$

Terminación

$$R^{\cdot} + \text{Vit. E} \longrightarrow RH + \text{Vit. E}^{\cdot} \quad \textbf{(g)}$$

$$\text{Vit. E}^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow RH + \text{Vit E} \quad \textbf{(h)}$$

3.1.2 La peroxidación lipídica como biomarcador de contaminación

La peroxidación lipídica, junto con los aductos de ADN, se usan como **biomarcadores del daño oxidativo** producido por la presencia de contaminantes y la consiguiente formación de radicales libres en los organismos acuáticos (Di Giulio, 1991).

Hay numerosos estudios que evidencian la presencia del fenómeno peroxidativo tanto en peces (Baker *et al*., 1998; Tort *et al.*, 1996) como en invertebrados acuáticos (Musgrave *et al.,* 1987; Cossu *et al*., 1997). Además, se ha comprobado que los niveles de lípidos peroxidizados pueden verse alterados

por variables como el estado del ciclo reproductivo de los individuos o la edad de estos (Viarengo *et al.,* 1991a, b).

Por otro lado, se ha demostrado la variación de dicha peroxidación lipídica en presencia de contaminantes, como es el caso de la platija *Pleuronectes platessa* expuesta a cadmio y a 3-metilcolantreno (George y Young, 1986) o del mejillón *Geukensia demissa* expuesto a paraquat (Wenning *et al*., 1988).

3.1.3 Objetivos del presente capítulo

Por todo lo anteriormente expuesto, y ante la casi total ausencia de trabajos al respecto en equinodermos, planteamos los siguientes objetivos en el presente capítulo:

- Realización de un estudio de **la distribución tisular** y de **la variación estacional de la peroxidación lipídica** en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus.*

- Evaluación de **la posible influencia *in vitro* de contaminantes** (tanto metales pesados como compuestos orgánicos) sobre dicho parámetro, con vistas a analizar su posible uso como biomarcador de contaminación.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Preparación de las muestras

Se pesan alrededor de 0,3 g de tejido congelado a -70ºC. Es importante conservar las muestras a -70ºC y no a -20ºC, ya que el MDA y el 4-HNE no son estables a esta última temperatura (Bull y Marnett, 1985; Carbonneau *et al*., 1991). Asimismo, las muestras deben protegerse de la luz, para prevenir la fotooxidación.

El tejido se homogeneiza en una proporción 1:10 (P/V) en una disolución tampón de Tris-ClH 20 mM, pH 7,4. El tampón de homogeneización no contiene sacarosa, ya que ésta puede interferir en las medidas. Posteriormente se centrifuga dicha muestra a 500 *g* durante 20 minutos. Con ello se consigue eliminar los restos celulares y obtener un sobrenadante más homogéneo, que se divide en dos alícuotas, una para la determinación de los lípidos que han sufrido peroxidación (LPX) y otra para la de los lípidos susceptibles de sufrirla (LSPX).

3.2.2 Determinación de los lípidos que han sufrido peroxidación (LPX)

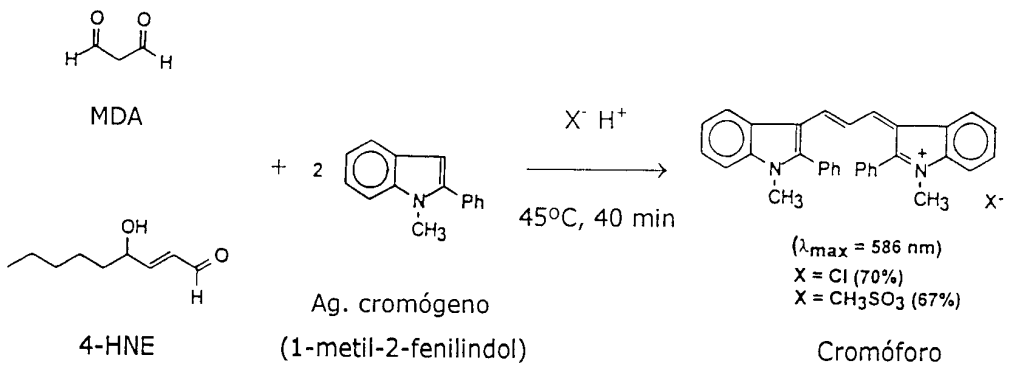


Fig. 3.II. Reacción colorimétrica del **MDA** y del **4-HNE** con el **1-metil-2-fenilindol** (adaptado de Erdelmeier *et al*., 1998).

El método de medida de la peroxidación lipídica se basa en la reacción de un agente cromógeno (1-metil-2-fenilindol) con el malonildialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) a 45ºC, catalizada por el ácido metasulfónico (CH_3SO_3H), que proporciona el medio ácido necesario, tal y como se describe en Gérard-Monnier *et al*. (1998). Una molécula de cualquiera de ambos aldehídos reacciona con dos moléculas del agente cromógeno, dando lugar a un complejo

coloreado (cromóforo), estable durante una hora a temperatura ambiente o dos horas a 4ºC, conservado en la oscuridad y sin que se produzca evaporación. El complejo formado presenta un máximo de absorbancia a 586 nm y se puede medir fácilmente en un espectrofotómetro vis-UV (ver **Fig. 2.II**).

Cuando se usa ácido clorhídrico (HCl) para proporcionar el medio ácido, se produce una medida selectiva del MDA (Gérard-Monnier *et al*., 1998), sin embargo, el color desarrollado por la muestra es mucho menor, por lo que se prefiere utilizar el ácido metasulfónico.

Las principales ventajas de este método frente a otros usados anteriormente (como el test del ácido tiobarbitúrico o TBA) son su simplicidad, su capacidad de disolver los lípidos, la baja temperatura de incubación y su especificidad (Chaudière y Gérard-Monnier, 1995).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Los pasos seguidos para la determinación de la medida de los LPX son los siguientes:

I. En primer lugar, se añaden los volúmenes correspondientes de la muestra de gónadas o contenido digestivo, según el caso (ver **resultados**), el agua destilada y el R_1 (formado por 1-metil-2-fenilindol, de Sigma, disuelto en acetonitrilo-metanol en proporción 1:3):

	Muestra gónadas	**Blanco gónadas**	**Muestra cont. digest.**	**Blanco cont. digest.**
R_1 (µl)	650	650	650	650
Muestra (µl)	100	---	600	---
H_2O (µl)	100	200	---	600

II. El MDA como tal no se puede usar para la realización de una recta patrón, puesto que es inestable. De ahí la necesidad de emplear su dietil acetal (TMOP, 1,1,3,3-tetrametoxipropano, d=0,997 g/ml, de Sigma), que sí es estable y que se hidroliza durante la incubación ácida a 45ºC, originando MDA (Esterbauer y Cheeseman, 1990). Por tanto, se confecciona una recta patrón con el estándar TMOP,

para lo cual es necesario preparar semanalmente una disolución 10 mM de dicho compuesto en Tris-ClH. Diariamente, se prepara una dilución 1:100 de este TMOP 10 mM, añadiéndose diferentes volúmenes para la realización de la recta patrón. Las concentraciones de TMOP (S_2) utilizadas para la elaboración de dicha recta son: 0, 5, 10, 20 y 30 µM.

III. A continuación, se les añade 150 µl del reactivo R_2 (ácido metasulfónico 15,4 M, de Sigma) a todos los tubos.

IV. Entonces se realiza la incubación a 45ºC durante 40 minutos, tanto de las muestras como del patrón.

V. Transcurrido ese tiempo, se centrifugan las muestras a 15.000 *g* durante un cierto tiempo (ver **resultados**).

VI. Finalmente, se determina la absorbancia, tanto de los tubos patrón como de las muestras, en un espectrofotómetro a 586 nm.

VII. Para determinar la concentración de lípidos peroxidizados en la muestra, se calcula primero la cantidad de MDA a partir de las absorbancias medidas con ayuda de la recta de calibrado y se multiplica después el valor obtenido por los factores de dilución empleados, tanto durante el proceso de homogeneización, como en la mezcla de reacción. El resultado se expresa en nmoles de MDA/g tejido fresco.

3.2.3 Determinación de los lípidos susceptibles de peroxidación (LSPX)

Los LSPX se miden únicamente en las gónadas, puesto que en el contenido digestivo se observa una turbidez excesiva debida a la gran cantidad de muestra que es necesario añadir. La determinación de dichos lípidos se lleva a cabo según el siguiente protocolo:

I. En primer lugar, se realiza la mezcla de incubación para la inducción de la peroxidación lipídica, utilizando un volumen de muestra preincubada de 125 µl (ver **resultados**), siguiendo una modificación del método de Livingstone *et al.* (1990b) y siendo las cantidades añadidas las siguientes:

	Muestra gónadas	**Blanco gónadas**
$FeSO_4$ 60 µM + ADP 3,4 mM (µl)	125	125
Ácido ascórbico 1,5 mM (µl)	125	125
Muestra (µl)	125	---
H_2O (µl)	---	125

II. Tanto la muestra como el blanco se incuban a 25ºC durante un cierto tiempo (ver **resultados**), favoreciendo así la inducción de la peroxidación lipídica.

III. Transcurrido ese tiempo, se añaden los siguientes volúmenes de R_1, muestra y agua:

BIBLIOTECA VIRTUAL

	Muestra gónadas	**Blanco gónadas**
R_1 (µl)	650	650
Muestra (µl)	200	---
H_2O (µl)	---	200

IV. A continuación, se realizan los pasos III-VI, descritos en la determinación de los LPX.

V. A partir de los resultados de absorbancia, se calcula la cantidad de LSPX en nmoles de MDA/g tejido fresco, utilizando la curva estándar de MDA.

3.2.4 Estudio *in vitro* con metales pesados

Los estudios destinados a determinar la influencia *in vitro* de algunos metales pesados sobre la peroxidación lipídica en *P. lividus* se realizan en el tejido gonadal, ya que éste es más homogéneo y, además, presenta unos niveles de LPX y LSPX superiores a los del contenido digestivo. La muestra utilizada en este estudio procede del mes de marzo de 1995, por ser uno de los meses en los que se observa mayor cantidad de LPX.

Para dichos estudios se emplean sales solubles de estos metales: $CdCl_2$ (cloruro de cadmio anhidro), $HgCl_2$ (cloruro mercúrico anhidro) y $PbAc_2 \cdot 2\ H_2O$ (acetato plumboso dihidratado), todos ellos de Sigma y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (sulfato cúprico pentahidratado), de Probus. El protocolo utilizado es el siguiente:

I. Se preparan disoluciones acuosas concentradas de las sales de estos metales, de manera que, por la adición de 50 µl de estas disoluciones en la mezcla final de incubación (250 µl para los LPX y 550 µl para los LSPX), se puedan obtener las concentraciones deseadas de cada metal. Estas concentraciones se establecen tomando como base anteriores estudios del efecto de los metales pesados sobre la peroxidación lipídica realizados por Labrot *et al.* (1996) y por Roméo y Gnassia-Barelli (1997). En la siguiente tabla, se especifican las concentraciones utilizadas de las disoluciones acuosas de cada uno de los metales, expresadas en µg/ml:

Metal	**Cu^{+2}**	**Cd^{+2}**	**Hg^{+2}**	**Pb^{+2}**
Concentraciones (µg/ml)	0	0	0	0
	3,125	5	25	500
	6,25	50	50	1000
	12,5	500	100	2000
	25	1000	200	3000
	50			

II. Se añaden entonces los volúmenes correspondientes de disolución concentrada del metal, muestra y agua:

	Muestra (LPX)	**Blanco (LPX)**	**Muestra (LSPX)**	**Blanco (LSPX)**
Dis. conc. metal (µl)	50	50	50	50
Muestra (µl)	200	---	500	---
H_2O (µl)	---	200	---	500

III. A continuación, se incuba la muestra con el metal a 25ºC durante un tiempo determinado, que oscila entre los 50 minutos para el cobre y los 60 minutos para el resto de los metales.

IV. El procedimiento restante consiste en la medida de los lípidos que se han peroxidizado y de los lípidos susceptibles de peroxidación, realizándose del modo descrito en apartados anteriores.

V. A partir del resultado de esta absorbancia, se calcula la cantidad de LPX y de LSPX en nmoles de MDA/g tejido fresco, utilizando la curva estándar de MDA.

3.2.5 Estudio *in vitro* con xenobióticos

Al igual que en el caso anterior, sólo se usan las gónadas de *P. lividus* como muestra para las medidas, procediendo dichas muestras del mes de marzo de 1995. Además, sólo se realiza la medida de los LPX, debido a los problemas de interferencia encontrados con alguno de los compuestos orgánicos necesarios para la disolución de los xenobióticos. Asimismo, ha de señalarse la imposibilidad de estudiar la influencia sobre el fenómeno peroxidativo de algunos compuestos orgánicos como la nitrofurantoína o el benzo(a)pireno, ya que los disolventes que sería necesario emplear, del tipo DMSO (dimetilsulfóxido) o DMF (dimetilformamida), producen la disolución total de los lípidos de la muestra, incluso en las condiciones de medida de los lípidos que han sufrido peroxidación. Los resultados obtenidos son, por tanto, erróneos, por lo que dichas medidas se han descartado.

Los xenobióticos usados son la MD (menadiona, 2-metil-1,4-naftoquinona), disuelta en etanol y el PQ (dicloruro de paraquat, dicloruro de 1,1´-dimetil-4,4´-bipiridina), disuelto en agua, ambos proporcionados por Sigma. En ambos casos, se añaden sólo 10 µl de la disolución del xenobiótico, para minimizar en lo posible los efectos debidos al disolvente. El procedimiento empleado es el siguiente:

I. Se preparan disoluciones concentradas de los xenobióticos, de manera que, por la adición de 10 µl de estas disoluciones en la mezcla final de incubación (250 µl), se puedan obtener las concentraciones deseadas de cada xenobiótico, que se establecen

tomando como base anteriores estudios del efecto de los xenobióticos sobre la peroxidación lipídica realizados por Wenning *et al.* (1988) y por Livingstone *et al*. (1990b). En la siguiente tabla, se especifican las concentraciones ensayadas de cada uno de los xenobióticos, expresadas en μmoles/l:

Xenobiótico	**MD**	**PQ**
Concentraciones (μM)	0 125 250 500	0 250 500 1000 2000

II. Se añaden entonces los volúmenes correspondientes de disolución concentrada del xenobiótico, muestra y agua:

	Muestra (LPX)	**Blanco (LPX)**
Dis. conc. xenobiótico (μl)	10	10
Muestra (μl)	200	---
H_2O (μl)	40	240

III. Se realiza una incubación de la muestra con el xenobiótico a 25ºC durante un tiempo de 60 minutos.

IV. El procedimiento restante consiste en la medida de los lípidos que se han peroxidizado, realizándose del modo descrito en apartados anteriores.

V. A partir del resultado de esta absorbancia, se calcula la cantidad de LPX en nmoles de MDA/g tejido fresco, utilizando la curva estándar de MDA.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Pruebas para la elección de las condiciones óptimas de medida de la peroxidación lipídica

Para la medida de la peroxidación lipídica en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, se han tenido que establecer las condiciones óptimas para distintos parámetros, entre ellos los tiempos de centrifugación y de incubación de la muestra, así como los volúmenes de muestra a emplear.

3.3.1.1 Medida de los lípidos que han sufrido peroxidación en las gónadas (G-LPX)

Respecto al **tiempo de centrifugación a 15.000 *g*** de la muestra en las gónadas de *P. lividus*, se ensayan distintos tiempos para tratar de conseguir un sobrenadante sin sustancias que puedan interferir en las medidas posteriores y, a la vez, que permita obtener valores más elevados de peroxidación lipídica en las muestras analizadas. Los resultados de dicha experiencia aparecen recogidos en la **Fig. 3.1**, donde se puede apreciar que los valores más elevados de G-LPX, expresados en nmoles de MDA/g tejido fresco, aparecen con un tiempo de centrifugación de 20 minutos. De 10 a 20 minutos, se observa un aumento gradual de la peroxidación lipídica en las gónadas de *P. lividus*, siendo este aumento del orden de un 28% al final de los 20 minutos.

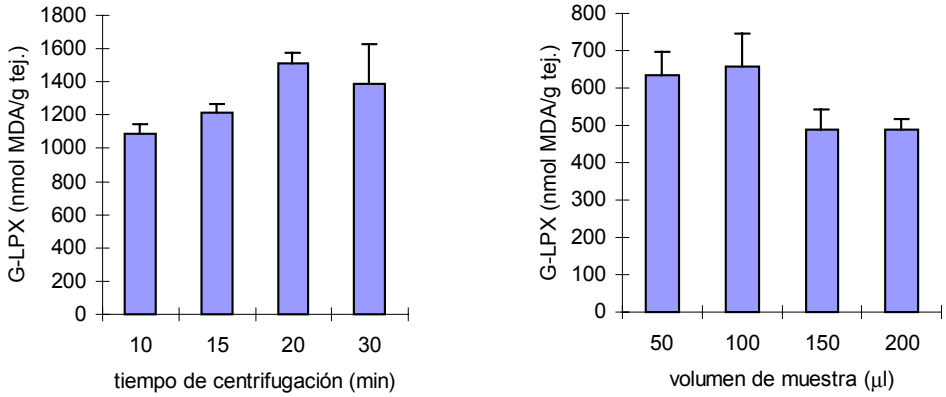


Fig. 3.1. Variación de los **lípidos peroxidizados** en las **gónadas** de *P. lividus* (G-LPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, con el **volumen de muestra** y con el **tiempo de centrifugación a 15.000 *g***. Los valores representan la media ± e.s. para 4 determinaciones.

A partir de este tiempo de centrifugación, se inicia un ligero descenso, midiéndose niveles de G-LPX de 1386,78 nmoles de MDA/g tejido fresco para 30 minutos.

En el caso del **volumen de muestra** que es necesario añadir al volumen final de reacción para la medida de los lípidos que han sufrido peroxidación en las gónadas de *P. lividus*, se ensayan distintos volúmenes, que oscilan entre los 50 µl y los 200 µl, determinándose el volumen óptimo que proporciona valores de lípidos que han sufrido peroxidación más elevados. En la **Fig. 3.1** se reflejan los resultados obtenidos. De ellos, se deduce que el volumen de muestra más apropiado en la medida de los G-LSPX es el de 100 µl, puesto que es con el que se obtienen unos valores más altos en nmoles de MDA/g tejido fresco. Estos niveles son del orden de un 4% y un 26% superiores a los obtenidos para volúmenes de muestra menores (50 µl) y mayores (150 µl), respectivamente.

3.3.1.2 Medida de los lípidos susceptibles de peroxidación en las gónadas (G-LSPX)

Para la determinación de los lípidos susceptibles de peroxidación en las gónadas es preciso la incubación de la muestra a 25ºC con la mezcla hierro-ADP-ácido ascórbico. Por ello, es necesario analizar la variación de la concentración de dichos lípidos con el tiempo de incubación y, a partir de ahí, establecer **el período de preincubación** óptimo. Dicha experiencia aparece recogida en la **Fig. 3.2**, donde se puede observar que, con la utilización de tiempos de incubación superiores a los 90 minutos, no se produce un aumento significativo de la concentración de lípidos susceptibles de peroxidación. Se aprecia que, para un tiempo de incubación de 90 minutos, hay un incremento de los valores de dichos lípidos de alrededor de un 12% respecto a los niveles medidos a los 30 y 60 minutos, mientras que dicho aumento se reduce a un 7% si lo comparamos con las concentraciones obtenidas a los 120 y 180 minutos.

El volumen óptimo de muestra preincubada a 25ºC queda establecido en 125 µl de muestra, tras probar diferentes volúmenes (ver **Fig. 3.2**). Las diferencias en la concentración de los lípidos susceptibles de peroxidación

apreciadas entre 100 y 125 µl son escasas, siendo este valor máximo obtenido para 125 µl alrededor de un 13% más elevado que el mínimo medido para un volumen de 50 µl (2347,04 y 2033,14 nmoles de MDA/g tejido fresco, respectivamente).

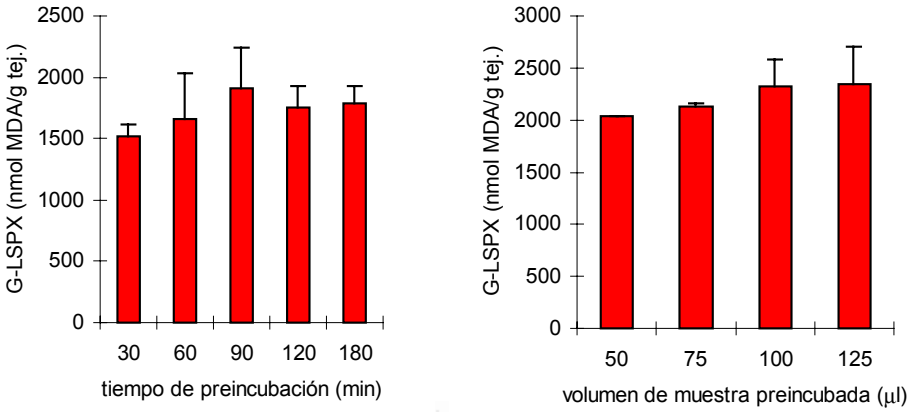


Fig. 3.2. Variación de los **lípidos susceptibles de peroxidación** en las **gónadas** de *P. lividus* (G-LSPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, con el **volumen de muetra preincubada** y con el **tiempo de preincubación**, ambos **a 25ºC**. Los valores representan la media ± e.s. para 4 determinaciones.

3.3.1.3 Medida de los lípidos que han sufrido peroxidación en el contenido digestivo (D-LPX)

En primer lugar, al igual que en las gónadas, se determina el **tiempo de centrifugación a 15.000 *g*** óptimo para el contenido digestivo de *P. lividus*, tal y como se puede observar en la **Fig. 3.3**.

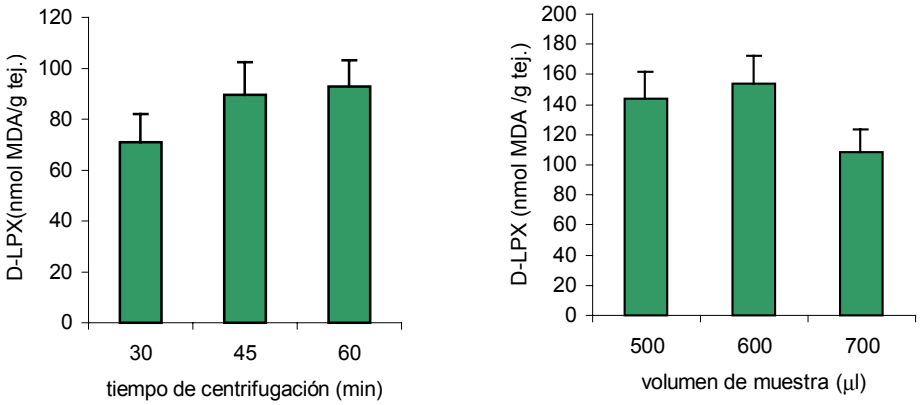


Fig. 3.3. Variación de los **lípidos peroxidizados** en el **contenido digestivo** de *P. lividus* (D-LPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, con el **volumen de muestra** y con el **tiempo de centrifugación a 15.000 *g***. Los valores representan la media ± e.s. para 4 determinaciones.

Los niveles mayores de D-LPX se miden a los 60 minutos, siendo dichos valores un 24% y un 4% menores para tiempos de centrifugación de 30 y 45 minutos, respectivamente.

A continuación, se prueban distintos volúmenes de la muestra de contenido digestivo en la mezcla final de reacción (ver **Fig. 3.3**). Se establece el **volumen de muestra** más adecuado en 600 µl, ya que para 500 y 700 µl los valores de D-LPX obtenidos son un 7% y un 30% menores, respectivamente.

3.3.2 Variación estacional en los niveles de peroxidación lipídica

3.3.2.1 Niveles de peroxidación lipídica en las gónadas

Fechas	G-LPX (nmoles MDA/g tej.)	G-LSPX (nmoles MDA/g tej.)	D-LPX (nmoles MDA/g tej.)
22/11/94	660,24 ± 17,48	910,40 ± 77,25	115,27 ± 6,11
26/12/94	615,49 ± 32,40	933,62 ± 61,67	89,90 ± 4,02
27/01/95	569,03 ± 39,90	1142,45 ± 123,81	92,16 ± 4,49
28/02/95	644,66 ± 65,85	1339,68 ± 143,40	104,17 ± 2,49
30/03/95	784,94 ± 12,54	1196,43 ± 79,98	119,97 ± 5,77
28/04/95	784,90 ± 61,62	1251,05 ± 154,74	110,91 ± 2,86
26/05/95	552,70 ± 44,28	739,86 ± 43,53	90,80 ± 4,84
28/06/95	395,40 ± 24,07	566,12 ± 68,63	102,62 ± 1,17
21/07/95	386,40 ± 23,96	552,98 ± 34,89	91,13 ± 6,75
28/08/95	385,80 ± 101,94	632,46 ± 302,63	64,31 ± 3,07
26/09/95	430,20 ± 35,59	641,81 ± 39,55	85,98 ± 4,83
30/10/95	683,40 ± 41,99	1161,52 ± 108,88	78,52 ± 2,88

Tabla 3.1. Variación estacional de los **lípidos peroxidizados** (LPX) y de los **lípidos susceptibles de peroxidación** (LSPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, en las **gónadas** (G) y en el **contenido digestivo** (D) del erizo de mar, *P. lividus*. Los resultados se expresan como la media ± e.s para 4 determinaciones.

Los valores observados en las gónadas de *P. lividus* para los **lípidos que han sufrido peroxidación** (**G-LPX**), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, oscilan entre un valor máximo de alrededor de 785 medido en los meses de

marzo y abril de 1995 y un valor mínimo de alrededor de 386 observado entre los meses de julio y agosto de ese mismo año (ver **Tabla 3.1**).

Desde noviembre de 1994 hasta enero de 1995 se produce una disminución de la peroxidación lipídica de forma continua. A partir de este mes se inicia un rápido ascenso de los niveles de G-LPX, de forma que, durante los meses de marzo y abril de 1995, se obtienen los niveles más elevados de todo el período estudiado, que suponen el doble de los valores más bajos, medidos en los eses siguientes de junio a agosto de 1995, tal y como se muestra en la **Fig. 3.4**.

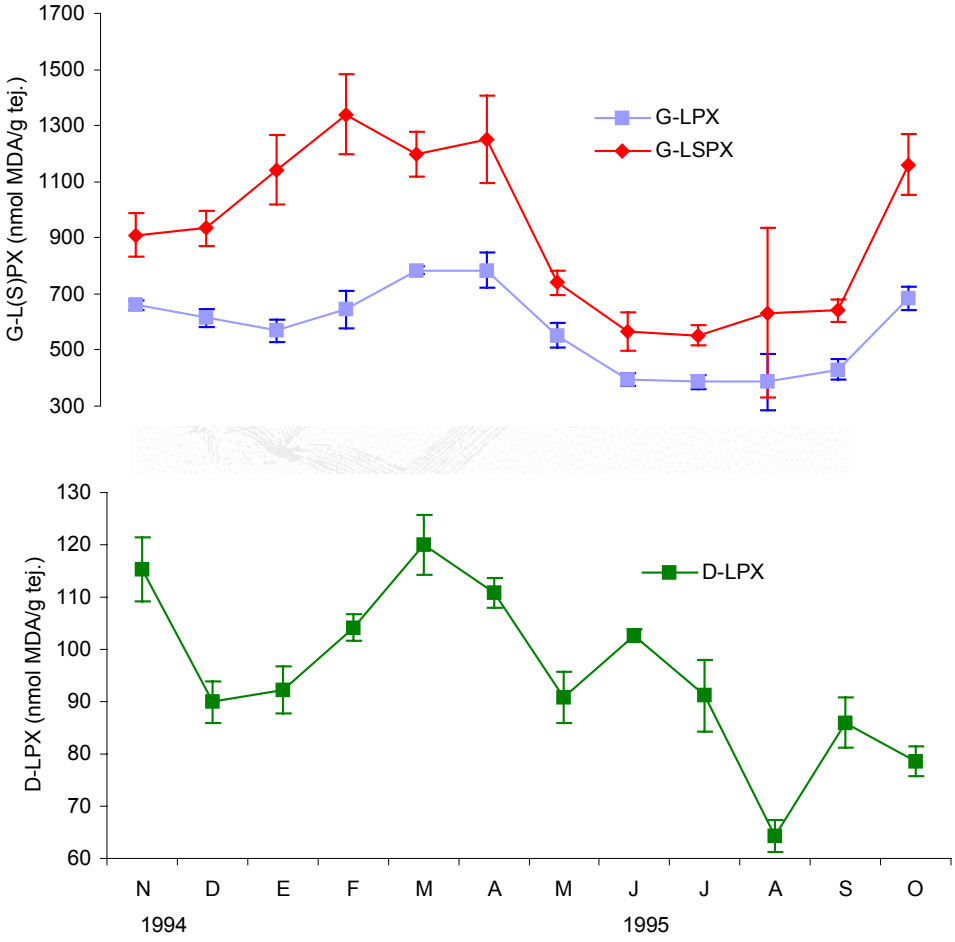


Fig. 3.4. Variación estacional de los **lípidos peroxidizados** (LPX) y de los **lípidos susceptibles de peroxidación** (LSPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, en las **gónadas** (G) y en el **contenido digestivo** (D) del erizo de mar, *P. lividus*. Los valores representan la media ± e.s. para 4 determinaciones.

La recuperación de los niveles comienza a apreciarse a partir del mes de septiembre de 1995, obteniéndose en octubre de ese mismo año un nivel similar al

medido en diciembre del año anterior (683,40 y 615,49 nmoles de MDA/g tejido fresco, respectivamente).

En la **Fig. 3.4** se demuestra la existencia de variación estacional en los niveles de los **lípidos susceptibles de peroxidación (G-LSPX**), expresados en nmoles de MDA/g tejido fresco gonadal. El valor máximo se observa en el mes de febrero de 1995 (1339,68 nmoles de MDA/g tejido fresco), manteniéndose este nivel elevado hasta el mes de abril de 1995 y, a partir de entonces, comienza un descenso bastante acusado hasta el mes de julio, en el que se obtiene uno de los valores más bajos de todo el período estudiado (552,98 nmoles de MDA/g tejido fresco). Desde el mes de julio hasta septiembre de 1995 se mantienen esos niveles mínimos (entre 550-640 nmoles de MDA/g tejido fresco) para los lípidos susceptibles de peroxidación. A partir de octubre, dichos niveles comienzan su recuperación, obteniéndose en este mes valores semejantes a los medidos en enero de ese mismo año (1161,52 frente a 1142,45 nmoles de MDA/g tejido fresco).

Durante el período analizado, los lípidos susceptibles de sufrir peroxidación muestran valores en todo momento superiores a los de los lípidos que han sufrido peroxidación. La relación entre ambos tipos de lípidos oscila entre un valor mínimo de 1,4 correspondiente al mes de mayo y un máximo de 2,0 en el mes de enero, siendo en la mayoría de los casos estas relaciones próximas a 1,6 (ver **Tabla 3.1**).

3.3.2.2 Niveles de peroxidación lipídica en el contenido digestivo

Los valores observados en el contenido digestivo de *P. lividus* para los **lípidos que han sufrido peroxidación** (**D-LPX**), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, presentan un valor máximo de 119,97 medido en marzo de 1995 (**Tabla 3.1**). Desde noviembre a diciembre de 1994 se produce un acusado descenso (de 115,27 a 89,90), iniciándose en el mes siguiente un ascenso gradual de los niveles de D-LPX, hasta el valor máximo medido en marzo de 1995 (119,97). A partir de ese mes, los valores de lípidos peroxidizados en el digestivo inician un paulatino descenso, sólo interrumpido por un ligero ascenso del 13% en junio, hasta alcanzar un valor mínimo de 64,31 observado en el mes de agosto de 1995 (ver **Fig. 3.4**). En los dos meses siguientes se produce una ligera

recuperación, que oscila entre un 34% en septiembre y un 22% en octubre de 1995.

En todos los casos, los niveles de LPX medidos en el contenido digestivo son menores que los de las gónadas, variando dicha relación entre 3,8 veces en junio de 1995 y 8,8 veces en octubre de ese mismo año, aunque en la mayoría de los meses analizados los valores de lípidos peroxidizados en el contenido digestivo son entre 6 y 7 veces inferiores a los determinados en las gónadas (**Tabla 3.1**).

3.3.3 Relación entre el índice gonadal, los niveles de lípidos totales y la peroxidación lipídica

En la **Tabla 3.2** se muestran los coeficientes de correlación de Spearman entre el **índice gonadal**, los niveles de **lípidos totales** y la **peroxidación lipídica** en cada tejido.

	GL	**DL**	**G-LPX**	**G-LSPX**	**D-LPX**
IG	0,098	0,706**	0,769**	0,804**	0,531
GL		-0,224	-0,203	0,049	-0,070
DL			0,538	0,378	0,615*
G-LPX				0,867***	0,559
G-LSPX					0,427

*0,01<p<0,05, **0,001<p<0,01, ***p<0,001

Tabla 3.2. Matriz de los coeficientes de correlación de Spearman entre el **índice gonadal** (IG), los **lipídos totales** (L), los **lípidos peroxidizados** (LPX) y los **lípidos susceptibles de peroxidación** (LSPX) en las **gónadas** (G) y en el **contenido digestivo** (D) del erizo de mar, *P. lividus*.

Tanto los lípidos que se han peroxidizado (G-LPX) como los lípidos susceptibles de peroxidación (G-LSPX) presentes en las gónadas de *P. lividus* muestran un buen coeficiente de correlación con el índice gonadal (IG) (r_s=0,769, 0,001<p<0,01 y r_s=0,804, 0,001<p<0,01, respectivamente). El perfil de la gráfica de los **lípidos que han sufrido peroxidación en las gónadas** observado en la **Fig. 3.4** es muy similar al obtenido para el **índice gonadal,** medido durante el mismo

período de tiempo y en los mismos animales, como se puede apreciar en la **Fig. 2.1.** Los períodos de mayor concentración de lípidos que han sufrido peroxidación (de marzo a abril) coinciden prácticamente con los máximos valores del índice gonadal (de marzo a mayo), así como con la fase de acumulación de reservas en las gónadas. Esta coincidencia también se hace evidente en el caso de los mínimos niveles de la peroxidación lipídica y del índice gonadal (desde junio hasta agosto), que se corresponde con la fase de desove del contenido gonadal.

Para los **lípidos susceptibles de peroxidación en las gónadas** también se aprecia una coincidencia en el perfil de su gráfica y el de la del **índice gonadal** calculado en el mismo período de tiempo, ya que el máximo que experimenta dicho índice entre los meses de marzo y mayo (ver **Fig. 2.1**) tiene su equivalente entre los meses de febrero y abril en el caso de los lípidos susceptibles de peroxidación. También ocurre lo mismo con los valores mínimos de índice gonadal, que prácticamente coinciden con los valores más bajos en los niveles de dichos lípidos, siendo el mínimo para el índice gonadal entre los meses de julio y septiembre y entre junio y septiembre para los lípidos susceptibles de peroxidación.

Asimismo, la relación entre **G-LPX** y **G-LSPX** es muy positiva, tal y como indica su alto coeficiente de Spearman (r_s=0,867, p<0,001). Además, en la **Fig. 3.4** se puede apreciar la similitud de sus perfiles de variación estacional.

En cuanto a los niveles de **lípidos peroxidizados en el contenido digestivo** de *P. lividus*, muestran una buena correlación con respecto al contenido en **lípidos totales** en dicho tejido (r_s=0,615, 0,01<p<0,05), mientras que en el caso de los LPX de las gónadas y los niveles de GL no se encuentra ninguna relación estadísticamente significativa.

3.3.4 Influencia *in vitro* de los metales pesados en la peroxidación lipídica

Respecto a la influencia de los distintos metales pesados sobre la peroxidación lipídica en las gónadas de *P. lividus*, se analiza el efecto *in vitro* sobre dicho parámetro del cobre (II), el cadmio, el plomo (II) y el mercurio (II).

3.3.4.1 Influencia del cobre (II)

La influencia del cobre (II) en la peroxidación lipídica se refleja en la **Fig. 3.5**, donde se observa claramente una inhibición de los **lípidos que han sufrido peroxidación**, que aumenta con la concentración de cobre, pasando de un valor de 766,51 nmoles de MDA/g tejido fresco en ausencia de cobre a valores entre 308,76 y 312,89 nmoles de MDA/g tejido fresco para las concentraciones de cobre de 25 y 50 μg/ml, respectivamente, situándose esta inhibición en presencia de un alto contenido en cobre en torno a un 60% (**Tabla 3.3**).

	[Cu^{+2}] (μg/ml)					
	0	**3,125**	**6,25**	**12,5**	**25**	**50**
LPX	766,51 (104,47)	522,52 (60,57)	445,54 (51,55)	381,97 (31,20)	308,76 (29,40)	312,89 (32,43)
LSPX	998,54 (47,57)	746,61 (51,51)	672,29 (22,05)	538,73 (31,98)	432,36 (16,69)	300,06 (28,93)

Tabla 3.3. Efecto del **cobre** (Cu) sobre los **lípidos peroxidizados** (LPX) y los **lípidos susceptibles de peroxidación** (LSPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*. Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones.

En cuanto a los **lípidos susceptibles de peroxidación**, se observa también un descenso gradual de los valores de dichos lípidos, a medida que aumenta la concentración de cobre (**Fig. 3.5**), hasta alcanzar un máximo de inhibición del 70% para la concentración más elevada ensayada, tal y como se aprecia en la **Tabla 3.3**. Cabe destacar que el efecto inhibitorio del cobre es más patente en el caso de los lípidos susceptibles de sufrir peroxidación para concentraciones elevadas de dicho metal, mientras que ocurre lo contrario para concentraciones más bajas, de manera que para una concentración de 6,25 μg/ml el descenso es del 42% para los lípidos que han sufrido peroxidación y del 33% para los susceptibles de peroxidación.

Además es preciso resaltar que, si bien en ausencia de cobre, los niveles de lípidos susceptibles de peroxidación son del orden de un 27% más elevados que los lípidos que han sufrido peroxidación, a medida que aumenta la concentración de cobre, estas diferencias son cada vez menores, siendo estos niveles prácticamente los mismos para una concentración de 50 μg/ml (300,06 frente a 312,89 nmoles de MDA/g tejido fresco).

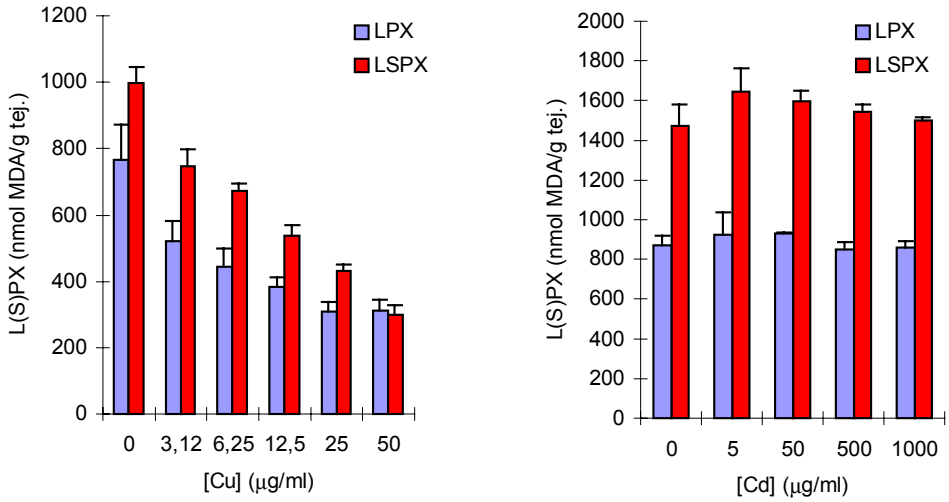


Fig. 3.5. Efecto del **cobre** (Cu) y del **cadmio** (Cd) sobre los **lípidos peroxidizados** (LPX) y los **lípidos susceptibles de peroxidación** (LSPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*. Los valores representan la media ± e.s. para 4 determinaciones.

3.3.4.2 Influencia del cadmio

En la **Fig. 3.5** se puede apreciar que el cadmio apenas modifica los niveles de peroxidación lipídica en las gónadas de *P. lividus*, ya sea expresada como lípidos que han sufrido peroxidación (entre 927,62 y 851,66 nmoles de MDA/g tejido fresco) o como lípidos susceptibles de peroxidación (entre 1644,66 y 1471,11 nmoles de MDA/g tejido fresco).

	$[Cd^{+2}]$ (µg/ml)				
	0	**5**	**50**	**500**	**1000**
LPX	871,73 (46,49)	924,41 (113,36)	927,62 (10,40)	851,66 (35,19)	859,24 (33,46)
LSPX	1471,11 (109,23)	1644,66 (116,21)	1594,67 (55,35)	1543,79 (35,55)	1500,31 (13,66)

Tabla 3.4. Efecto del **cadmio** (Cd) sobre los **lípidos peroxidizados** (LPX) y los **lípidos susceptibles de peroxidación** (LSPX), expresados como nmoles de MDA/ g tejido fresco, en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*. Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones.

Si bien en las concentraciones más bajas de dicho metal (5 y 10 µg/ml) se produce un ligero aumento del 6% en el caso de los **lípidos peroxidizados,** para concentraciones mayores aparece una inhibición inferior al 2% (**Tabla 3.4**). En cualquier caso, las diferencias no son estadísticamente significativas (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$).

En cuanto a los niveles de **lípidos susceptibles de peroxidación**, para todas las concentraciones de cadmio se observan niveles ligeramente más elevados que en ausencia de este metal, oscilando estos valores entre 1644,66 y 1500,31 frente a 1471,11 nmoles de MDA/g tejido fresco (ver **Tabla 3.4**).

A diferencia del caso del cobre, el cadmio no parece modificar la relación entre lípidos peroxidizados y susceptibles de peroxidación, ya que esta proporción se mantiene alrededor de 1,7 en todos los casos.

3.3.4.3 Influencia del mercurio (II)

Cuando se incuba la muestra con mercurio (II), tanto los **lípidos que han sufrido peroxidación** como **los susceptibles de peroxidación** sufren una fuerte caída de sus niveles, al aumentar la concentración de dicho metal de 0 a 200 μg/ml (ver **Fig. 3.6**). Esta máxima inhibición es del orden del 68% en el primer caso y de un 78% en el segundo caso. Pero, a diferencia del cobre, para el mercurio la concentración necesaria para producir este elevado grado de inhibición es mayor (50 frente a 200 μg/ml).

	$[Hg^{+2}]$ (μg/ml)				
	0	**25**	**50**	**100**	**200**
LPX	915,41 (10,69)	622,68 (28,91)	443,42 (28,48)	336,81 (28,30)	289,64 (25,96)
LSPX	1450,53 (9,02)	1183,16 (35,45)	1128,38 (25,13)	571,40 (8,25)	320,13 (32,53)

Tabla 3.5. Efecto del **mercurio** (Hg) sobre los **lípidos peroxidizados** (LPX) y los **lípidos susceptibles de peroxidación** (LSPX), expresados como nmoles de MDA/ g tejido fresco, en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus.* Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones.

Al igual que sucede con el cobre, en este caso también se puede observar en la **Tabla 3.5** que para concentraciones altas de mercurio el efecto inhibitorio se aprecia más en los lípidos susceptibles de sufrir peroxidación, mientras que para las más bajas la tendencia se invierte y así, para una concentración de 50 μg/ml, el descenso es del 52% para los lípidos que han sufrido peroxidación y del 22% para los susceptibles de peroxidación.

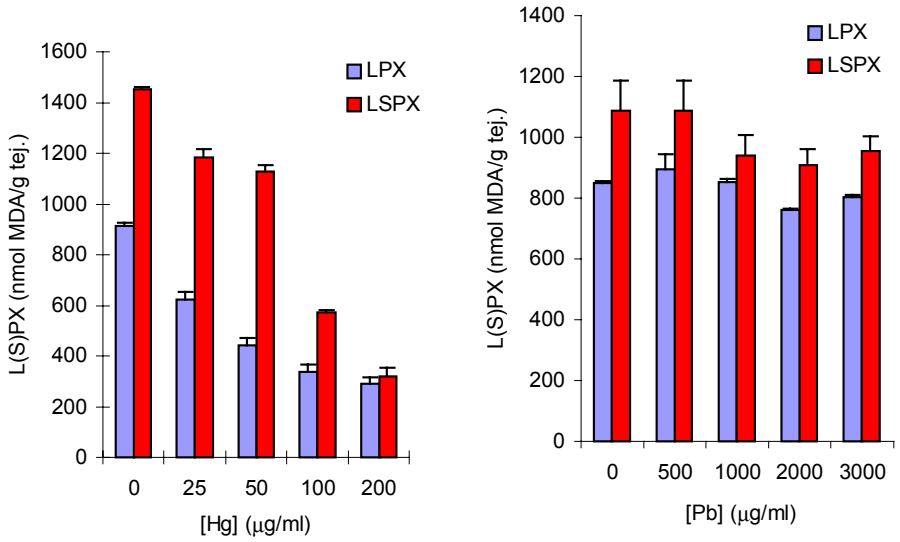


Fig. 3.6. Efecto del **mercurio** (Hg) y del **plomo** (Pb) sobre los **lípidos peroxidizados** (LPX) y los **lípidos susceptibles de peroxidación** (LSPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*. Los valores representan la media ± e.s. para 4 determinaciones.

Además, y como ocurre con el cobre, los niveles de ambos lípidos coinciden prácticamente en presencia de la mayor concentración de mercurio analizada, siendo de 289,64 y 320,13 nmoles de MDA/g tejido fresco, respectivamente (**Tabla 3.5**).

3.3.4.4 Influencia del plomo (II)

	$[Pb^{+2}]$ (µg/ml)				
	0	**500**	**1000**	**2000**	**3000**
LPX	847,86 (9,26)	896,01 (47,89)	852,05 (12,68)	760,62 (5,13)	802,68 (8,89)
LSPX	1086,67 (101,05)	1087,69 (99,79)	939,80 (67,32)	907,32 (54,11)	955,77 (48,06)

Tabla 3.6. Efecto del **plomo** (Pb) sobre los **lípidos que han sufrido peroxidación** (LPX) y los **lípidos susceptibles de peroxidación** (LSPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus.* Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones.

La **Fig. 3.6** muestra la influencia del plomo (II) sobre la peroxidación lipídica en las gónadas de *P. lividus*. A partir de los resultados ahí representados, se puede deducir que, tanto en los lípidos que han sufrido la peroxidación como en los susceptibles de sufrirla, apenas existen modificaciones en presencia de concentraciones crecientes de plomo, ya que para la concentración máxima

analizada se producen descensos del orden del 5% y 12%, respectivamente (**Tabla 3.6**), lo que no resulta estadísticamente significativo (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$).

La concentración de plomo más baja utilizada prácticamente no modifica los niveles de ambos lípidos e, incluso, parece aumentar ligeramente el nivel de los **lípidos peroxidizados**, pero a partir de los 1000 µg/ml se aprecia un ligero descenso, que es del 10% para una concentración de metal de 2000 µg/ml y del 5% para la concentración máxima analizada. En los **lípidos susceptibles de sufrir peroxidación**, la inhibición es prácticamente constante a partir de esa misma concentración, siendo alrededor de un 12% (ver **Tabla 3.6**).

La relación entre ambos tipos de lípidos se mantiene en este caso más o menos constante, independientemente de la concentración del metal, al igual que sucedía con el cadmio.

3.3.5 Influencia *in vitro* de los xenobióticos en la peroxidación lipídica

Para el estudio de la influencia sobre la peroxidación lipídica de los xenobióticos orgánicos menadiona y dicloruro de paraquat, como ya se ha explicado anteriormente, sólo se trabaja con la medida de los lípidos que se han peroxidizado. Esto se debe principalmente a que, en ensayos realizados para la medida de los lípidos susceptibles de peroxidación, los valores de estos, expresados en nmoles de MDA/g tejido fresco, han sido muy bajos, debido a la interferencia de las distintas sustancias implicadas en su determinación y, por tanto, estas medidas no se han tenido en cuenta.

3.3.5.1 Influencia de la menadiona

El efecto de diferentes concentraciones de menadiona (MD) sobre la peroxidación lipídica en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*, se ve reflejado en la **Fig. 3.7**. Se miden los niveles de lípidos que han sufrido peroxidación, expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, tanto en ausencia como en presencia de concentraciones crecientes de menadiona de 125, 250 y 500 µM. El efecto de la menadiona sobre los niveles de dichos lípidos, tal y como se aprecia

en la gráfica, es claramente inhibitorio, aumentando dicha inhibición a medida que incrementa la concentración de menadiona.

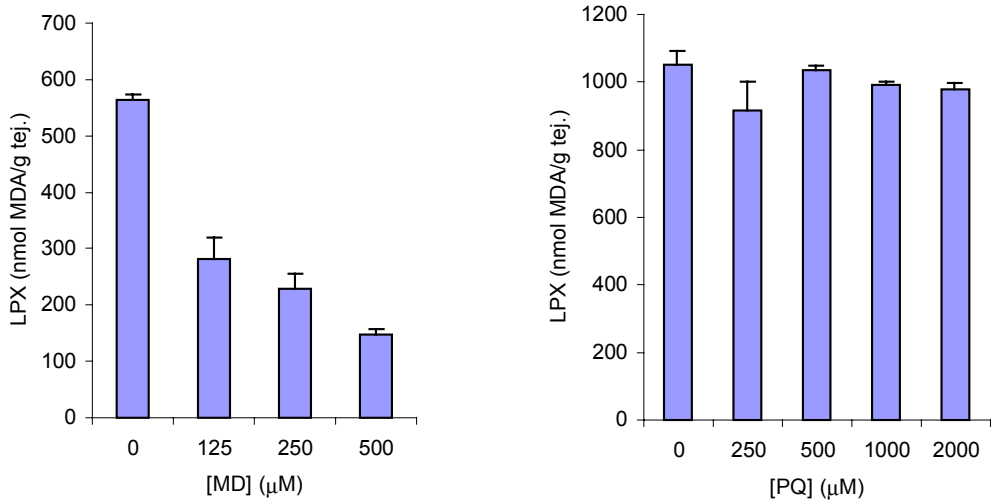


Fig. 3.7. Efecto de la **menadiona** (MD) y el **paraquat** (PQ) sobre los **lípidos peroxidizados** (LPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*. Los valores representan la media ± e.s. para 4 determinaciones.

Los niveles de **lípidos que han sufrido peroxidación** descienden desde valores de 563,00 nmoles de MDA/g tejido fresco en ausencia de menadiona hasta valores de 147,64 nmoles de MDA/g tejido fresco en presencia de menadiona 500 µM, lo que supone una inhibición de alrededor de un 74% para la máxima concentración ensayada de menadiona, tal y como se observa en la **Tabla 3.7**. Se realizaron ensayos preliminares con concentraciones superiores a 500 µM de dicho xenobiótico, observándose una inhibición prácticamente total de los lípidos peroxidizados, por lo que dichos resultados no se muestran en la gráfica.

	[MD] (µM)			
	0	**125**	**250**	**500**
LPX	563,02 (11,04)	282,68 (37,46)	228,45 (27,79)	147,64 (8,76)

Tabla 3.7. Efecto de la **menadiona (MD)** sobre los **lípidos peroxidizados** (LPX), expresados como nmoles de MDA/ g tejido fresco, en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus.* Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones.

3.3.5.2 Influencia del paraquat

Esta inhibición sobre la peroxidación lipídica no se aprecia, por el contrario, en presencia del otro xenobiótico utilizado, el paraquat (PQ) (ver **Fig. 3.7**). Las concentraciones empleadas en este caso son hasta 2000 μM, pero aún para esta concentración, la variación en los niveles de lípidos que han sufrido peroxidación es mínima, oscilando entre un 13% para una concentración de paraquat de 250 μM y un 2% para 500 μM, diferencias que no se consideran estadísticamente significativas (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$).

El nivel mínimo de **lípidos que han sufrido peroxidación** se mide en presencia de 250 μM de paraquat (915,78 nmoles de MDA/g tejido fresco) y el máximo en ausencia de este xenobiótico (1052,71 nmoles de MDA/g tejido fresco) (ver **Tabla 3.8**). Estas pequeñas diferencias en los niveles de peroxidación, unidas a las grandes concentraciones de xenobiótico empleadas, hace pensar en la ausencia de un efecto inhibitorio del paraquat sobre la peroxidación lipídica en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus.*

	[PQ] (μM)				
	0	**250**	**500**	**1000**	**2000**
LPX	1052,71 (38,73)	915,78 (85,19)	1035,04 (13,15)	990,10 (12,21)	979,20 (18,64)

Tabla 3.8. Efecto del **paraquat** (PQ) sobre los **lípidos peroxidizados** (LPX), expresados como nmoles de MDA/ g tejido fresco, en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*. Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones.

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 Niveles de peroxidación lipídica

Aunque sólo existe un trabajo precedente relacionado con los niveles de peroxidación lipídica en equinodermos, realizado en *Strongylocentrotus intermedius* por Lukyanova y Khotimchenko (1995), no se pueden comparar los datos de dicho trabajo con los del presente estudio, ya que en aquel se expresó la medida de la peroxidación lipídica en nmoles de MDA/mg proteína, mientras que en el presente caso las unidades empleadas son nmoles de MDA/g tejido fresco. Se consideró que era más correcto el empleo de estas últimas unidades, ya que según Halliwell y Gutteridge (1991) sólo se debe hablar de peroxidación lipídica enzimática cuando intervienen las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa (en cuyo caso tendría sentido utilizar nmoles de MDA/mg proteína), mientras que en el resto de los casos se hablaría de peroxidación lipídica no enzimática y, por tanto, lo correcto sería expresarla como nmoles de MDA/g tejido fresco.

Sin embargo, sí existen varios trabajos realizados en otros invertebrados marinos y en varias especies de peces en los que los resultados de peroxidación lipídica están expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, aunque en ninguno de ellos se midieron los niveles de peroxidación lipídica en el tejido gonadal. Comparados con estos datos de la bibliografía, los valores medidos en las gónadas de *P. lividus* resultan sorprendentemente elevados (**Tabla 3.I**) y oscilan entre un valor mínimo de 385,8 y un valor máximo de 784,9 en el caso de los lípidos peroxidizados y entre 553,0 y 1339,7 para los lípidos susceptibles de peroxidación, todos ellos expresados en nmoles de MDA/g tejido fresco. Sin embargo, los niveles medidos de LPX en el contenido digestivo de este erizo de mar son similares o ligeramente mayores que los encontrados en otros invertebrados (entre 64,3 y 120,0 nmoles de MDA/g tejido fresco).

Así, por ejemplo, los **lípidos que han sufrido peroxidación en las gónadas** de *P. lividus* alcanzan niveles entre 37 y 76 veces más altos que los observados en la glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis* (Ribera *et al*., 1991), entre 20 y 40 veces mayores que los medidos en la glándula digestiva de la almeja *Ruditapes decussatus* (Roméo y Gnassia-Barelli, 1997) o entre 5 y 10 veces superiores a los publicados en la glándula digestiva del molusco *Perna*

viridis (Prakash y Rao, 1995). Estas diferencias aún son más acusadas cuando comparamos los resultados obtenidos en las gónadas de *P. lividus* con los medidos en otros tejidos de dichos invertebrados (ver **Tabla 3.I**).

Especie	Tejido	LPX	LSPX	Cita
Gadus morhua	Hígado	34,3 ± 4,3	271,0 ± 50,0	Lemaire *et al*. (1993b)
	Vej. natatoria	0	63,3 ± 14,9	
	Branquias	40,2 ± 3,2	8,9 ± 1,2	
	Músculo	3,1 ± 0,9	1,0 ± 0,1	
Adamussium cobelcki	Gl. digestiva	45,35 ± 6,67	74,64 ± 7,28	Viarengo *et al*. (1995)
Pecten jacobeus	Gl. digestiva	22,94 ± 1,56	45,33 ± 8,59	Viarengo *et al*. (1995)
Perna viridis	Gl. digestiva	68,3 ± 7,6	---	Prakash y Rao (1995)
	Branquias	17,7 ± 2,5	---	
	Manto	25,0	---	
Mytilus edulis	Gl. digestiva	10,3 ± 0,8	758 ± 28	Ribera *et al*. (1991)
	Branquias	9,7 ± 0,8	246 ± 11	
	Resto	7,4 ± 1,9	684 ± 64	
Ruditapes decussatus	Gl. digestiva	20,1 ± 1,3	328,8 ± 65,8	Roméo y Gnassia-Barelli (1997)
	Branquias	34,2 ± 1,5	340,4 ± 2,4	
Paracentrotus lividus	Cont. digest.	64,3-120,0	---	Presente estudio
	Gónadas	385,8-784,9	553,0-1339,7	

Tabla 3.I. Tabla comparativa de los niveles de los **lípidos peroxidizados** (LPX) y de los **lípidos susceptibles de peroxidación** (LSPX), expresados como nmoles de MDA/g tejido fresco, en distintas especies de **organismos acuáticos**.

Estudios realizados en peces mostraron también unos niveles de lípidos peroxidizados inferiores a los de gónadas de *P. lividus*. Es el caso del bacalao, *Gadus morhua*, cuyo hígado y branquias presentan unos valores de LPX de 34,3 y 40,2 nmoles de MDA/g tejido fresco, respectivamente (Lemaire *et al*., 1993b) frente al rango comprendido entre 385,8 y 784,9 nmoles de MDA/g tejido fresco encontrado en las gónadas del animal objeto del presente estudio.

Al realizar un análisis del contenido en **lípidos susceptibles de peroxidación en las gónadas** de *P. lividus*, se comprueba que los niveles obtenidos para los meses de verano (553,0 nmoles de MDA/g tejido fresco) son un poco menores a los medidos en la glándula digestiva de *M. edulis*, que rondan los 760 nmoles de MDA/g tejido fresco (Ribera *et al.*, 1991) y casi el doble de los

observados en la glándula digestiva de *R. decussatus* (Roméo y Gnassia-Barelli, 1997). Por el contrario, los valores máximos de los lípidos susceptibles de peroxidación en *P. lividus* (1339,7 nmoles de MDA/g tejido fresco) están ya muy por encima de los publicados hasta el momento en otros invertebrados marinos. Dichos lípidos en peces también presentan niveles muy inferiores a los medidos para las gónadas de *P. lividus* en el presente estudio, como es el caso del hígado de *G. morhua* con 271,0 nmoles de MDA/g tejido fresco (Lemaire *et al*., 1993b).

Aunque para los dos tipos de lípidos medidos en las gónadas de *P. lividus*, los niveles absolutos son siempre muy superiores a los encontrados en otras especies de organismos marinos, **la relación entre lípidos susceptibles de peroxidación y lípidos peroxidizados** en las gónadas de *P. lividus* es muy similar a la determinada para dos especies de vieira, *Adamussium cobelcki* y *Pecten jacobeus* (Viarengo *et al*., 1995) y se sitúa en torno a 1,6. Sin embargo, esta relación es mucho mayor en distintos tejidos de *R. decussatus* (5 y 10 en la glándula digestiva y en las branquias, respectivamente) (Roméo y Gnassia-Barelli, 1997) y especialmente en la glándula digestiva de *M. edulis*, donde los lípidos susceptibles de peroxidación presentan niveles unas 75 veces superiores a los peroxidizados (Ribera *et al*., 1991).

Respecto a los **niveles de LPX** medidos **en el contenido digestivo** de *P. lividus*, sus valores mínimos coinciden con los observados en la glándula digestiva del molusco *Perna viridis* (Prakash y Rao, 1995) y son entre 3 y 6 veces superiores a los medidos en el mismo órgano de otros moluscos tales como la almeja *Ruditapes decussatus* y el mejillón *Mytilus edulis* (64,3 frente a 20,1 y 10,3 nmoles de MDA/g tejido fresco) (Roméo y Gnassia-Barelli, 1997; Ribera *et al*., 1991). En cambio, los valores máximos de LPX en el contenido digestivo del erizo de mar son superiores a los de otros organismos marinos, siendo dichos valores el doble de los obtenidos para la glándula digestiva de *P. viridis* y 10 veces los medidos para el mismo tejido de *M. edulis*.

Al igual que para otros invertebrados marinos, se ha determinado en *Paracentrotus lividus* la existencia de **diferencias en los niveles de peroxidación lipídica según el tejido analizado**, siendo en el presente caso los valores de

lípidos peroxidizados medidos en las gónadas mayores que los encontrados en el contenido digestivo. Las posibles causas de dichas diferencias podrían ser una variación en el contenido de los PUFA en los lípidos de membrana y en las actividades de los enzimas antioxidantes en cada órgano. Así, por ejemplo, Musgrave *et al.* (1987) observaron en el mejillón *M. edulis* un mayor grado de peroxidación lipídica en las gónadas que en el hepatopáncreas de dicho animal, y lo atribuían al mayor contenido en triglicéridos ricos en ácidos grasos saturados en este último órgano, que no son un buen sustrato para la peroxidación y que podrían actuar, por tanto, como un mecanismo protector frente al fenómeno peroxidativo.

3.4.2 Variación estacional de la peroxidación lipídica

Existe muy poca información disponible sobre la variación estacional de la peroxidación lipídica en organismos marinos, si exceptuamos un estudio en la glándula digestiva del mejillón *Mytilus* sp. realizado por Viarengo *et al*. (1991a) y otro sobre la relación entre la peroxidación lipídica y el ciclo reproductivo en la llamada vieira japonesa *Mizuhopecten yessoensis* y en el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Lukyanova y Khotimchenko, 1995), por lo que el análisis comparativo se reduce a estas especies de invertebrados. En dichos trabajos se enunciaba que los principales factores que podían influir en la posible variabilidad estacional del proceso peroxidativo serían, en primer lugar, los de tipo ambiental, como el nivel de oxígeno disuelto y la temperatura; en segundo lugar, los que modifican el estado metabólico del animal, tales como el ciclo gonadal o la disponibilidad de alimento y, por último, aquellos más relacionados con la peroxidación lipídica en si misma, como serían la disponibilidad del sustrato a oxidar (los PUFA) y la capacidad de respuesta frente a este daño oxidativo de las defensas antioxidantes.

En el caso de **las gónadas** del erizo de mar *P. lividus*, **la variación en los niveles de peroxidación lipídica** observada a lo largo del período analizado parece estar directamente relacionada con **la variación en el índice gonadal**, habiéndose encontrado una relación estadísticamente significativa (ver **Tabla 3.2**). Se puede observar que los máximos niveles, tanto para los lípidos peroxidizados como para los lípidos susceptibles de peroxidación, tienen lugar a

principios de la primavera (meses de marzo y abril), aunque en el caso de los lípidos susceptibles de peroxidación los valores más elevados aparecen un poco antes, en el mes de febrero. Este período coincide con el máximo desarrollo gonadal en *P. lividus* y la fase de acumulación de reservas. Por otro lado, también se aprecia un enorme grado de similitud entre el período de desove gonadal y los niveles mínimos de peroxidación lipídica, teniendo ambos lugar durante los meses de verano (de junio a septiembre). Estos hechos observados en las gónadas de *P. lividus* coinciden con los ya apuntados en la glándula digestiva de *M. edulis,* donde se comprobó que el final del período gametogénico en el mejillón (invierno) coincidía con los niveles más altos de MDA; mientras que los niveles mínimos de MDA se alcanzaban en primavera, durante el período de desove (Viarengo *et al*., 1991a). Lukyanova y Kotimchenko (1995), en el estudio que realizaron sobre la variación estacional de la peroxidación lipídica en *Mizuhopecten yessoensis*, profundizan más en esta relación y señalan que otro factor a tener en cuenta sería la inhibición que producen sobre la mitosis los productos de la peroxidación lipídica, ya apuntada por Wilber *et al*. (1957). Según esta teoría, los niveles de LPX y LSPX presentarían los valores más altos justo en aquellos períodos en que hubiera ausencia de actividad mitótica, que coincidirían con la época anterior al desove en los meses de marzo y abril (en el cual las gónadas estarían maduras y llenas de gametos) y la posterior a éste en el mes de octubre (en el cual se produciría la reabsorción del tejido dañado y la formación de nuevas estructuras membranosas).

Otro factor que se ha apuntado como influyente en **la variación estacional de la peroxidación lipídica** ha sido **la composición en ácidos grasos insaturados (PUFA)**, principal sustrato atacado durante el proceso peroxidativo. Dicha composición es dependiente de **la temperatura**, de manera que Naumenko y Kostetsky (1987) comprobaron que, en numerosos invertebrados marinos, la cantidad de PUFA es mayor en los meses de invierno y primavera, cuando las temperaturas son menores, para mantener la fluidez de la membrana. Además, a bajas temperaturas, aumenta la cantidad de oxígeno disuelto en el agua, de manera que es dos veces mayor a -1,8ºC que a 20ºC, lo que puede conllevar una mayor producción de oxirradicales y, por tanto, un mayor daño oxidativo (Viarengo *et al*., 1995). En el presente análisis de las variaciones de los LPX y de los LSPX en

las gónadas de *P. lividus,* no se han determinado los niveles de ácidos grasos, aunque en estudios precedentes en las gónadas de dicho animal se ha demostrado la prevalencia de los ácidos grasos poliinsaturados (44,7%) sobre los saturados (35,0%) y los monoinsaturados (20,3%) (De la Cruz-García *et al.*, 2000), lo cual avalaría la hipótesis que relacionaría el alto contenido en PUFA con niveles altos de peroxidación lipídica e*n P. lividus.* Por otro lado, se han comparado las variaciones de los LPX y de los LSPX en las gónadas de *P.lividus* con las de los de lípidos totales, no habiéndose podido establecer una relación significativa entre ambos parámetros (ver **Tabla 3.2**). Sin embargo, lo que sí se puede verificar es que, efectivamente, los mayores niveles de peroxidación aparecen en los meses de invierno y primavera (entre octubre y mayo), lo que confirmaría la relación entre bajas temperaturas y altos niveles de oxígeno disuelto en agua y alto contenido de lípidos peroxidizados en los organismos marinos.

Además del presente estudio sobre la peroxidación lipídica en las gónadas de *P. lividus*, en un estudio paralelo se han determinado las **variaciones estacionales de algunas enzimas antioxidantes** en el mismo órgano de dicho animal durante el mismo período (Pérez-Trigo *et al*., 1999), como parte de un estudio más completo sobre los mecanismos pro y antioxidantes en este equinodermo. Si comparamos el perfil de los niveles de peroxidación lipídica en las gónadas de *P. lividus* con el obtenido para las enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPX-Se y GPX-total) del mismo tejido de dicho animal, los resultados obtenidos son, en cierto modo, sorprendentes. Así, mientras que la SOD, GPX-Se y GPX-total muestran una pauta de variación estacional similar a la obtenida para la peroxidación lipídica (con máximos a principios de primavera y mínimos a finales del verano), el patrón observado para la CAT es totalmente opuesto: sus valores mínimos son en primavera y hacia finales de verano presenta ya un incremento notable en su actividad. Pero además, varios autores han encontrado una correlación real entre los niveles de peroxidación lipídica y las actividades de las enzimas antioxidantes, demostrando que reducciones en las defensas antioxidantes se correspondían con aumentos del índice de peroxidación en la glándula digestiva de *M. edulis* (Viarengo *et al*., 1991a; Power y Sheehan, 1996). Esto podría explicar los perfiles inversos entre los lípidos peroxidizados y la CAT en las gónadas de *P. lividus* en la primavera, coincidiendo con el período final de

la gametogénesis, donde existen altos niveles de peroxidación lipídica, debido a un descenso en la actividad catalasa, principal enzima antioxidante en dicho organismo. Por el contrario, durante el invierno, la CAT presentaría niveles de máxima actividad, favorecidos por la escasez de alimentos y las bajas temperaturas, reduciéndose los niveles de peroxidación lipídica. Respecto al resto de enzimas antioxidantes (SOD, GPX-Se y GPX-total), mostrarían una variabilidad interanual similar a la de los lípidos peroxidizados, indicando este hecho que sólo contribuirían en pequeña medida a la eliminación de los agentes causantes del daño oxidativo. Esta hipótesis viene apoyada por los elevados niveles que presenta la CAT en las gónadas de este equinodermo, del orden de 400 veces superiores a los observados en el hepatopáncreas del cangrejo *Carcinus maenas* (Pérez-Trigo *et al.*, 1999).

Respecto a **la variación estacional de los lípidos que han sufrido peroxidación en el contenido digestivo** de *P. lividus*, presenta un perfil similar a la variación estacional de los LPX encontrada en las gónadas de dicho animal, con valores máximos entre marzo y abril y mínimos en agosto, aunque en el contenido digestivo dicha variación no es tan clara como en el caso de las gónadas. La relación entre los D-LPX y el índice gonadal no se ha podido demostrar, con lo que no está claro que el ciclo gonadal influya sobre los niveles de lípidos peroxidizados en el digestivo puesto que, según se vio en el **capítulo 2**, aparentemente no existe ningún trasvase de nutrientes entre las gónadas y el contenido digestivo en *P. lividus*.

Las causas de dicha variación estacional de los D-LPX en *P. lividus* serían, más probablemente, **las variaciones en el contenido de los PUFA en los lípidos de membrana y en las actividades de las enzimas antioxidantes** en dicho tejido a lo largo del año, tal y como ya ha sido enunciado anteriormente para el erizo *Strongylocentrotus intermedius* (Lukyanova y Khotimchenko, 1995). Así, por un lado, en el presente estudio se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa entre lípidos totales y lípidos peroxidizados del digestivo y, por otro, en estudios paralelos realizados se ha demostrado la existencia de variación estacional en las enzimas antioxidantes del contenido digestivo de *P. lividus*

(datos no publicados), todo lo cual confirmaría la hipótesis anteriormente enunciada.

3.4.3 Influencia *in vitro* de los metales pesados en la peroxidación lipídica

En la **Tabla 3.II**, se realiza un análisis comparativo de los principales estudios realizados sobre la influencia de los metales pesados en la peroxidación lipídica de distintas especies de organismos acuáticos.

3.4.3.1 Influencia del cobre (II)

En estudios previos realizados sobre la influencia del cobre en la peroxidación lipídica, este metal producía en la mayoría de los casos un efecto claramente estimulador sobre dicho fenómeno. Este hecho fue comprobado tanto en invertebrados marinos (Roméo y Gnassia-Barelli, 1997), como en peces (Radi y Matkovics, 1988) y atribuido al papel catalizador de dicho metal en la formación de oxirradicales, que conduciría a la estimulación de la peroxidación lipídica.

Este efecto estimulador de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados por parte de ciertos metales de transición, como el hierro y cobre, ha sido ampliamente estudiado (Arasu y Reddy, 1995). En particular, se ha demostrado que los iones cuprosos reaccionan con el peróxido de hidrógeno en una proporción mucho más alta que los iones ferrosos, produciendo el radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton:

$$Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{+2} + OH^{\bullet} + OH^{-} \qquad \textbf{(i)}$$

Asimismo, se piensa que tiene lugar una reacción similar en presencia de los hidroperóxidos orgánicos (ROOH), formándose los radicales peroxilo ($ROO^{\bullet}$) y alcoxilo ($RO^{\bullet}$), mucho más reactivos que los primeros:

$$ROOH + Cu^{+2} \longrightarrow ROO^{\bullet} + Cu^{+} + H^{+} \qquad \textbf{(j)}$$

$$ROOH + Cu^{+} \longrightarrow RO^{\bullet} + Cu^{+2} + OH^{-} \qquad \textbf{(k)}$$

Especie	Metal pesado	Tratamiento	Influencia en perox. lipídica	Cita
Cyprinus carpio	Cu^{+2}	*In vivo* (24 horas). 0-50 ppm en agua.	Hígado: ↑ Branquias: ↑ Músculo: ↑	Radi y Matkovics (1988)
Heteropneustes fossilis	Hg^{+2}	*In vivo* (10-30 días). 0,2 µg/ml en agua.	Cerebro: ↑ Hígado: ↑ Riñón: ↑ Músculo: ↑	Bano y Hassan (1989)
Mugil cephalus	Hg^{+2}	*In vitro.* 25 µM en medio.	Microsomas hepáticos: ↓	Wofford y Thomas (1988)
Brachydanio rerio	Pb^{+2}	*In vitro.* 10-3000 mg/l en medio.	Animal entero: =	Labrot *et al*. (1996)
Mytilus galloprovincialis	Cu^{+2} Cd^{+2}	*In vivo* (1-7 días). 0,25 mg/l (Cu) y 0,5 mg/l (Cd) en agua.	Gl. digestiva: ↑ (Cu), = (Cd). Branquias: ↑ (Cu), = (Cd).	Viarengo *et al*. (1990)
Ruditapes decussatus	Cu^{+2} Cd^{+2} Hg^{+2}	*In vitro.* 6,25-25 µg/ml (Cu); 5-500 µg/ml (Cd) y 0,005-5 µg/ml (Hg) en medio.	Gl. digestiva: ↑ (Cu, Hg), = (Cd). Branquias: ↑ (Cu, Hg), = (Cd).	Roméo y Gnassia-Barelli (1997)
Corbicula sp.	Pb^{+2}	*In vitro.* 0-3000 mg/l en medio.	Animal entero: =	Labrot *et al*. (1996)
Macrobrachium rosenbergii	Cu^{+2} Cd^{+2}	*In vitro.* 100-2000 µM(Cu) y 100-2000 µM (Cd) en medio.	Hepatopáncreas: ↓ (Cu), ↑ (Cd). Branquias: ↓ (Cu), ↑ (Cd).	Dandapat *et al*. (1999)
Paracentrotus lividus	Cu^{+2} Cd^{+2} Hg^{+2} Pb^{+2}	*In vitro.* 3,12-50 µg/ml (Cu); 5-1000 µg/ml (Cd); 25-200 µg/ml(Hg) y 500-3000 µg/ml(Pb) en medio.	Gónadas: ↓ (Cu, Hg), = (Cd, Pb).	Presente estudio

Tabla 3.II. Tabla comparativa de los efectos de los **metales pesados** (Cu=cobre, Cd=cadmio, Hg=mercurio y Pb=plomo) sobre la **peroxidación lipídica** (↑: aumento, =: no afecta, ↓: disminución) en distintas especies de **organismos acuáticos**.

Sin embargo, en el presente estudio se observa un efecto claramente inhibitorio del cobre, lo cual no coincide con la mayoría de los estudios previamente realizados. Posthuma y van Straalen (1993) observaron dicho efecto inhibitorio en invertebrados terrestres, que atribuían a mecanismos de adaptación en los invertebrados frente a exposiciones de metales, tales y como serían una estabilización de las membranas y, por tanto, una menor sensibilidad al daño

inducido por metales, o un aumento del metabolismo destructivo de los peróxidos lipídicos, debido quizá a la estimulación de las defensas antioxidantes. Así, por ejemplo, se ha demostrado el papel claramente protector del glutatión reducido, un antioxidante no enzimático, frente al daño oxidativo del cobre sobre el ADN y que se atribuiría a su capacidad para estabilizar el cobre en el estado de oxidación de Cu (I), lo que paralizaría el ciclo redox y la formación de oxirradicales (Milne *et al*., 1993). Por tanto, se hace necesario comprobar esta hipótesis en estudios complementarios sobre dichas defensas antioxidantes en *P. lividus.*

Otra posible causa de dicha inhibición de la peroxidación lipídica por parte del cobre ha sido apuntada recientemente por Ringwood *et al.* (1998), que evaluaron el efecto *in vivo* de dicho metal sobre los niveles de peroxidación lipídica y sobre las metalotioneínas dependientes de cobre en la ostra *Crassostrea virginica*, comprobando que la inducción de estas últimas con concentraciones altas de cobre llevaba asociada una inhibición del fenómeno peroxidativo. Anteriormente, Arasu y Reddy (1995) ya habían sugerido la posible importancia de las metalotioneínas y de la lipofuscina en la eliminación del cobre en el bivalvo *Perna viridis,* puesto que ambos compuestos formarían complejos insolubles con dicho metal, que serían fácilmente eliminables de la célula por exocitosis.

Por tanto, las metalotioneínas podrían actuar como un mecanismo compensatorio a corto plazo para aminorar los efectos adversos provocados por el cobre en las gónadas de *P. lividus*, entre los cuales se encontraría la peroxidación lipídica. Queda demostrada la capacidad del cobre (II) para inhibir *in vitro* la peroxidación lipídica en las gónadas de *P. lividus*, siendo esta apreciable ya a concentraciones de este metal de 3,125 µg/ml, por lo que parece ser *in vitro* un biomarcador bastante sensible de la presencia de Cu (II) en el medio.

3.4.3.2 Influencia del cadmio

Para el caso del cadmio, se observa un mantenimiento de los niveles de peroxidación lipídica en las gónadas de *P. lividus*, que en el caso de los LPX varían entre 927,66 y 851,66 nmoles de MDA/g tejido fresco y en el de los LSPX entre 1644,66 y 1471,11 nmoles de MDA/g tejido fresco. Estos resultados coinciden con los observados *in vivo* por Viarengo *et al.* (1990) para branquias y

glándula digestiva de *M. edulis* y los medidos *in vitro* para los mismos tejidos de *R. decussatus* por Roméo y Gnassia-Barelli (1997). Este hecho podría explicarse porque el cadmio es un metal que no interviene en el ciclo redox de formación de oxirradicales y, por tanto, no parece ejercer ningún efecto sobre la peroxidación lipídica (Viarengo *et al*., 1990).

Chelomin y Belcheva (1992) apuntaron en el molusco bivalvo *Mizuhopecten yessoensis* otra posible causa de este mantenimiento de los niveles de peroxidación lipídica en presencia del cadmio, que sería el papel desintoxicante ejercido por las metalotioneínas dependientes de cadmio. Por otro lado, Tort *et al.* (1996) relacionaron esta falta de estimulación del fenómeno peroxidativo del cadmio con dos factores: por una parte, el ya citado anteriormente (la presencia de metalotioneínas) y, por otra, el posible papel antioxidante del GSH, que se uniría a dicho metal a través de un enlace tiolato. En cualquier caso, a diferencia del cobre, las metalotioneínas no formarían complejos insolubles con el cadmio ni serían eliminadas de la célula por exocitosis, por lo que la vida media del cadmio en la célula sería mucho más larga que la del cobre (6 meses frente a 20 días) (Arasu y Reddy, 1995). Por todo ello, la ausencia de variaciones significativas en los niveles de peroxidación lipídica por la presencia *in vitro* de cadmio en las gónadas de *P. lividus* parece estar causada por la presencia de unos sistemas efectivos de defensa antioxidante frente a la contaminación por dicho metal.

3.4.3.3 Influencia del mercurio (II)

El efecto del mercurio sobre la peroxidación lipídica no está muy claro, tal y como se deduce de los estudios que se han realizado hasta la fecha. Así, mientras se produjo un incremento de la peroxidación basal en los distintos tejidos del pez *Heteropneustes fossilis* tras la exposición *in vivo* a 0,2 μg/ml de $HgCl_2$ durante 10, 20 y 30 días (Bano y Hassan, 1989), en microsomas hepáticos de *Mugil cephalus* y *Micropogonias undulatus* tratados con 25 μM de $HgCl_2$ la peroxidación lipídica disminuyó (Wofford y Thomas, 1988). En el caso de la almeja *R. decussatus*, se observó un incremento de la peroxidación basal, mientras que la peroxidación estimulada permaneció constante (Roméo y Gnassia-Barelli, 1997).

Una posible explicación del efecto inhibitorio del mercurio lo apuntaron Wofford y Thomas (1988), atribuyéndolo a la diferente biodisponibilidad de este metal respecto a las enzimas microsomales en las distintas especies. Así, en los hepatocitos de rata la concentración intracelular de mercurio era mucho menor que la concentración del medio de incubación, lo que evitaba la inactivación de los enzimas microsomales, que sí tenía lugar en los microsomas hepáticos del pez *M. cephalus*. Además, es posible que existan otros productos de la peroxidación lipídica que no son determinados con el método utilizado (como puede ser la formación de gránulos de lipofuscina) y que sí estén aumentados en presencia del mercurio, tal y como ya enunciaron Roméo y Gnassia-Barelli (1997).

Por otra parte, al igual que en el caso de otros metales pesados, el mercurio también posee la capacidad de unirse a grupos tiol. Se ha demostrado la inducción de la formación de metalotioneínas en animales expuestos a mercurio, frente a las cuales presenta una alta afinidad (Viarengo, 1989), así como la influencia que ejerce el mercurio sobre los niveles de GSH intracelular, formando complejos muy estables con el glutatión reducido, que actúa como antioxidante (Christie y Costa, 1984).

En el presente estudio, el efecto *in vitro* de este metal sobre la peroxidación lipídica en las gónadas de *P. lividus* es claramente inhibitorio, tanto para los lípidos peroxidizados como para los susceptibles de peroxidación, alcanzándose unos niveles mínimos con una concentración de mercurio de 200 μg/ml y siendo las causas más probables de dicho fenómeno un posible efecto protector de las metalotioneínas y del GSH así como diferencias en cuanto a la biodisponibilidad de las enzimas microsomales frente a dicho metal.

3.4.3.4 Influencia del plomo (II)

No se producen cambios significativos en la peroxidación lipídica en las gónadas de *P. lividus* por la adición *in vitro* de plomo, oscilando los valores entre 896,01 y 760,62 nmoles de MDA/g tejido fresco en el caso de los LPX y entre 1087,69 y 907,32 nmoles de MDA/g tejido fresco en el caso de los LSPX. Labrot *et al.* (1996) observaron un fenómeno similar *in vitro* en el molusco *Corbicula* sp. y en el pez *Brachydanio rerio*, atribuyéndolo al hecho de que el plomo no parecía

inducir la formación de EROs y, por tanto, tampoco el fenómeno peroxidativo, como ya ha sido apuntado previamente para el caso del cadmio. Las causas de la toxicidad del plomo serían otras, tales como su capacidad de formar complejos con compuestos fosforilados y con los grupos tiol de las enzimas (Alcutt y Pinto, 1994).

Los principales mecanismos de defensa de los organismos frente a este metal que se citan en la bibliografía son diversos. Por un lado, se ha propuesto la compartimentalización de los ligandos metálicos en vesículas lisosomales (George *et al*., 1978). Por otro lado, se ha descrito la existencia de metalotioneínas ricas en cisteína y de GSH, capaces de unirse con el plomo a través del grupo -SH (Alcutt y Pinto, 1994). Asimismo, el α-tocoferol podría tener un papel destacado en la eliminación del plomo por los organismos vivos (Shafiq-ur-Rehman *et al.*, 1995). Por todo ello, parece posible que en las gónadas de *P. lividus* exista un mecanismo de defensa efectivo frente a la toxicidad asociada al plomo, lo que explicaría la ausencia de variaciones en la peroxidación lipídica en presencia de dicho metal.

3.4.4 Influencia *in vitro* de los xenobióticos en la peroxidación lipídica

Algunos de los principales xenobióticos empleados en los estudios de inducción de peroxidación lipídica, tales como el benzo(a)pireno o la nitrofurantoína, no fueron usados en el presente estudio, debido a que, por su escasa solubilidad en agua, los disolventes orgánicos que era necesario emplear interferían en las medidas de los lípidos peroxidizados.

En la **Tabla 3.III**, se realiza un análisis comparativo de los principales estudios realizados sobre la influencia de los xenobióticos en la peroxidación lipídica de distintas especies de organismos acuáticos.

3.4.4.1 Influencia de la menadiona

La menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) ha sido ampliamente estudiada como compuesto quinónico modelo que participa en el ciclo redox mediado por reductasas del sistema MFO, dando lugar a la formación de EROs en los microsomas de la glándula digestiva de *M. edulis* (Kappus, 1986; Livingstone y den Besten, 1989). Como consecuencia de dicho fenómeno, incrementa el daño en

las membranas biológicas, que en los mejillones son ricas en PUFA (Ribera *et al*., 1989).

Especie	Xenob	Tratamiento	Influencia en perox. lipídica	Cita
Cyprinus carpio	PQ	*In vivo* (4-96 horas). 10 ppm en agua.	Eritrocitos: =	Matkovics *et al*. (1987)
Cyprinus carpio	PQ	*In vivo* (4-96 horas). 10 ppm en agua.	Eritrocitos: ↑	Gabryelak y Klekot (1985)
Geunkensia demissa	PQ	*In vivo* (6-36 horas). 0,5-2 µM en agua.	Hepatopáncreas: ↑	Wenning *et al*. (1988)
Mytilus edulis	MD	*In vivo* (2-19 días). 1 ppm en agua.	Gl. digestiva: ↓ Branquias: ↓ Resto: ↓	Ribera *et al*. (1991)
Mytilus edulis	MD	*In vivo* (2-19 días). 1 ppm en agua.	Gl. digestiva: ↓	Livingstone *et al.* (1990b)
Paracentrotus lividus	MD PQ	*In vitro*. 125-500 µM(MD) y 250-2000 µM (PQ) en medio.	Gónadas: ↓ (MD), = (PQ).	Presente estudio

Tabla 3.III. Tabla comparativa de los efectos de los **xenobióticos** (MD=menadiona y PQ=paraquat) sobre la **peroxidación lipídica** (↑: aumento, =: no afecta, ↓: disminución) en distintas especies de **organismos acuáticos**.

Sin embargo, la influencia de este compuesto sobre la peroxidación lipídica no está tan clara: en un experimento realizado por Livingstone *et al.* (1990b) donde se realizó una exposición *in vivo* de 1 ppm de menadiona a *M. edulis*, los resultados reflejaron que sólo se producía una inducción del fenómeno peroxidativo en el segundo día para los lípidos peroxidizados, pero al aumentar el tiempo de exposición o al medir los lípidos susceptibles de peroxidación, el efecto observado era claramente inhibitorio. Esta influencia negativa sobre la peroxidación fue atribuída a varias causas: en primer lugar, a la presencia de unas defensas antioxidantes efectivas capaces de combatir los aumentos en la producción de oxirradicales y, además, a la posible existencia de otros productos del estrés oxidativo que pueden formarse y que no son determinados con el método utilizado.

Otros posibles factores causantes de la disminución de la peroxidación lipídica por efecto de la menadiona fueron enunciados por Ribera *et al.* (1991),

que la atribuía, primeramente, a la pérdida de material lipídico en el desove provocado por la administración *in vivo* de dicho compuesto, aunque en este caso, al ser un estudio *in vitro*, esta explicación ha quedado descartada. Dichos autores también relacionaban el descenso en los niveles de peroxidación lipídica como consecuencia de la administración de menadiona con la disminución del glutatión reducido (GSH), un antioxidante no enzimático que actúa como molécula "scavenger" frente a compuestos que intervienen en el ciclo redox, tales como las quinonas.

Por último, cabe destacar la existencia de estudios que atribuyen a la menadiona un papel como compuesto antioxidante, recibiendo el nombre de vitamina K_3, y que explicarían su mecanismo de acción por el papel que desempeñaría su especie radicalar (el radical semiquinona) como captadora de algunas de las especies que intervienen en la fase de propagación del proceso peroxidativo (Dicker y Cederbaum, 1991).

En el caso de las gónadas de *P. lividus*, se observa que el efecto de concentraciones crecientes de menadiona sobre los lípidos peroxidizados es inhibitorio, produciéndose una reducción de hasta un 74% sobre los valores del control con una concentración de 500 μM de menadiona. Por tanto, posibles explicaciones de este fenómeno serían, por un lado, una participación efectiva de las defensas antioxidantes en la eliminación de las EROs creadas en presencia de este compuesto y, por otro, un posible papel antioxidante de la menadiona en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*. En cualquier caso, estas hipótesis deberán ser confirmadas en el estudio paralelo que se está realizando sobre defensas antioxidantes.

3.4.4.2 Influencia del paraquat

Otro importante xenobiótico orgánico implicado en el ciclo redox y en la generación de oxirradicales es el paraquat (dicloruro de 1,1´-dimetil-4,4´-bipiridilo). El efecto de dicho compuesto en organismos vivos es variable. Así, mientras que Gabryelak y Klekot (1985) observaron un efecto inductor de la peroxidación lipídica en los eritrocitos de las carpas *Cyprinus carpio* y *Carrasius*

carrasius, Matkovics *et al.* (1987) no detectaron un efecto claro del paraquat sobre el fenómeno peroxidativo en *Cyprinus carpio*.

En invertebrados, existe un estudio realizado por Wenning *et al.* (1988), en el cual se exponía a distintas concentraciones de paraquat al mejillón *Geukensia demissa*, observándose una clara inducción de la peroxidación lipídica para los distintos tiempos de exposición, demostrando así la activación del ciclo redox en estos organismos por medio de este compuesto bipiridílico. Sin embargo, en otro trabajo llevado a cabo por Allen *et al.* (1984) en el insecto *Musca domestica,* se constataba la ausencia de relación entre la concentración de paraquat y la formación de lípidos peroxidizados, lo cual se explicaría por la capacidad de dicho compuesto para captar los electrones implicados en el proceso peroxidativo. Esta hipótesis también fue avalada por Puntarulo y Cederbaum (1989), que no observaron ningún aumento apreciable en la cantidad de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs) en presencia de paraquat y que lo atribuyeron igualmente al posible efecto de bloqueo de dicho compuesto sobre la fase de propagación de la peroxidación lipídica.

Por otro lado, también se ha observado en la glándula digestiva del mejillón *G. demissa* un efecto del paraquat sobre las defensas antioxidantes, tanto de naturaleza enzimática (CAT, SOD y GPX) como no enzimática (GSH), al igual que ya se demostró en el caso de la MD. Según Wenning *et al.* (1988), en dicho animal la SOD se vería aumentada en presencia de paraquat, por la mayor cantidad de O_2^- que sería necesario eliminar. El exceso de H_2O_2 producido sería neutralizado por la CAT. Por otro lado, el GSH proporcionaría los equivalentes redox necesarios para compensar la pérdida de NADPH generada por efecto del paraquat.

En el presente estudio los niveles de lípidos peroxidizados en las gónadas de *P. lividus* no sufren variaciones significativas por efecto del paraquat (1052,71-915,78 nmoles de MDA/g tejido fresco), lo que nos indica que quizás estos animales no sean capaces de activar el ciclo redox en presencia de este compuesto y que, posiblemente, exista un papel fundamental de las defensas antioxidantes en la neutralización del efecto de este bipiridilo sobre la peroxidación lipídica.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

4. ESTUDIO DE LAS ENZIMAS REDUCTASAS ASOCIADAS AL SISTEMA MFO

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 Metabolismo oxidativo de fase I, II y III

Todos los organismos vivos, con el fin de defenderse frente a los xenobióticos poseen una serie de sistemas enzimáticos, cuya función principal es modificar la estructura de estos compuestos, favoreciendo así su eliminación. Dentro de dichos sistemas existen tres grupos principales, según Parant (1998):

***Sistemas enzimáticos de fase I:** Su papel principal es convertir a los xenobióticos en especies más reactivas y, por tanto, más susceptibles a entrar en las rutas metabólicas. En la mayoría de los casos, este objetivo lo consiguen con la introducción de un átomo de oxígeno en la molécula del xenobiótico. Dentro de este grupo destacan las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 y las dependientes de flavina.

***Sistemas enzimáticos de fase II:** Su papel principal consiste en aumentar la solubilidad de los xenobióticos y, por tanto, favorecer su excreción al medio externo. Normalmente, actúan sobre sustancias que han sido modificadas por el metabolismo de fase I, conjugándolas con pequeñas moléculas de naturaleza hidrosoluble, tales como el ácido glucurónico, el glutatión o el sulfato. Dentro de esta categoría se incluyen las glutatión S-transferasas (GST), las UDP-glucuronosil transferasas (UGT) y las epóxido hidrolasas (EH).

***Sistemas enzimáticos de fase III:** Son proteínas de membrana encargadas de expulsar de la célula los xenobióticos previamente modificados por las enzimas de la fase I y/o de la fase II. Estas reacciones se llevan a cabo a través de un mecanismo dependiente de ATP y el principal exponente de este grupo es la proteína MRP (multidrug resistance related protein).

4.1.2 Estructura y función del sistema MFO

El sistema MFO (monoxigenasa de función mixta) es un sistema enzimático muy importante dentro de los que pertenecen a la fase I. Cataliza el proceso denominado **"hidroxilación oxidativa"**, que consiste en una serie de reacciones redox en las cuales un átomo de la molécula de oxígeno se incorpora a un sustrato (que puede ser de naturaleza endógena o exógena) formando un grupo hidroxilo, mientras que el otro átomo de oxígeno se reduce a agua:

$$R + O_2 + NAD(P)H + H^+ \rightarrow R\text{-}OH + H_2O + NAD(P)^+ \qquad \textbf{(a)}$$

Aunque el fundamento de la reacción de monooxigenación es el mismo en todos los casos, existen diferencias dependiendo de la naturaleza del sustrato y del producto. Los sustratos pueden ser de naturaleza endógena (hormonas esteroideas, vitaminas o ácidos biliares) o exógena (drogas, insecticidas o hidrocarburos aromáticos policíclicos). Las principales reacciones catalizadas por el sistema MFO sobre sustratos exógenos se muestran en la **Tabla 4.I**:

Epoxidación e hidroxilación aromáticas (p.e., benzo(a)pireno y otros PAHs)
Hidroxilación alifática (p.e., n-propilbenceno)
N-desalquilación (p.e., aminopirina y etilmorfina)
O-desalquilación (p.e., 7-etoxirresorufina y 7-etoxicumarina)
S-desalquilación (p.e., algunos tioéteres como el mercaptano)
N-oxidación (p.e., anilina y anfetamina)
S-oxidación (p.e., tioéteres en general e insecticidas)
P-oxidación (p.e., fosfinas trisustituídas)
Desulfuración y ruptura de enlaces éster (p.e., paratión e insecticidas)
Desaminación oxidativa
Deshalogenación oxidativa
Deshalogenación reductora

Tabla 4.I. Reacciones catalizadas por el **sistema MFO** sobre **sustratos exógenos** (Goksoyr y Förlin, 1992).

Los principales componentes de este complejo multienzimático de transporte de electrones, según aparece recogido en García de la Parra (1998), son:

*La **NADPH-citocromo P450 reductasa (E.C. 1.6.2.4)**:

Es una flavoproteína de 78 KD formada por un mol de FAD (flavín adenín dinucleótido) y un mol de FMN (flavín mononucleótido) por cada mol de apoproteína. Se encuentra localizada en el retículo endoplasmático y es la enzima responsable de la transferencia de electrones desde el NADPH a los citocromos P450 y b_5, así como a aceptores artificiales de electrones, tales como el citocromo c, el ferricianuro y el diclorofenolindofenol (Strobel y Dignam, 1978). Posee la capacidad de aceptar los electrones de dos en dos y cederlos al citocromo P450 de uno en uno.

*El **citocromo P450**:

Es una hemoproteína que tiene como grupo prostético una protoporfirina IX con un átomo de hierro central, que actúa como centro catalítico, ya que es el que se oxida y se reduce cíclicamente para aceptar los electrones cedidos por la citocromo P450 reductasa (ver **Fig. 4.I**). El nombre de citocromo P450 se debe al pico máximo de absorción que presenta su forma reducida (Fe^{+2}) cuando está ligada al CO (monóxido de carbono) y que aparece a una longitud de onda de 450 nm. Existen numerosas isoenzimas de este citocromo, lo que hace que su peso molecular varíe entre los 43 y los 600 KD, y para diferenciarlas es necesario recurrir a la biología molecular y a la inmunología. Su función es la de actuar como oxidasa terminal en la cadena de transporte electrónico.

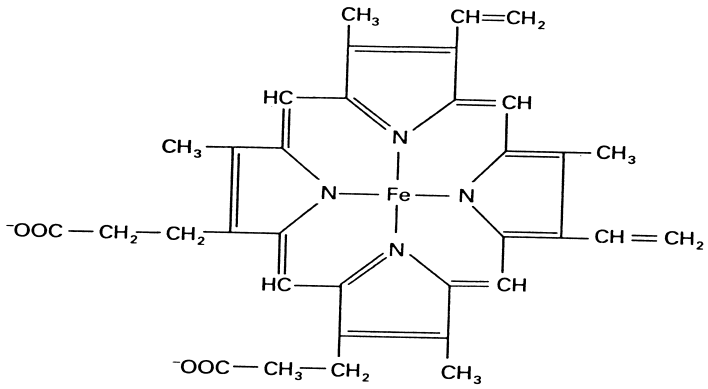


Fig. 4.I. Esquema de la **Fe-protoporfirina IX** del grupo prostético del **citocromo P450**.

*La **NADH-citocromo b_5 reductasa (E.C. 1.6.2.2)**:

Es una flavoproteína que interviene en la reducción del citocromo b_5 por medio de la transferencia de electrones desde el NADH. Su peso molecular es de unos 33 KD y aparece fuertemente unida a la membrana del retículo endoplasmático (microsomas) y, posiblemente, también a la membrana mitocondrial externa. Se han descrito varios aceptores artificiales de los electrones que cede esta enzima, tales como el ferricianuro, el diclorofenolindofenol y el citocromo c, que pueden ser usados como sustratos para medir su actividad enzimática (Mihara y Sato, 1978).

*El **citocromo b_5**:

Es una hemoproteína de unos 16 KD con dos partes principales: una hidrófila, que contiene un grupo hemo con actividad redox, y otra hidrófoba, que

está unida a la membrana biológica, estando ambas partes conectadas por una cadena polipeptídica flexible de unos 15 aminoácidos. Está presente tanto en el retículo endoplasmático como en la membrana mitocondrial, siendo su localización dentro de la membrana más interna que la de los otros componentes del sistema MFO. Puede ser reducida por dos flavoproteínas microsomales, la NADPH-citocromo P450 reductasa y la NADH-citocromo b_5 reductasa. Normalmente actúa como intermediaria en los procesos de insaturación de los ácidos grasos, esteroles y prostaglandinas y, a veces, puede desempeñar el papel de donadora de electrones al citocromo P450 y aceptora de electrones procedentes de la NADH-citocromo b_5 reductasa (Solé, 1992).

La principal localización subcelular del sistema MFO es, por tanto, el retículo endoplasmático, aunque también está presente en las mitocondrias y en la membrana nuclear. En la **Fig. 4.II** se muestra un esquema de la ultraestructura del sistema de la monooxigenasa de función mixta en el retículo endoplasmático:

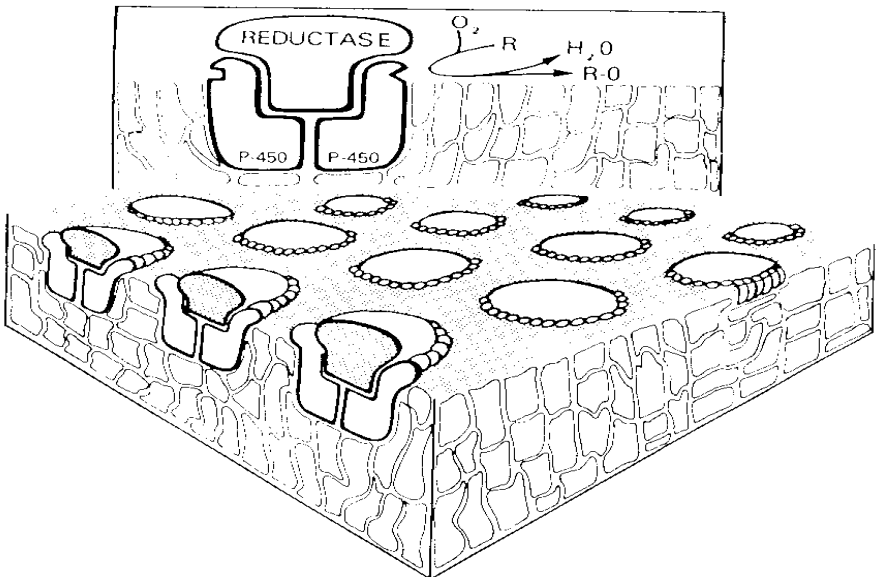


Fig. 4.II. Esquema de la ultraestructura del **sistema MFO** en la membrana del **retículo endoplasmático** (Nebert y Gonzalez, 1987).

Para explicar el mecanismo de reacción del sistema MFO se ha descrito **un ciclo catalítico**, según se observa en la **Fig. 4.III,** que consta de siete etapas:

(1) Se produce la unión del xenobiótico (RH) a la forma oxidada del citocromo P450 (Fe^{+3}), formándose el complejo RH-cit. P450 (Fe^{+3}).

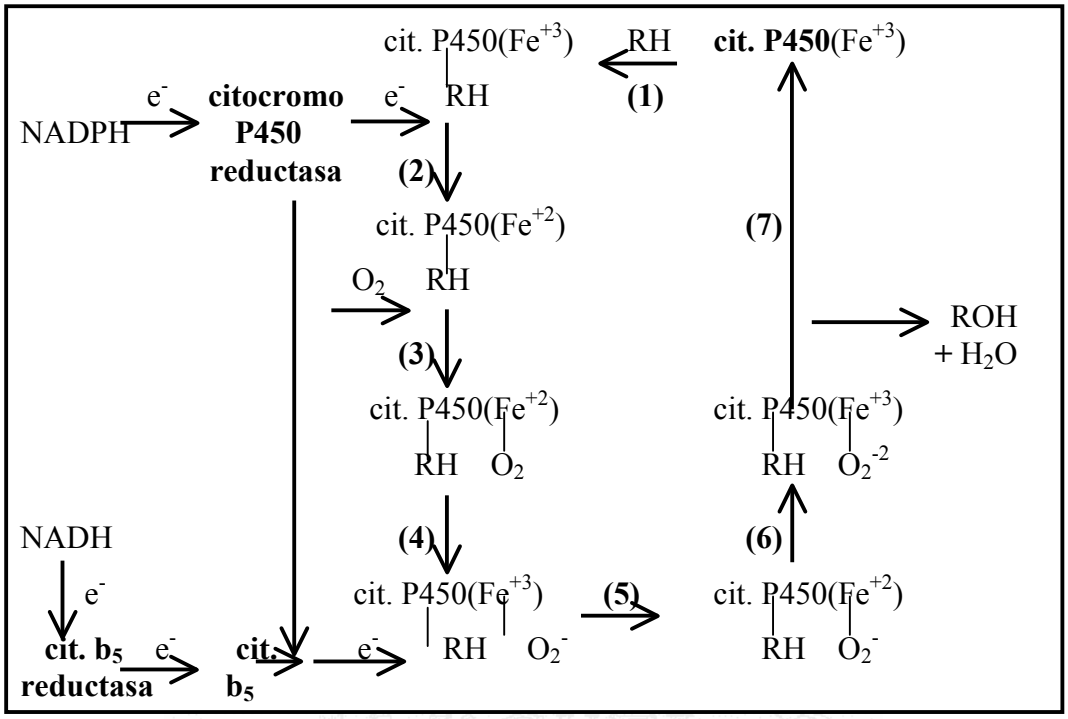


Fig. 4.III. Esquema del **ciclo catalítico** del **sistema MFO** (adaptado de Gibson y Skeet, 1986).

(2) Se lleva a cabo el paso del complejo RH-cit. P450 a su forma reducida (Fe^{+2}), siendo este primer electrón proporcionado por la NADPH-citocromo P450 reductasa.

(3) Es el momento en que el oxígeno molecular (O_2) se une al complejo con el Fe^{+2}, formándose un nuevo complejo entre el RH-cit. P450(Fe^{+2}) y el O_2.

(4) Se produce un reordenamiento de los electrones del complejo, que hace que el hierro se vuelva a oxidar nuevamente a Fe^{+3} y que el oxígeno molecular pase a radical anión superóxido (O_2^-), para favorecer la entrada del segundo electrón del proceso catalítico.

(5) Entra el segundo electrón al complejo RH-cit. P450 (Fe^{+3})-O_2^-, lo que hace que el hierro se reduzca de nuevo a Fe^{+2}, siendo este segundo electrón aportado bien por la NADPH-citocromo P450 reductasa o bien por la NADH-citocromo b_5 reductasa en colaboración con el citocromo b_5.

(6 y **7)** Se produce un reordenamiento electrónico dentro del complejo, así como la adición del oxígeno al sustrato, dando lugar a un producto final hidroxilado (R-OH) y a la liberación de una molécula de agua, volviendo el citocromo P450 a su estado inicial (Fe^{+3}).

4.1.3 El sistema MFO como biomarcador de contaminación

El sistema MFO interviene, en muchos casos, en la primera etapa del metabolismo de algunos contaminantes orgánicos dentro de los organismos vivos y, además, puede participar en la generación de oxirradicales (Solé *et al*., 1995). Por dicha razón se considera, junto con las metalotioneínas, como un **biomarcador de exposición a contaminantes**. Se ha demostrado la presencia de actividad enzimática asociada al sistema MFO tanto en peces (Beyer y Goksoyr, 1993) como en invertebrados marinos (Livingstone y Farrar, 1984; Den Besten *et al*., 1990). Asimismo, se ha comprobado que se pueden producir variaciones en dicha actividad dependiendo de factores tales como la edad de los individuos analizados o la época del año (Livingstone *et al*., 1989b; Weinstein, 1995).

En resumen, el sistema MFO generalmente se ha considerado un buen índice para determinar la presencia de contaminantes orgánicos en el medio, tales como los PAHs o los PCBs, ya que en numerosos organismos se induce por efecto de dichos contaminantes (Narbonne *et al*., 1991; Solé *et al*., 1996). Sin embargo, también se ha demostrado que altos niveles de metales pesados en un medio contaminado con hidrocarburos alteran la medida de la actividad del sistema MFO, siendo en este caso necesaria la evaluación de otros biomarcadores (Roméo *et al*., 1994).

4.1.4 Objetivos del presente capítulo

En vista de lo enunciado anteriormente y ante la escasez de estudios referidos al sistema MFO y a su posible uso como biomarcador en equinodermos, se plantearon los siguientes objetivos en el presente capítulo:

- Realización de un estudio de **la distribución tisular y subcelular** y de **la variación estacional de las actividades de algunas enzimas reductasas asociadas al sistema MFO** en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*.

- Evaluación de **la posible influencia *in vitro* de contaminantes** (tanto metales pesados como compuestos orgánicos) sobre dichos parámetros, para posteriormente analizar **su uso potencial como biomarcadores de contaminación**.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Preparación de las fracciones subcelulares

Las fracciones subcelulares se preparan según el procedimiento descrito por Livingstone y Farrar (1984).

La muestra se homogeneiza en una proporción 1:4 P/V (peso del tejido: volumen del tampón) en una disolución 20 mM de Tris-ClH pH 7,6 que contiene sacarosa 0,5 M, KCl 0,15 M y EDTA 1 mM (ácido etilendiaminotetraacético). Todas las preparaciones se llevan a cabo a 4ºC.

El homogeneizado se centrifuga tres veces para conseguir la fracción mitocondrial (500-12.000 *g*), la citosólica (sobrenadante de 100.000 *g*) y la microsomal (12.000-100.000 *g*). Los precipitados finales mitocondrial y microsomal se resuspenden, respectivamente, en el tampón de homogeneización y en una disolución 20 mM de Tris-ClH pH 7,6 que contiene glicerol del 20% P/V y EDTA 1 mM, en la proporción de 0,5 ml de tampón por 1,0 g de peso de tejido húmedo.

Las fracciones subcelulares para llevar a cabo los ensayos enzimáticos se usan inmediatamente (en el caso de las NADPH-reductasas) o se congelan a -20ºC durante 3 días (en el caso de las NADH-reductasas).

Todo el proceso de preparación de las fracciones subcelulares se describe en la **Fig. 4.IV**:

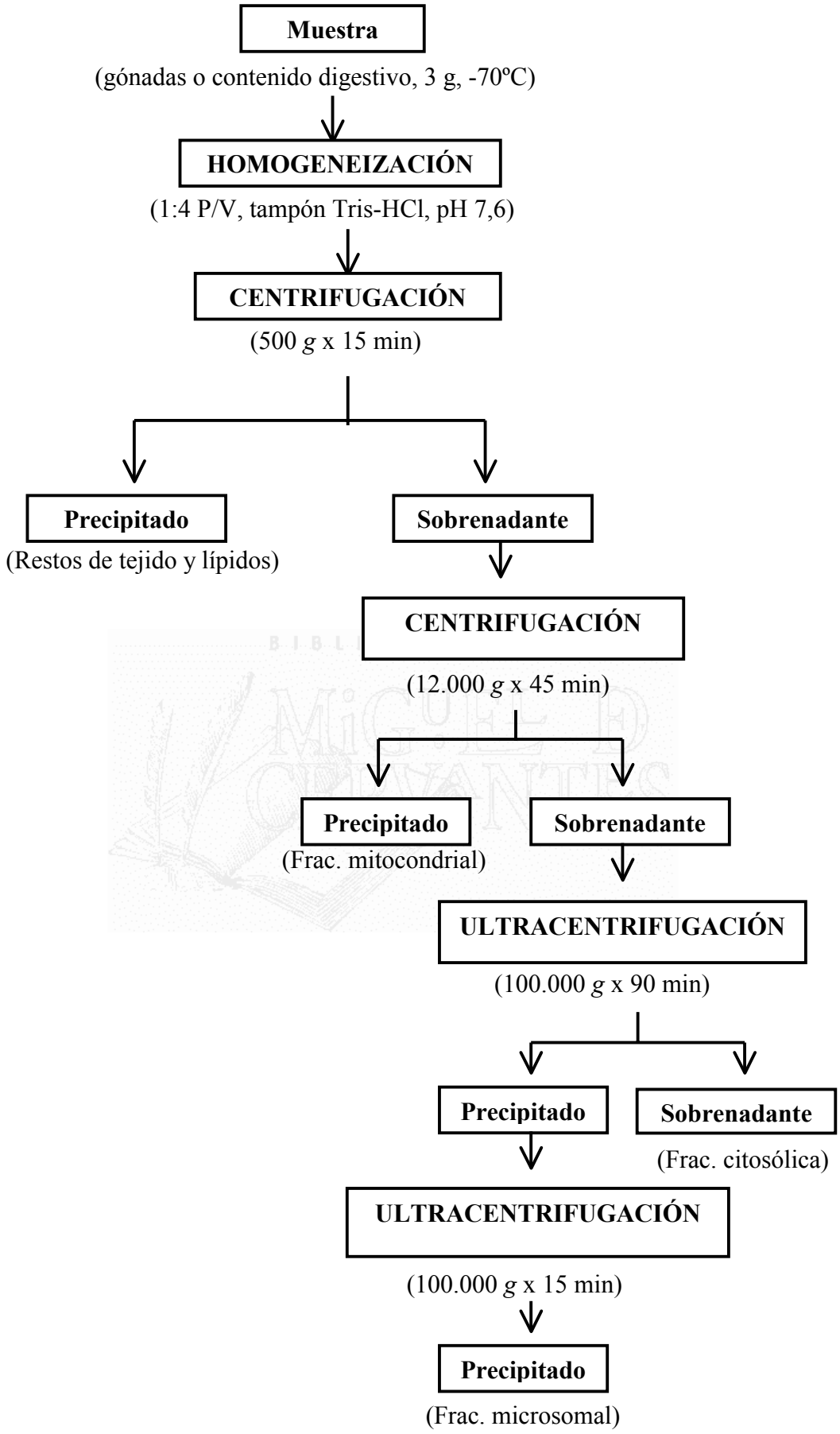


Fig. 4.IV. Preparación de las **fracciones subcelulares** (microsomal, citosólica y mitocondrial).

4.2.2 Determinación de las NAD(P)H reductasas dependientes de citocromo c

Todos los ensayos enzimáticos se realizan a 25ºC en las tres fracciones subcelulares, siguiendo el protocolo descrito en Livingstone y Farrar (1984).

Las actividades de las citocromo c reductasas se determinan midiendo el aumento de absorbancia a 550 nm, producido por la reducción del citocromo c, según la reacción:

$$\mathbf{NAD(P)H + 2\ cyt\ c\ (oxi) \rightarrow NAD(P)^{+} + 2\ cyt\ c\ (red) + 2\ H^{+}} \qquad \mathbf{(b)}$$

Las concentraciones iniciales y finales, así como los volúmenes añadidos, se resumen en la siguiente tabla:

Solución	Conc. inicial (mM)	V (µl)	Conc. cubeta (mM)
Tris-HCl pH 7,6	100	500	50
KCN	20	50	1
H_2O	---	200-295	---
citocromo c	1,2	50	0,06
muestra gónadas o cont. digestivo	---	100-5	---
NAD(P)H	6	50	0,3

Se hace primero una línea base a 550 nm en ausencia de NAD(P)H y el valor de absorbancia obtenido se toma como blanco, sustrayéndose posteriormente de la medida de actividad enzimática total. El volumen final de la cubeta es 1 ml y la absorbancia se mide a 550 nm. Se calcula la actividad enzimática usando un coeficiente de extinción molar para el citocromo c de 19,6 $mM^{-1}cm^{-1}$ (Shimakata *et al*., 1972). Los resultados se expresan en nmoles/min·g tejido fresco y en nmoles/min·mg proteína.

4.2.3 Determinación de las NAD(P)H reductasas dependientes de ferricianuro

Todos los ensayos enzimáticos se realizan a 25ºC en las tres fracciones subcelulares, siguiendo el protocolo descrito en Livingstone y Farrar (1984).

Las actividades correspondientes a las ferricianuro reductasas se determinan midiendo el descenso de absorbancia a 420 nm, producido por la reducción del ferricianuro potásico, según la reacción:

$$\mathbf{NAD(P)H + H^+ + [Fe(CN)_6]^{-3} \rightarrow NAD(P)^+ + 2\ H^+ + [Fe(CN)_6]^{-4}} \qquad \mathbf{(c)}$$

Las concentraciones iniciales y finales, así como los volúmenes añadidos, se resumen en la siguiente tabla:

Solución	Conc. inicial (mM)	V (µl)	Conc. cubeta (mM)
Tris-HCl pH 7,6	100	500	50
KCN	20	50	1
H_2O	---	200-295	---
ferricianuro K	4	50	0,2
muestra gónadas o cont. digestivo	---	100-5	---
NAD(P)H	6	50	0,3

Se hace primero una línea base a 420 nm en ausencia de NAD(P)H y el valor de absorbancia obtenido se toma como blanco, sustrayéndose posteriormente a la medida de actividad enzimática total. El volumen final de la cubeta es 1 ml y la absorbancia se mide a 420 nm. Se calcula la actividad enzimática usando un coeficiente de extinción molar para el ferricianuro potásico de 1,02 $mM^{-1}cm^{-1}$ (Ichikawa *et al.*, 1969). Los resultados se expresaron en nmoles/min·g tejido fresco y en nmoles/min·mg proteína.

4.2.4 Determinación de las proteínas

La medida de las proteínas mitocondrial, citosólica y microsomal se realiza siguiendo una modificación del método descrito por Lowry *et al*. (1951). Todas las determinaciones se llevan a cabo al menos 3 veces y los resultados se expresan como la media ± error estándar (e.s.).

Este método se basa en la determinación espectrofotométrica a 650 nm del complejo coloreado formado por las proteínas en medio alcalino (proporcionado por el tartrato sódico-potásico y el NaOH) con el sulfato cúprico y el reactivo de Folin y Ciocalteau. Se toma como proteína patrón una disolución acuosa 1 mg/ml de BSA (seroalbúmina bovina), confeccionando una recta patrón con concentraciones de 0,4-0,2-0,1-0,06-0,04 y 0,02 mg/ml. Los resultados se expresan como mg proteína/ml.

4.2.5 Estudio *in vitro* con metales pesados

Los estudios destinados a determinar la influencia *in vitro* de algunos metales pesados sobre las enzimas reductasas del sistema MFO en *P. lividus* se realizan en el tejido gonadal, por las mismas razones que en el caso de la peroxidación lipídica, siendo el mes elegido mayo de 1995, por ser uno de los que presenta mayor actividad enzimática para las reductasas analizadas. Dicho tejido se centrifuga a 500 *g* durante 15 minutos y se toma el sobrenadante obtenido para realizar los ensayos posteriores.

Para dichos estudios se emplean sales solubles de estos metales: $CdCl_2$ (cloruro de cadmio anhidro), $HgCl_2$ (cloruro mercúrico anhidro) y $PbAc_2 \cdot 2\ H_2O$ (acetato plumboso dihidratado), todos ellos de Sigma y $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ (sulfato cúprico pentahidratado), de Probus. El protocolo utilizado es el siguiente:

I. Se preparan disoluciones acuosas concentradas de las sales de estos metales, de manera que, por la adición de 50 µl de estas disoluciones en la mezcla final de reacción (1 ml), se puedan obtener las concentraciones deseadas de cada metal. Las concentraciones usadas son similares, en la medida de lo posible, a las ensayadas para la peroxidación lipídica. Pero, a concentraciones de metal elevadas, se observa una inhibición total de las enzimas, por lo que sólo se pueden emplear concentraciones de metal bajas. En la siguiente tabla, se especifican las concentraciones utilizadas de las disoluciones acuosas de cada uno de los metales, expresadas en µg/ml:

Metal	Cu^{+2}	Cd^{+2}	Hg^{+2}	Pb^{+2}
Concentración (µg/ml)	0	0	0	0
	3,125	5 10	0,78	12,5
	6,25	10 25	1,56	25
	12,5	15 50	3,12	50
	25	20 75	6,25	100
	50		12,5	200

II. El procedimiento restante consiste en la medida de las enzimas reductasas dependientes de citocromo c y de ferricianuro, realizándose del modo descrito en apartados anteriores.

III. A partir del resultado de esta absorbancia, se calculan las actividades enzimáticas de dichas enzimas del sistema MFO, expresadas en nmoles/min·g tejido fresco y en nmoles/min·mg proteína, del mismo modo que en los casos anteriores.

4.2.6 Estudio *in vitro* con xenobióticos

Los estudios destinados a determinar la influencia *in vitro* de algunos xenobióticos sobre las enzimas reductasas del sistema MFO en *P. lividus* se realizan en el tejido gonadal de mayo de 1995, por las mismas razones que en el caso de la peroxidación lipídica. Dicho tejido se centrifuga a 500 *g* durante 15 minutos y se toma el sobrenadante obtenido para realizar los ensayos posteriores.

Los xenobióticos usados son la MD (menadiona, 2-metil-1,4-naftoquinona), disuelta en etanol, el PQ (dicloruro de paraquat, dicloruro de 1,1´-dimetil-4,4´-bipiridina), disuelto en agua, la NF (nitrofurantoína, N-(5-nitro-2-furfurilideno)-1-aminohidantoína), disuelta en DMSO (dimetilsulfóxido) y el BaP (benzo(a)pireno), disuelto en DMF (dimetilformamida), todos ellos proporcionados por Sigma. El protocolo utilizado es el siguiente:

I. Se preparan disoluciones concentradas de los xenobióticos, de manera que, por la adición de 10 µl de estas disoluciones en la mezcla final de reacción (1 ml), se puedan obtener las concentraciones deseadas de cada xenobiótico. Las concentraciones usadas son similares, en la medida de lo posible, a las ensayadas

para la peroxidación lipídica. En aquellos xenobióticos que no habían sido ensayados en la peroxidación lipídica, se toman las concentraciones citadas en Livingstone *et al*. (1990b) y en Lemaire y Livingstone (1993). En la siguiente tabla, se especifican las concentraciones utilizadas de las disoluciones de cada uno de los xenobióticos, expresadas en μmoles/l:

Xenobiótico	**MD**	**PQ**	**NF**	**BaP**
Concentración (μM)	0	0	0	0
	125	250	31,25	31,25
	250	500	62,5	62,5
	500	1000	125	125
	750	1500	250	250
	1000	2000	500	500

II. El procedimiento restante consiste en la medida de las enzimas reductasas dependientes de citocromo c y de ferricianuro, realizándose del modo descrito en apartados anteriores.

III. A partir del resultado de esta absorbancia, se calculan las actividades enzimáticas de dichas enzimas del sistema MFO, expresadas en nmoles/min·g tejido fresco y en nmoles/min·mg proteína, del mismo modo que en los casos anteriores.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Variación estacional de los niveles de actividad de las reductasas asociadas al sistema MFO

Los resultados obtenidos de las actividades totales de las reductasas se expresan como nmoles por minuto y por g de tejido fresco.

4.3.1.1 NADPH-reductasas

Los valores de **actividad total de la NADPH-citocromo c reductasa en las gónadas** de *Paracentrotus lividus* oscilan entre un máximo de actividad de 153,94 alcanzado en abril de 1995, y un mínimo de 85,48 en agosto de ese mismo año (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$) (**Tabla 4.1**). El perfil de la variación estacional de esta enzima es bastante claro, observándose en primer lugar un aumento de actividad del 61% en diciembre de 1994 con respecto al mes anterior, apareciendo a continuación una caída gradual de niveles del 20% en los meses de enero y febrero de 1995. Es entonces cuando la actividad vuelve a aumentar hasta alcanzar el pico máximo en abril de este mismo año, observándose a partir de ahí un descenso continuo del 45% hasta el valor mínimo de agosto, que se mantiene durante el mes de septiembre de 1995 (85,48 y 90,67, respectivamente) (**Fig. 4.1**).

La **actividad total de la NADPH-citocromo c reductasa en el contenido digestivo** en *P. lividus* parece ser del mismo orden que la encontrada en las gónadas de dicho animal, aunque los valores máximos de actividad aparecen mucho antes (en diciembre de 1994) y, por el contrario, los más bajos están ligeramente retrasados (en septiembre de 1995) (**Tabla 4.1**) (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$)**.** Su perfil de variación estacional es menos claro que en el caso de las gónadas, y aparece un mayor error estándar en las medidas, aunque parece evidente que los valores máximos de actividad en invierno (entre diciembre de 1994 y febrero de 1995) dan paso a valores menores en los meses de verano (entre junio y septiembre de 1995) (**Fig. 4.1)**.

La **actividad total de la NADPH-ferricianuro reductasa en las gónadas** de *P. lividus* presenta unos valores entre 7 y 14 veces más elevados que los observados en la NADPH-citocromo c reductasa. El perfil obtenido durante el período de estudio es similar al de la NADPH-cytcred, con valores máximos en

mayo de 1995 (2214,05) y mínimos en octubre de ese mismo año (977,12) (**Tabla 4.1**).

Fecha	Tejido	NADPH-cytcred	NADPH-ferrired
22-11-94	Gónadas	86,39 ± 3,11	1086,60 ± 60,04
	C. digestivo	92,15 ± 1,30	860,02 ± 131,73
26-12-94	Gónadas	138,83 ± 9,98	1859,48 ± 13,07
	C. digestivo	132,54 ± 1,18	1256,26 ± 168,87
27-01-95	Gónadas	124,09 ± 13,07	1796,82 ± 68,71
	C. digestivo	117,80 ± 17,71	935,46 ± 57,16
28-02-95	Gónadas	110,37 ± 6,56	1714,60 ± 108,49
	C. digestivo	126,13 ± 10,83	1729,58 ± 114,38
30-03-95	Gónadas	142,46 ± 4,46	1785,40 ± 127,68
	C. digestivo	110,37 ± 10,71	1104,03 ± 60,75
28-04-95	Gónadas	153,94 ± 2,14	2076,25 ± 227,68
	C. digestivo	97,29 ± 12,28	1250,54 ± 65,77
26-05-95	Gónadas	130,81 ± 7,18	2214,05 ± 4,90
	C. digestivo	102,61 ± 0,97	756,81 ± 13,21
28-06-95	Gónadas	106,66 ± 7,42	1742,92 ± 132,21
	C. digestivo	89,45 ± 4,65	757,62 ± 8,02
21-07-95	Gónadas	94,61 ± 8,76	1441,18 ± 138,70
	C. digestivo	95,89 ± 7,91	1009,26 ± 52,37
28-08-95	Gónadas	85,48 ± 3,57	1453,43 ± 121,00
	C. digestivo	88,60 ± 3,67	879,36 ± 21,94
26-09-95	Gónadas	90,67 ± 4,78	1263,62 ± 43,41
	C. digestivo	80,41 ± 5,61	763,34 ± 33,63
30-10-95	Gónadas	115,22 ± 7,71	977,12 ± 88,56
	C. digestivo	104,36 ± 10,08	857,30 ± 20,33

Tabla 4.1. Variación estacional de las **actividades específicas totales** (nmoles/min·g tejido fresco) de las **NADPH-reductasas** (citocromo c reductasa=cytcred y ferricianuro reductasa=ferrired) en las **gónadas** y el **contenido digestivo** de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

Los valores bajos observados en noviembre de 1994 (1086,60) dan paso a un brusco ascenso del 70% en el mes de diciembre de ese mismo año, alcanzándose entonces un primer pico de actividad. En meses posteriores, al igual que sucede en el caso de la NADPH-cyctcred gonadal, se produce un descenso de niveles del 8%, para iniciarse a partir de marzo un ascenso hasta alcanzar un nuevo máximo de actividad en mayo de 1995 (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$). A partir de ese momento comienza un descenso gradual, que conduce al valor más

bajo obtenido en octubre de 1995, siendo este nivel del mismo orden que el medido en noviembre del año anterior (977,12 frente a 1086,60) (**Fig. 4.1**).

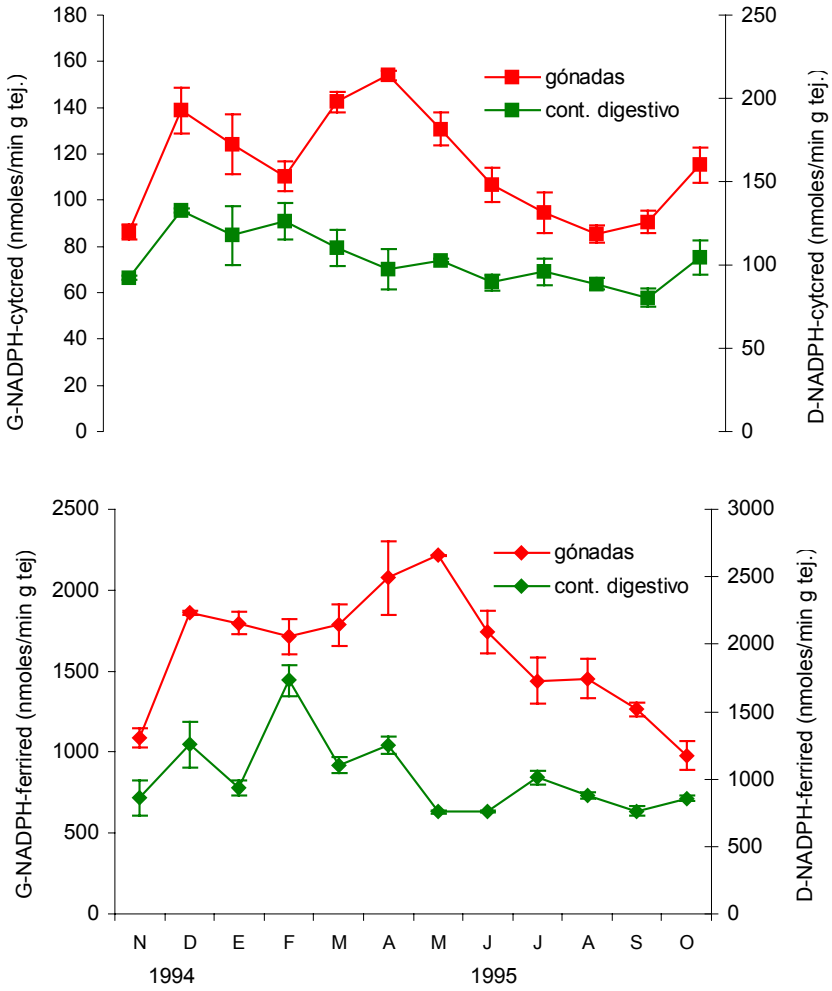


Fig. 4.1. Variación estacional de las **actividades específicas totales** (nmoles/min·g tejido fresco) de las **NADPH-reductasas** (citocromo c reductasa=cytcred y ferricianuro reductasa=ferrired) en las **gónadas** (G) y el **contenido digestivo** (D) de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

La **actividad total de la NADPH-ferricianuro reductasa en el contenido digestivo** es entre 1 y 3 veces inferior a la de las gónadas y presenta valores máximos de actividad en febrero de 1995 (1729,58) y mínimos en mayo de ese mismo año (756,81), coincidiendo estos últimos con el valor máximo de actividad de la correspondiente enzima gonadal (**Tabla 4.1**). La evolución estacional de esta enzima en el digestivo es, al igual que en el caso de la NADPH-cytcred, menos clara que la de su equivalente en las gónadas, presentando numerosos aumentos y descensos de actividad en el período de estudio, aunque de forma genérica, se pueden observar niveles de actividad elevados en invierno

(entre diciembre de 1994 y febrero de 1995) y bajos en verano (entre mayo y septiembre de 1995) (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$) (**Fig. 4.1**).

4.3.1.2 NADH-reductasas

Los valores de **actividad total de la NADH-citocromo c reductasa en las gónadas** de *P. lividus* oscilan entre un valor mínimo de 292,09 en noviembre de 1994 y uno máximo de 1075,50 en marzo del año siguiente (**Tabla 4.2**).

Fecha	Tejido	NADH-cytcred	NADH-ferrired
22-11-94	Gónadas	292,09 ± 12,64	11187,36 ± 382,20
	C. digestivo	467,99 ± 45,99	4989,11 ± 500,02
26-12-94	Gónadas	693,10 ± 25,17	13080,06 ± 57,19
	C. digestivo	390,45 ± 11,68	4825,71 ± 415,23
27-01-95	Gónadas	443,88 ± 1,70	13626,12 ± 150,20
	C. digestivo	331,11 ± 21,34	6503,25 ± 204,10
28-02-95	Gónadas	558,06 ± 9,80	12843,14 ± 196,08
	C. digestivo	360,98 ± 30,33	6639,43 ± 287,13
30-03-95	Gónadas	1075,50 ± 32,09	20228,76 ± 49,92
	C. digestivo	288,42 ± 33,16	7527,23 ± 235,91
28-04-95	Gónadas	940,19 ± 19,05	19003,27 ± 306,71
	C. digestivo	289,22 ± 30,35	6236,93 ± 732,64
26-05-95	Gónadas	911,85 ± 29,34	18619,28 ± 122,55
	C. digestivo	426,73 ± 28,37	8197,17 ± 522,90
28-06-95	Gónadas	614,58 ± 20,20	15130,72 ± 344,44
	C. digestivo	400,30 ± 37,34	6181,92 ± 393,21
21-07-95	Gónadas	531,53 ± 26,64	13622,00 ± 586,14
	C. digestivo	337,20 ± 35,98	5860,57 ± 486,22
28-08-95	Gónadas	342,47 ± 18,49	12769,61 ± 78,79
	C. digestivo	303,25 ± 44,36	5272,33 ± 108,93
26-09-95	Gónadas	482,28 ± 12,09	10364,92 ± 479,39
	C. digestivo	356,66 ± 22,89	6307,19 ± 267,50
30-10-95	Gónadas	610,73 ± 23,89	10253,27 ± 155,23
	C. digestivo	400,45 ± 14,72	5620,92 ± 424,84

Tabla 4.2. Variación estacional de las **actividades específicas totales** (nmoles/min·g tejido fresco) de las **NADH-reductasas** (citocromo c reductasa=cytcred y ferricianuro reductasa=ferrired) en las **gónadas** y el **contenido digestivo** de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

El perfil de variación estacional de esta enzima es bastante claro, partiendo de unos niveles mínimos de actividad en noviembre de 1994 e iniciando un ascenso, sólo interrumpido por un descenso del 36% en enero de 1995, hasta alcanzar un valor máximo en marzo de ese mismo año. Es entonces cuando comienza un descenso gradual hasta el mes de agosto de 1995, en que se observa uno de los valores más bajos del período analizado (342,47) (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$), produciéndose en los meses siguientes una recuperación de los niveles perdidos (**Fig. 4.2**).

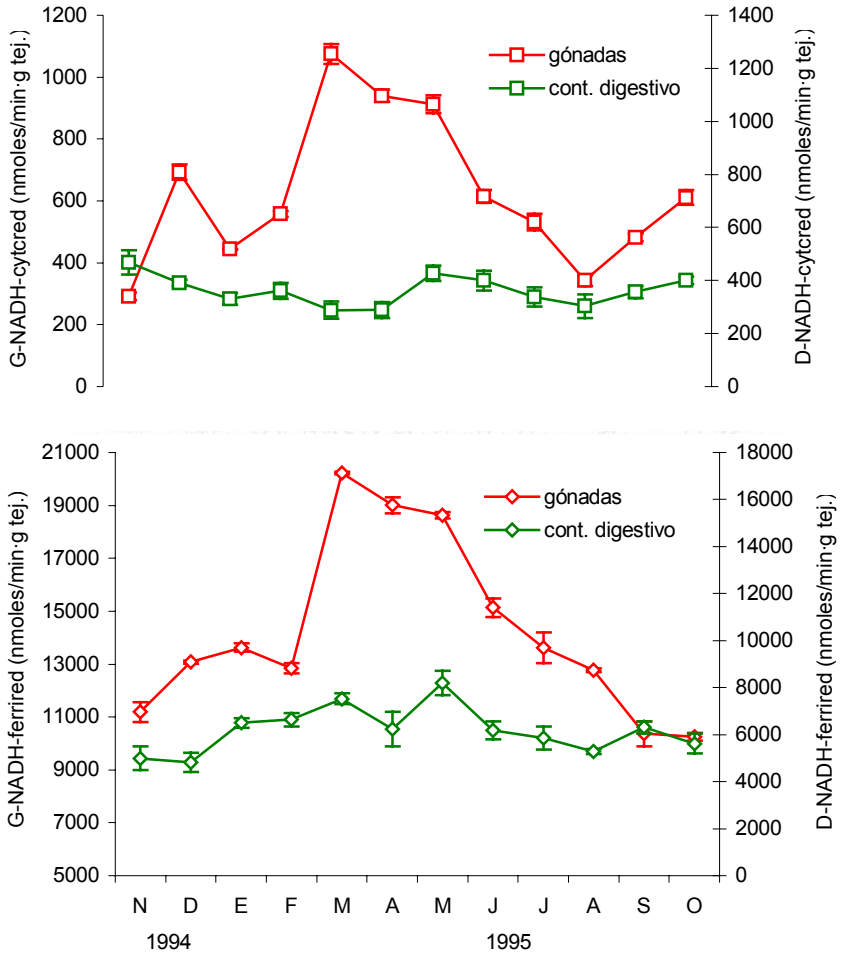


Fig. 4.2. Variación estacional de las **actividades específicas totales** (nmoles/min·g tejido fresco) de las **NADH-reductasas** (citocromo c reductasa=cytcred y ferricianuro reductasa=ferrired) en las **gónadas** (G) y el **contenido digestivo** (D) de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

La **actividad total de la NADH-citocromo c reductasa en el contenido digestivo** de *P. lividus* resulta ser de 1 a 3,7 veces inferior a la medida en las gónadas del mismo animal, excepto en el mes de noviembre de 1994, mes en que

los niveles medidos en el contenido digestivo son mayores (**Tabla 4.2**). Sus picos de actividad máxima y mínima se localizan, respectivamente, en noviembre de 1994 (467,99) y en marzo-abril del año siguiente (alrededor de 289). En cuanto a la variación estacional de la NADH-cytcred en el contenido digestivo se ha de destacar, en primer lugar, que los altos valores observados en noviembre de 1994 dan paso a una caída hasta alcanzar los niveles mínimos en marzo-abril de 1995. En el mes siguiente se produce un aumento brusco del 47%, consiguiéndose niveles de actividad similares a los medidos en noviembre del año anterior (426,73 frente a 467,99) (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$). Es entonces cuando comienza una caída gradual de actividad de forma análoga a las gónadas, hasta alcanzar valores bajos en agosto de 1995, del mismo orden de los obtenidos en abril de ese mismo año (303,25 frente a 289,22). A partir de agosto se observa una recuperación escalonada de los valores de actividad perdidos (**Fig. 4.2**). Este perfil de variación estacional es inverso al de dicha enzima en el tejido gonadal, de manera que los altos valores medidos en el contenido digestivo en noviembre de 1994 coinciden con los mínimos en las gónadas, mientras que los niveles más bajos del digestivo en marzo-abril de 1995 son simultáneos con el pico máximo de actividad en el tejido gonadal.

Los valores de **actividad total de la NADH-ferricianuro reductasa en las gónadas** de *P. lividus* aparecen reflejados en la **Tabla 4.2** y son del orden de unas 20 veces superiores a los observados usando el citocromo c como sustrato. Al igual que en el caso de las NADPH-reductasas gonadales, la NADH-ferrired presente en gónadas presenta un perfil similar al de la NADH-cytcred del mismo tejido, con un pico máximo en marzo de 1995 (20228,76) y uno mínimo en octubre de ese mismo año (10253,27). Su variación estacional queda demostrada, tal y como se observa en la **Fig. 4.2**, de manera que a partir de noviembre de 1994 comienza un rápido ascenso hasta marzo de 1995, aunque en febrero se observa un ligero descenso del 6%. Estos elevados valores se mantienen durante los dos meses siguientes, iniciándose entonces una caída gradual de niveles de actividad durante el resto del período analizado, de forma que los valores observados en octubre de 1995 son semejantes a los correspondientes a noviembre de 1994 (10253,27 y 11187,36, respectivamente) (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$).

La **actividad total de la NADH-ferricianuro reductasa en el contenido digestivo** de *P. lividus* es entre 1,8 y 3 veces menor que la medida en las gónadas de dicho animal, tal y como se puede observar en la **Tabla 4.2.** Los valores más bajos de actividad aparecen en el mes de diciembre de 1994, mientras que los más altos en mayo del año siguiente, ligeramente retrasados con respecto a las gónadas (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$). La evolución de la actividad enzimática de la NADH-ferrired en el digestivo durante el período de estudio comienza con un gradual aumento de los niveles desde los meses de noviembre-diciembre de 1994 hasta mayo de 1995, sólo interrumpido por un descenso del 17% en el mes de abril de 1995. Una vez alcanzado este valor máximo, comienza el declive de la actividad enzimática, hasta valores que se sitúan en torno a 6000 en los meses de septiembre-octubre de 1995 (**Fig. 4.2**).

4.3.2 Distribución subcelular de las reductasas asociadas al sistema MFO

Los resultados de las actividades en las fracciones subcelulares de las reductasas se expresan como nmoles por minuto y por g de tejido fresco y como nmoles por minuto y por mg de proteína.

4.3.2.1 NADPH-reductasas

Al analizar la actividad de la **NADPH-citocromo c reductasa gonadal** (nmoles/min·g tejido fresco) en las distintas fracciones subcelulares a largo del año, se observa que la citosólica presenta siempre una mayor actividad, variando su porcentaje sobre la actividad total entre un 85,05% y un 90,17%. Sin embargo, al expresar los resultados por mg de proteína, las actividades de las tres fracciones subcelulares son del mismo orden (**Tabla 4.3**). El valor más alto de actividad por g de tejido fresco para la NADPH-cytcred gonadal se observa en octubre de 1995 tanto en microsomas como en mitocondrias, sin embargo el más bajo se mide en meses distintos (en junio de 1995 para la fracción microsomal y en noviembre del año anterior para la mitocondrial). El perfil estacional de actividad citosólica por g de tejido fresco coincide aproximadamente con el de la mitocondrial, observándose en ambas fracciones dos picos de actividad en diciembre de 1994 y en abril de 1995, seguidos de descensos hasta valores mínimos en febrero y en agosto de ese mismo año (**Fig. 4.3**).

Fecha	Frac. subc.	NADPH-cytcred (nmoles/min·g tejido) Gónadas	(nmoles/min·g tejido) Contenido digestivo	(nmoles/min·mg proteína) Gónadas	(nmoles/min·mg proteína) Cont. digest.
22-11-94	mic	3,29 ± 0,52 (3,81%)	6,89 ± 0,15 (7,48%)	0,593 ± 0,06	5,64 ± 0,60
	cit	77,55 ± 0,56 (89,88%)	69,61 ± 1,20 (75,54%)	0,71 ± 0,05	6,51 ± 0,92
	mit	5,44 ± 1,11 (6,30%)	15,65 ± 0,34 (16,98%)	0,95 ± 0,08	3,64 ± 0,38
26-12-94	mic	3,23 ± 0,53 (2,33%)	4,42 ± 0,17 (3,33%)	0,56 ± 0,14	2,96 ± 0,54
	cit	124,26 ± 9,43 (89,69%)	109,24 ± 0,50 (82,42%)	1,17 ± 0,19	7,14 ± 0,71
	mit	11,05 ± 0,34 (7,98%)	18,88 ± 1,35 (14,24%)	1,31 ± 0,04	4,35 ± 0,70
27-01-95	mic	3,53 ± 0,34 (2,85%)	3,66 ± 0,08 (3,11%)	0,77 ± 0,02	5,54 ± 0,47
	cit	110,54 ± 12,22 (89,22%)	105,04 ± 18,10 (89,17%)	1,14 ± 0,09	4,82 ± 0,22
	mit	9,82 ± 0,67 (0,79%)	9,10 ± 0,47 (7,72%)	2,28 ± 0,26	2,26 ± 0,08
28-02-95	mic	4,48 ± 0,20 (4,07%)	5,36 ± 0,39 (4,25%)	0,51 ± 0,03	3,19 ± 0,46
	cit	97,90 ± 6,06 (88,93%)	106,92 ± 10,84 (84,76%)	1,42 ± 0,15	5,27 ± 0,57
	mit	7,70 ± 0,56 (6,99%)	13,86 ± 0,37 (10,99%)	1,89 ± 0,04	2,13 ± 0,27
30-03-95	mic	4,31 ± 0,23 (3,02%)	6,12 ± 0,29 (5,54%)	0,78 ± 0,10	1,93 ± 0,20
	cit	128,46 ± 4,50 (90,17%)	96,94 ± 11,15 (87,83%)	1,78 ± 0,08	5,55 ± 0,63
	mit	9,69 ± 0,59 (6,80%)	7,31 ± 0,17 (6,62%)	1,21 ± 0,08	1,73 ± 0,32
28-04-95	mic	3,97 ± 0,30 (2,58%)	3,32 ± 0,15 (3,41%)	1,12 ± 0,07	2,21 ± 0,17
	cit	138,66 ± 1,97 (90,07%)	84,52 ± 11,22 (86,87%)	1,73 ± 0,07	4,94 ± 0,35
	mit	11,31 ± 0,22 (7,35%)	9,45 ± 0,92 (9,71%)	1,37 ± 0,02	2,86 ± 0,13
26-05-95	mic	3,51 ± 0,11 (2,68%)	5,70 ± 0,08 (5,55%)	1,01 ± 0,12	4,30 ± 0,58
	cit	117,01 ± 7,61 (89,45%)	88,32 ± 0,76 (86,07%)	1,96 ± 0,10	5,73 ± 0,21
	mit	10,29 ± 0,56 (7,87%)	8,59 ± 0,37 (8,37%)	1,12 ± 0,02	3,16 ± 0,20
28-06-95	mic	3,06 ± 0,00 (2,87%)	7,40 ± 0,39 (8,27%)	2,50 ± 0,24	5,60 ± 0,09
	cit	96,03 ± 7,25 (90,03%)	64,97 ± 4,57 (72,62%)	2,34 ± 0,10	7,84 ± 1,04
	mit	7,57 ± 0,60 (7,10%)	17,09 ± 0,92 (19,10%)	1,38 ± 0,05	3,32 ± 0,08
21-07-95	mic	3,40 ± 0,34 (3,57%)	6,55 ± 0,31 (6,83%)	0,97 ± 0,13	8,59 ± 1,70
	cit	83,67 ± 8,25 (87,86%)	76,76 ± 6,65 (80,05%)	2,10 ± 0,07	9,65 ± 0,76
	mit	8,16 ± 0,40 (8,57%)	12,58 ± 1,23 (13,12%)	1,61 ± 0,01	3,82 ± 0,25
28-08-95	mic	3,46 ± 0,28 (4,05%)	6,80 ± 0,59 (7,67%)	2,09 ± 0,19	7,50 ± 0,20
	cit	74,49 ± 3,95 (87,14%)	63,60 ± 4,32 (71,78%)	1,74 ± 0,09	5,23 ± 0,56
	mit	7,53 ± 0,24 (8,81%)	18,20 ± 1,39 (20,54%)	1,48 ± 0,24	3,11 ± 0,34
26-09-95	mic	4,87 ± 0,45 (5,38%)	5,44 ± 0,34 (6,76%)	0,61 ± 0,09	5,84 ± 0,21
	cit	77,21 ± 3,74 (85,38%)	60,09 ± 3,97 (74,73%)	1,43 ± 0,09	4,03 ± 0,26
	mit	8,35 ± 0,58 (9,23%)	14,88 ± 2,39 (18,50%)	1,77 ± 0,13	3,47 ± 0,42
30-10-95	mic	5,36 ± 0,35 (4,66%)	4,76 ± 0,34 (4,56%)	0,82 ± 0,14	5,89 ± 0,47
	cit	97,73 ± 8,18 (85,05%)	85,83 ± 10,23 (82,24%)	1,47 ± 0,14	6,97 ± 0,48
	mit	11,82 ± 0,73 (10,29%)	13,77 ± 0,51 (13,19%)	1,85 ± 0,31	3,86 ± 0,30

Tabla 4.3. Variación estacional de las actividades específicas de la **NADPH-citocromo c reductasa** (NADPH-cytcred), en nmoles/min·g tejido fresco y en nmoles/min·mg proteína, y del porcentaje sobre la actividad total (%), en las **fracciones subcelulares** (mic=microsomas, cit=citosol y mit=mitocondrias) de las **gónadas** y del **contenido digestivo** de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

El comportamiento de la **NADPH-citocromo c reductasa del contenido digestivo** es similar al observado en las gónadas: mientras que el citosol parece ser el componente mayoritario al expresar la actividad de la reductasa por g de tejido fresco, cuando se calcula la actividad de dicha enzima por mg de proteína los niveles presentes en las tres fracciones subcelulares son del mismo orden (**Tabla 4.3**). Al igual que en el tejido gonadal, la actividad máxima mitocondrial por g de tejido fresco vuelve a aparecer en invierno (en diciembre de 1994), mientras que la fracción microsomal presenta los niveles más altos en verano y la

citosólica en invierno (en junio de 1995 y en diciembre de 1994, respectivamente) (**Fig. 4.3**).

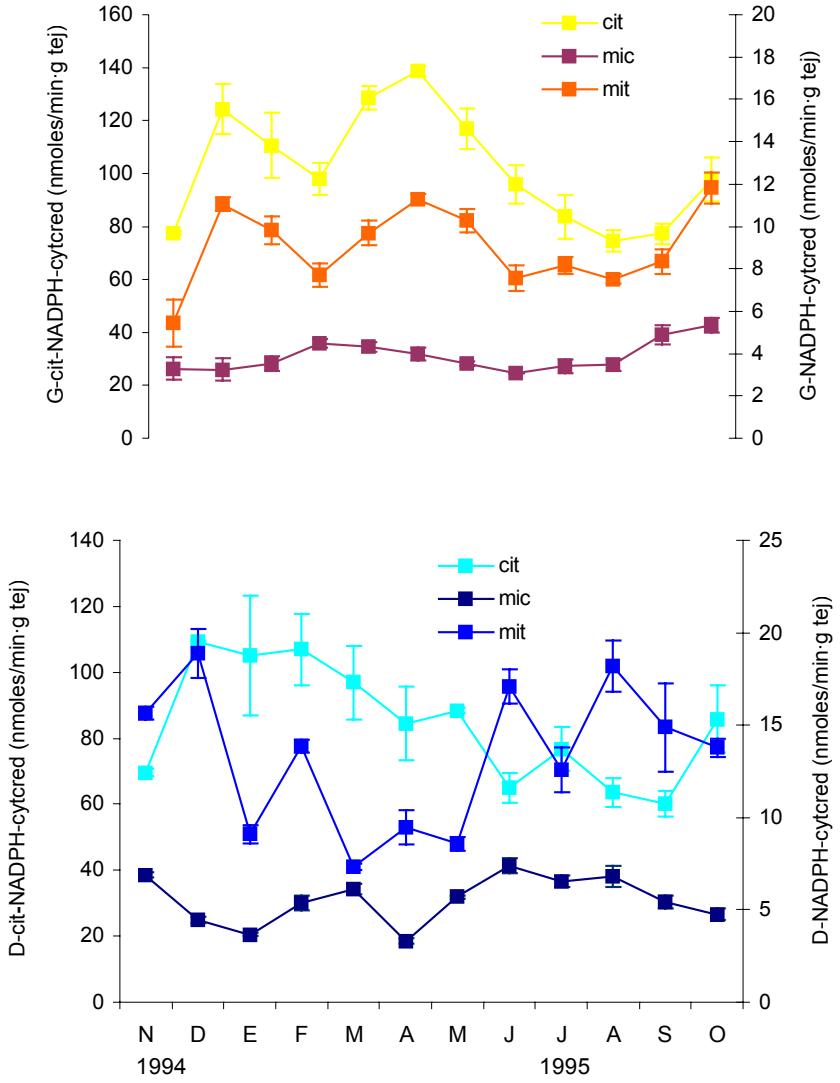


Fig. 4.3. Variación estacional de las actividades específicas (nmoles/min·g tejido fresco) de la **NADPH-citocromo c reductasa** (cytcred) en las **fracciones subcelulares** (mic=microsomas, cit=citosol y mit=mitocondrias) de las **gónadas** (G) y del **contenido digestivo** (D) de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

Como en la NADPH-citocromo c reductasa gonadal, también en el caso de la **NADPH-ferricianuro reductasa de las gónadas** de *P. lividus* el citosol es el componente mayoritario de la actividad por g de tejido fresco, que se sitúa entre un 85,03% y un 91,86% sobre la actividad total de dicha enzima. Nuevamente, al analizar la actividad de la NADPH-reductasa gonadal por mg de proteína, los valores encontrados de actividad en las distintas fracciones subcelulares son del mismo orden (**Tabla 4.4**).

Fecha	Frac. subc.	NADPH-ferrired (nmoles/min·g tejido) Gónadas	NADPH-ferrired (nmoles/min·g tejido) Contenido digestivo	NADPH-ferrired (nmoles/min·mg proteína) Gónadas	NADPH-ferrired (nmoles/min·mg proteína) Cont. digest.
22-11-94	mic	53,92 ± 4,00 (4,96%)	44,12 ± 0,00 (5,13%)	15,66 ± 1,40	36,73 ± 5,89
	cit	980,39 ± 53,37 (90,22%)	749,45 ± 125,46 (87,14%)	14,72 ± 0,80	64,56 ± 4,60
	mit	52,29 ± 10,67 (4,81%)	66,45 ± 7,14 (7,73%)	8,31 ± 0,34	13,87 ± 0,67
26-12-94	mic	91,50 ± 3,27 (4,96%)	48,20 ± 0,82 (3,84%)	12,58 ± 1,05	35,83 ± 1,75
	cit	1633,99 ± 0,00 (88,65%)	1122,00 ± 168,43 (89,31%)	24,94 ± 2,31	53,88 ± 10,89
	mit	117, 65 ± 21,01 (6,38%)	86,06 ± 4,75 (6,85%)	12,44 ± 0,91	13,48 ± 1,36
27-01-95	mic	85,78 ± 2,45 (5,07%)	40,03 ± 0,82 (4,28%)	21,51 ± 1,37	32,51 ± 6,55
	cit	1498,76 ± 114,54 (88,67%)	832,24 ± 54,99 (88,97%)	27,57 ± 1,47	38,32 ± 12,65
	mit	105,66 ± 6,07 (6,25%)	63,18 ± 2,18 (6,75%)	13,39 ± 1,00	14,50 ± 0,59
28-02-95	mic	61,27 ± 4,69 (3,57%)	36,76 ± 1,41 (2,12%)	16,26 ± 1,33	20,73 ± 1,25
	cit	1577,34 ± 109,39 (91,86%)	1564,27 ± 95,56 (90,44%)	23,21 ± 1,99	65,40 ± 7,12
	mit	78,43 ± 3,77 (4,57%)	128,54 ± 26,77 (7,43%)	14,28 ± 1,08	16,97 ± 1,10
30-03-95	mic	101,31 ± 13,07 (5,67%)	47,39 ± 1,63 (4,29%)	26,26 ± 3,36	21,36 ± 4,13
	cit	1601,31 ± 129,13 (89,69%)	964,05 ± 58,91 (87,32%)	30,24 ± 1,52	51,59 ± 6,04
	mit	82,79 ± 8,71 (4,64%)	92,59 ± 8,51 (8,39%)	11,30 ± 0,25	16,16 ± 3,18
28-04-95	mic	98,04 ± 5,66 (4,72%)	45,75 ± 1,63 (3,66%)	27,88 ± 2,60	30,96 ± 3,85
	cit	1901,96 ± 232,03 (91,60%)	1108,93 ± 62,50 (88,68%)	34,54 ± 2,55	67,34 ± 3,26
	mit	76,25 ± 5,76 (3,67%)	95,86 ± 2,18 (7,60%)	7,82 ± 0,80	28,03 ± 4,28
26-05-95	mic	56,37 ± 2,45 (2,54%)	49,84 ± 2,95 (6,58%)	15,31 ± 0,57	35,27 ± 3,68
	cit	2084,97 ± 0,00 (93,83%)	640,52 ± 6,54 (84,63%)	32,06 ± 1,86	64,63 ± 4,02
	mit	80,61 ± 7,86 (3,63%)	66,45 ± 3,93 (8,78%)	9,29 ± 1,27	14,12 ± 1,06
28-06-95	mic	58,82 ± 5,66 (3,25%)	47,38 ± 1,63 (6,25%)	27,15 ± 0,80	62,98 ± 6,87
	cit	1686,27 ± 114,83 (93,25%)	640,52 ± 6,54 (84,54%)	44,89 ± 2,08	45,64 ± 2,47
	mit	63,18 ± 7,86 (3,49%)	69,72 ± 2,18 (9,20%)	14,29 ± 2,63	18,29 ± 1,46
21-07-95	mic	111,11 ± 8,65 (7,79%)	44,12 ± 2,83 (4,37%)	25,11 ± 2,82	54,71 ± 11,44
	cit	1232,84 ± 98,07 (86,48%)	862,74 ± 43,52 (85,48%)	34,30 ± 2,96	74,41 ± 2,62
	mit	81,70 ± 9,43 (5,73%)	102,40 ± 7,85 (10,15%)	21,38 ± 1,54	28,94 ± 3,15
28-08-95	mic	77,61 ± 14,45 (5,34%)	41,67 ± 2,45 (4,74%)	33,69 ± 6,06	43,06 ± 0,40
	cit	1279,41 ± 84,48 (87,98%)	754,90 ± 20,76 (85,85%)	30,89 ± 1,80	52,78 ± 3,71
	mit	97,22 ± 4,69 (6,68%)	82,79 ± 7,85 (9,41%)	15,05 ± 0,57	21,12 ± 4,91
26-09-95	mic	78,43 ± 11,32 (6,21%)	46,57 ± 3,74 (6,10%)	24,10 ± 3,55	45,79 ± 2,62
	cit	1106,75 ± 47,48 (87,59%)	642,70 ± 34,24 (84,20%)	21,93 ± 1,36	53,14 ± 3,15
	mit	78,43 ± 3,27 (6,21%)	74,07 ± 4,36 (9,70%)	18,86 ± 0,79	13,70 ± 1,96
30-10-95	mic	81,70 ± 3,27 (8,80%)	45,75 ± 1,63 (5,34%)	11,82 ± 1,39	59,81 ± 4,20
	cit	789,22 ± 80,38 (85,03%)	736,38 ± 24,26 (85,90%)	12,82 ± 1,13	64,24 ± 5,64
	mit	57,19 ± 1,63 (6,16%)	75,16 ± 8,22 (8,77%)	9,30 ± 0,45	23,25 ± 2,11

Tabla 4.4. Variación estacional de las actividades específicas de la **NADPH-ferricianuro reductasa** (NADPH-ferrired), en nmoles/min·g tejido fresco y en nmoles/min·mg proteína, y del porcentaje sobre la actividad total (%), en las **fracciones subcelulares** (mic=microsomas, cit=citosol y mit=mitocondrias) de las **gónadas** y del **contenido digestivo** de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

Mientras que los valores más elevados de actividad por g de tejido fresco de esta enzima en las mitocondrias aparecen en diciembre de 1994 (117,65), en las otras fracciones subcelulares lo hacen mucho más tarde (2084,97 en mayo de 1995 para el citosol y 111,11 en julio de 1995 para los microsomas), tal y como se observa en la **Fig. 4.4**. En este caso, a diferencia de la NADPH-cytcred, los valores más bajos de actividad aparecen en los meses de otoño para las tres fracciones objeto de estudio, siendo octubre de 1995 para la citosólica (789,22) y noviembre de 1994 para la microsomal y la mitocondrial (53,92 y 52,29, respectivamente).

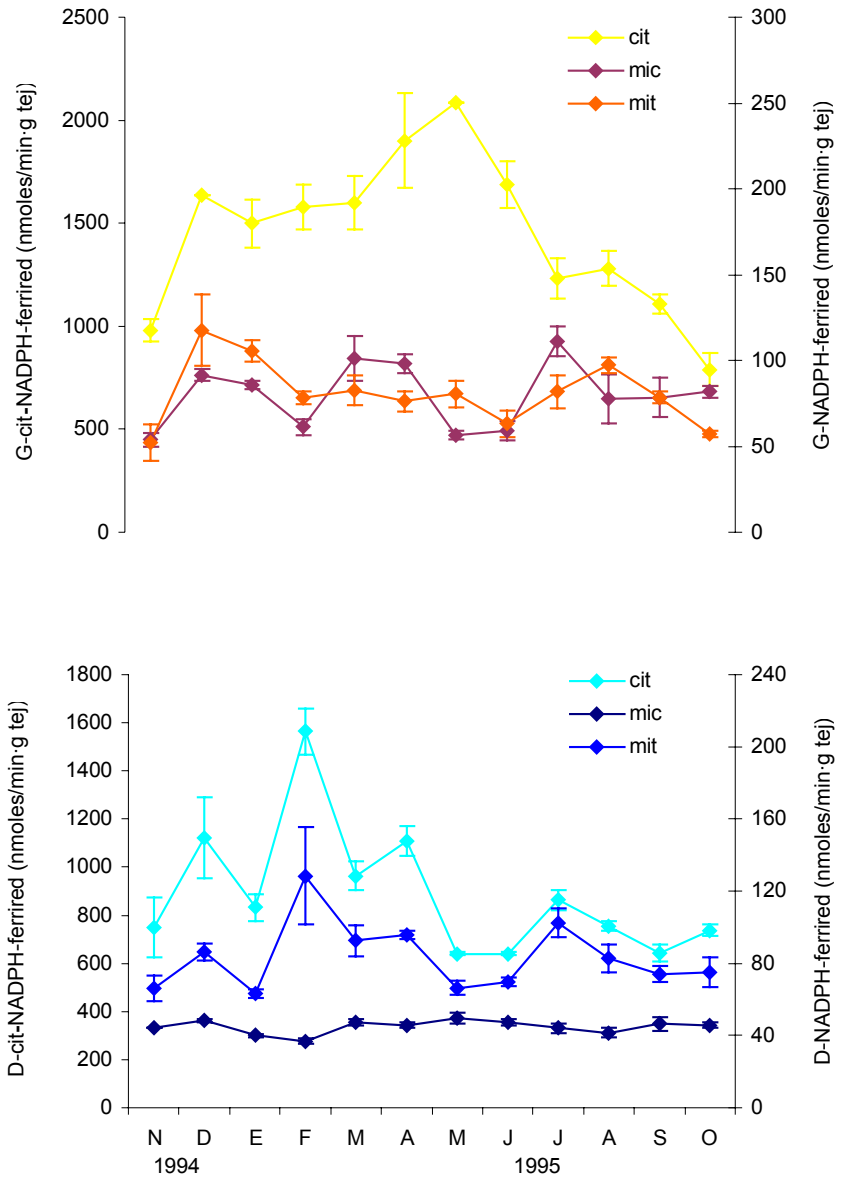


Fig. 4.4. Variación estacional de las actividades específicas (nmoles/min·g tejido fresco) de la **NADPH-ferricianuro reductasa** (ferrired) en las **fracciones subcelulares** (mic=microsomas, cit=citosol y mit=mitocondrias) de las **gónadas** (G) y del **contenido digestivo** (D) de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

El citosol parece ser el contribuyente mayoritario de la actividad de la **NADPH-ferricianuro reductasa del contenido digestivo** de *P. lividus*, tanto expresada por g de tejido fresco como por mg de proteína (**Tabla 4.4**). Las actividades más bajas por g de tejido fresco de las fracciones mitocondrial y microsomal se obtienen en la misma época del año (63,18 en enero de 1995 y 36,76 en febrero de 1995, respectivamente), mientras que al comparar los picos máximos de actividad se observa que el citosol y las mitocondrias coinciden en

febrero de ese mismo año, presentando además un perfil bastante similar ambas fracciones a lo largo del año (**Fig. 4.4**).

4.3.2.2 NADH-reductasas

Fecha	Frac. subc.	NADH-cytcred (nmoles/min·g tejido) Gónadas	NADH-cytcred (nmoles/min·g tejido) Contenido digestivo	NADH-cytcred (nmoles/min·mg proteína) Gónadas	NADH-cytcred (nmoles/min·mg proteína) Cont. digest.
22-11-94	mic	196,99 ± 14,80 (35,99%)	33,59 ± 0,00 (7,18%)	13,32 ± 2,68	31,69 ± 1,08
	cit	291,95 ± 35,52 (53,34%)	158,02 ±6,73 (33,77%)	4,83 ± 0,35	17,72 ± 1,26
	mit	58,39 ± 2,71 (10,67%)	276,36 ± 53,15 (59,05%)	9,71 ± 0,38	50,44 ± 6,06
26-12-94	mic	98,00 ± 3,12 (14,14%)	24,23 ± 0,00 (6,21%)	14,54 ± 2,31	18,38 ± 0,42
	cit	467,12 ± 2,78 (67,40%)	219,96 ± 7,24 (56,33%)	4,53 ± 0,36	11,81 ± 0,50
	mit	127,98 ± 25,52 (18,46%)	146,26 ± 17,20 (37,46%)	12,85 ± 0,37	28,08 ± 1,03
27-01-95	mic	112,24 ± 2,55 (25,85%)	21,05 ± 2,88 (6,36%)	13,67 ± 1,04	16,75 ± 1,13
	cit	225,06 ± 9,83 (51,83%)	223,75 ± 25,18 (65,58%)	3,14 ± 0,50	9,89 ± 1,48
	mit	96,94 ± 4,42 (22,32%)	86,31 ± 6,26 (26,07%)	12,31 ± 0,95	21,22 ± 3,23
28-02-95	mic	108,42 ± 6,29 (19,43%)	28,70 ± 4,46 (7,95%)	12,33 ± 0,96	11,13 ± 0,51
	cit	360,83 ± 2,96 (64,66%)	212,58 ± 21,40 (58,89%)	5,05 ± 0,47	11,40 ± 0,97
	mit	88,81 ± 2,08 (15,91%)	119,70 ± 8,66 (33,16%)	13,81 ± 1,22	17,61 ± 1,30
30-03-95	mic	303,15 ± 13,68 (28,19%)	18,28 ± 1,70 (6,34%)	37,20 ± 3,95	6,96 ± 0,38
	cit	533,16 ± 0,00 (49,57%)	184,24 ± 21,79 (63,88%)	7,39 ± 0,40	9,50 ± 0,45
	mit	239,19 ± 20,09 (22,24%)	85,88 ± 9,81 (29,78%)	33,48 ± 0,69	11,15 ± 0,52
28-04-95	mic	187,50 ± 22,90 (19,94%)	18,92 ± 2,71 (6,54%)	42,55 ± 2,55	9,528 ± 0,79
	cit	432,11 ± 7,81 (45,96%)	180,84 ± 27,18 (62,53%)	6,56 ± 0,38	18,47 ± 1,26
	mit	320,58 ± 20,69 (34,10%)	89,46 ± 5,89 (30,93%)	26,17 ± 2,07	17,26 ± 0,47
26-05-95	mic	193,31 ± 13,28 (21,20%)	24,23 ± 1,27 (5,68%)	45,09 ± 5,32	18,67 ± 0,52
	cit	451,53 ± 20,10 (49,52%)	211,59 ± 27,62 49,58%)	7,92 ± 0,89	14,82 ± 1,81
	mit	267,01 ± 40,72 (29,28%)	190,90 ± 17,74 (44,74%)	49,84 ± 3,46	34,60 ± 0,36
28-06-95	mic	124,36 ± 5,74 (20,24%)	25,72 ± 3,42 (6,42%)	30,33 ± 4,61	28,46 ± 1,26
	cit	298,75 ± 9,12 (48,62%)	157,31 ± 16,29 (39,30%)	5,78 ± 0,89	9,81 ± 0,44
	mit	191,33 ± 7,65 (31,14%)	217,26 ± 24,65 (54,28%)	33,70 ± 0,71	40,43 ± 7,74
21-07-95	mic	100,98 ± 7,81 (19,00%)	22,53 ± 2,37 (6,68%)	30,31 ± 1,67	42,90 ± 3,67
	cit	251,13 ± 12,43 (47,25%)	129,96 ± 14,91 (38,54%)	5,68 ± 0,20	11,42 ± 0,27
	mit	179,42 ± 10,45 (33,75%)	184,70 ± 22,83 (54,78%)	39,32 ± 3,59	37,63 ± 2,66
28-08-95	mic	58,67 ± 1,27 (17,94%)	14,46 ± 1,53 (4,77%)	19,61 ± 1,93	22,24 ± 6,13
	cit	187,07 ± 13,92 (57,22%)	100,34 ± 3,44 (33,09%)	5,79 ± 0,48	9,11 ± 0,26
	mit	81,21 ± 6,18 (24,84%)	188,46 ± 47,25 (62,14%)	15,57 ± 1,38	41,75 ± 8,34
26-09-95	mic	135,63 ± 9,50 (28,12%)	25,08 ± 1,85 (7,03%)	18,86 ± 1,05	39,16 ± 3,31
	cit	293,37 ± 9,66 (60,83%)	142,80 ± 16,58 (40,04%)	4,66 ± 0,17	7,84 ± 1,00
	mit	53,28 ± 2,42 (11,05%)	188,77 ± 12,06 (52,93%)	13,77 ± 0,62	39,30 ± 0,58
30-10-95	mic	125,85 ± 9,50 (20,61%)	28,49 ± 5,22 (7,21%)	26,70 ± 2,43	33,85 ± 6,02
	cit	411,00 ± 32,92 (67,30%)	203,74 ± 14,95 (51,56%)	6,16 ± 0,49	10,86 ± 1,33
	mit	73,88 ± 0,10 (12,09%)	162,91 ± 5,97 (41,23%)	14,86 ± 2,00	50,35 ± 9,21

Tabla 4.5. Variación estacional de las actividades específicas de la **NADH-citocromo c reductasa** (NADH-cytcred), en nmoles/min·g tejido fresco y en nmoles/min·mg proteína, y del porcentaje sobre la actividad total (%), en las **fracciones subcelulares** (mic=microsomas, cit=citosol y mit=mitocondrias) de las **gónadas** y del **contenido digestivo** de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

En la **NADH-citocromo c reductasa de las gónadas** de *P. lividus* se observa un hecho sorprendente: mientras que al expresar la actividad enzimática de dicha enzima por g de tejido fresco la fracción con mayor actividad es el citosol (entre un 45,96% y un 67,40% sobre el total), cuando se analiza la actividad por mg de proteína los componentes mayoritarios son los microsomas y las mitocondrias, presentando el citosol una actividad entre 2 y 7 veces inferior a dichas fracciones subcelulares (**Tabla 4.5**). El perfil de variación estacional por g de tejido fresco es similar en las tres fracciones, presentando los picos máximos de actividad en marzo-abril de 1995 y los mínimos en agosto-septiembre de ese mismo año, tal y como se observa en la **Fig. 4.5**.

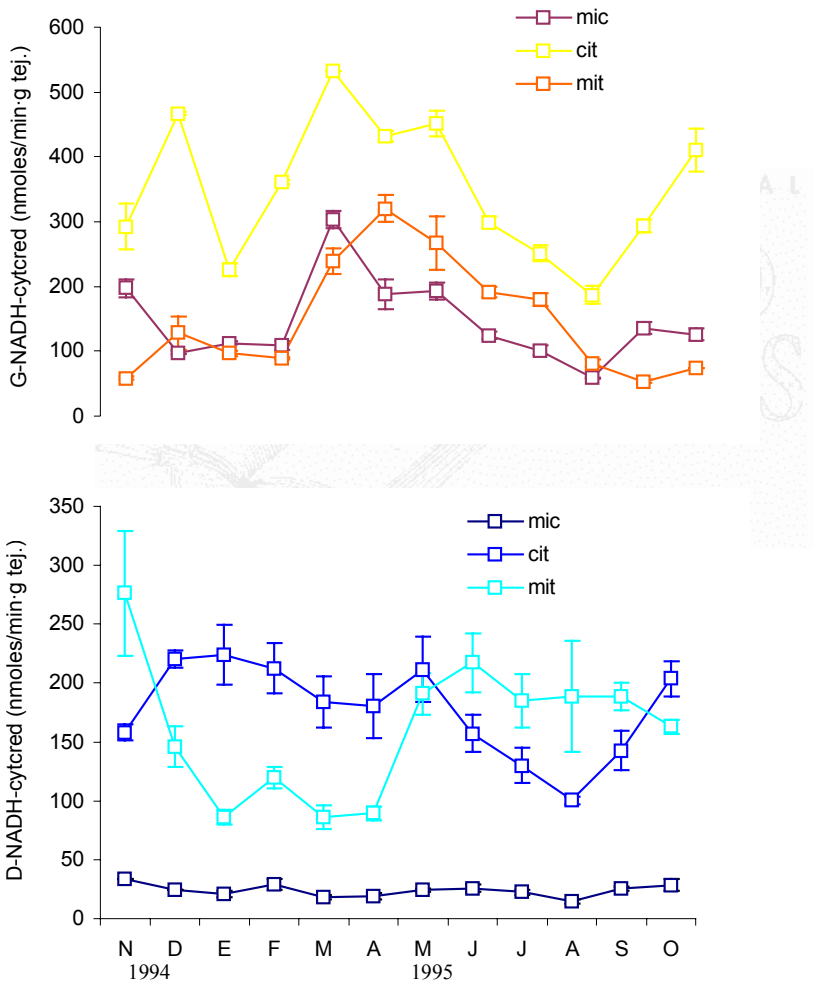


Fig. 4.5. Variación estacional de las actividades específicas (nmoles/min·g tejido fresco) de la **NADH-citocromo c reductasa** (cytcred) en las **fracciones subcelulares** (mic=microsomas, cit=citosol y mit=mitocondrias) de las **gónadas** (G) y del **contenido digestivo** (D) de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

Una situación análoga a las gónadas aparece en la **NADH-citocromo c reductasa del contenido digestivo** de *P. lividus*: mientras que la actividad por g de tejido fresco de la fracción citosólica es la mayoritaria, por mg de proteína son la microsomal y mitocondrial las que más contribuyen a la actividad enzimática (**Tabla 4.5**). Sin embargo ahora**,** los perfiles de variación estacional son inversos a los de las gónadas y, además, los niveles máximos y mínimos ya no coinciden para las distintas fracciones, observándose sólo la simultaneidad del máximo de microsomas y mitocondrias en noviembre de 1994 y del mínimo de microsomas y citosol en agosto de 1995 (**Fig. 4.5**).

Fecha	Frac. subc.	NADH-ferrired (nmoles/min·g tejido) Gónadas	NADH-ferrired (nmoles/min·g tejido) Contenido digestivo	NADH-ferrired (nmoles/min·mg proteína) Gónadas	NADH-ferrired (nmoles/min·mg proteína) Cont. digest.
22-11-94	mic	849,67 ± 86,46 (7,59%)	588,23 ± 56,60 (11,79%)	201,38 ± 13,25	584,10 ± 31,69
	cit	9008,71 ± 361,12 (80,53%)	2766,88 ± 307,34 (55,46%)	113,65 ± 12,08	201,80 ± 33,85
	mit	1328,98 ± 71,43 (11,88%)	1633,99 ± 261,44 (32,75%)	172,90 ± 11,34	455,78 ± 53,67
26-12-94	mic	1617,65 ± 213,67 (12,68%)	522,88 ± 32,68 (10,83%)	256,94 ± 34,68	420,23 ± 3,81
	cit	9673,20 ± 522,88 (75,80%)	3061,00 ± 368,93 (63,43%)	107,93 ± 5,85	205,08 ± 20,15
	mit	1470,59 ± 204,08 (11,52%)	1241,83 ± 86,46 (25,73%)	203,98 ± 7,50	218,88 ± 26,33
27-01-95	mic	2155,53 ± 98,71 (15,63%)	637,25 ± 28,30 (9,80%)	399,76 ± 54,17	483,00 ± 17,73
	cit	10294,12 ± 283,01 (74,65%)	4640,52 ± 226,41 (71,36%)	156,66 ± 13,61	234,90 ± 28,39
	mit	1339,87 ± 172,92 (9,72%)	1225,47 ± 84,89 (18,84%)	177,88 ± 13,74	266,40 ± 13,90
28-02-95	mic	3480,39 ± 49,02 (27,82%)	637,25 ± 28,30 (9,60%)	491,84 ± 62,29	219,24 ± 30,17
	cit	7657,95 ± 235,91 (61,21%)	4596,95 ± 93,07 (69,24%)	152,77 ± 5,06	262,34 ± 15,56
	mit	1372,55 ± 113,21 (10,97%)	1405,23 ± 172,93 (21,16%)	248,99 ± 31,74	165,39 ± 10,05
30-03-95	mic	5968,14 ± 228,50 (29,45%)	686,27 ± 56,60 (9,12%)	959,17 ± 53,61	241,89 ± 6,43
	cit	10163,40 ± 309,45 (50,15%)	5566,45 ± 179,33 (73,95%)	223,37 ± 4,23	271,50 ± 1,73
	mit	4133,99 ± 58,91 (20,40%)	1274,51 ± 0,00 (16,93%)	455,69 ± 22,22	232,60 ± 22,67
28-04-95	mic	2647,06 ± 98,04 (13,93%)	620,91 ± 32,68 (9,95%)	826,00 ± 47,26	311,04 ± 32,69
	cit	11895,42 ± 272,11 (62,60%)	3998,37 ± 517,90 (64,11%)	153,91 ± 14,91	212,09 ± 14,66
	mit	4460,78 ± 343,14 (23,47%)	1617,65 ± 254,71 (25,94%)	447,50 ± 14,87	377,62 ± 32,85
26-05-95	mic	2875,82 ± 345,85 (15,56%)	767,97 ± 43,23 (9,37%)	853,88 ± 94,67	592,48 ± 108,59
	cit	10555,56 ± 490,20 (57,12%)	5631,81 ± 728,87 (68,70%)	165,30 ± 28,80	398,06 ± 7,05
	mit	5049,02 ± 147,06 (27,32%)	1797,39 ± 235,66 (21,93%)	687,24 ± 61,14	476,75 ± 81,39
28-06-95	mic	1274,51 ± 0,00 (8,42%)	669,93 ± 43,23 (10,84%)	741,40 ± 70,89	1133,65 ± 17,23
	cit	9934,64 ± 302,32 (65,66%)	3404,14 ± 339,14 (55,07%)	276,91 ± 5,32	352,84 ± 64,18
	mit	3921,57 ± 449,27 (25,92%)	2107,84 ± 198,11 (34,10%)	548,75 ± 20,30	397,66 ± 65,45
21-07-95	mic	3137,25 ± 56,60 (23,03%)	522,88 ± 32,68 (8,92%)	718,61 ± 29,19	1171,70 ± 225,34
	cit	6367,10 ± 529,67 (46,74%)	3033,77 ± 363,46 (51,76%)	163,84 ± 3,35	320,21 ± 62,51
	mit	4117,65 ± 172,15 (30,23%)	2303,92 ± 102,04 (39,31%)	626,18 ± 5,22	678,23 ± 64,29
28-08-95	mic	796,57 ± 30,84 (6,22%)	653,59 ± 117,83 (12,40%)	415,27 ± 35,61	941,35 ± 108,81
	cit	9640,52 ± 117,83 (75,33%)	3572,98 ± 21,79 (67,77%)	219,60 ± 4,37	301,99 ± 44,85
	mit	2361,11 ± 180,29 (18,45%)	1045,75 ± 198,78 (19,83%)	294,33 ± 34,62	478,24 ± 133,31
26-09-95	mic	2156,86 ± 56,60 (20,81%)	620,91 ± 32,68 (9,84%)	346,09 ± 27,10	750,71 ± 29,39
	cit	6949,89 ± 447,02 (67,05%)	3137,25 ± 113,21 (49,74%)	117,24 ± 9,52	270,45 ± 16,78
	mit	1258,17 ± 81,70 (12,14%)	2549,02 ± 246,73 (40,41%)	281,16 ± 14,87	611,26 ± 29,04
30-10-95	mic	2712,42 ± 117,83 (26,14%)	571,89 ± 58,91 (10,17%)	445,38 ± 24,77	801,09 ± 34,96
	cit	6405,23 ± 130,72 (61,73%)	3169,93 ± 32,68 (56,39%)	124,52 ± 9,91	293,33 ± 17,76
	mit	1258,17 ± 16,34 (12,13%)	1879,09 ± 396,56 (33,43%)	197,26 ± 3,81	447,62 ± 36,59

Tabla 4.6. Variación estacional de las actividades específicas de la **NADH-ferricianuro reductasa** (NADH-ferrired), en nmoles/min·g tejido fresco y en nmoles/min·mg proteína, y del porcentaje sobre la actividad total (%), en las **fracciones subcelulares** (mic=microsomas, cit=citosol y mit=mitocondrias) de las **gónadas** y del **contenido digestivo** de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

De igual manera que en el caso de la enzima anterior, para **la NADH-ferricianuro reductasa de las gónadas** de *P. lividus* la fracción subcelular con mayor actividad por g de tejido fresco es la citosólica, que presenta entre un 46,74% y un 80,53% de la actividad total, mientras que por mg de proteína es la microsomal (**Tabla 4.6**). Al igual que la NADH-cytcred gonadal, la NADH-ferrired gonadal muestra un comportamiento estacional bastante homogéneo en las tres fracciones subcelulares, con máximos en los meses de primavera (entre marzo y mayo de 1995) y mínimos en verano (entre julio y septiembre de ese mismo año) (**Fig. 4.6**).

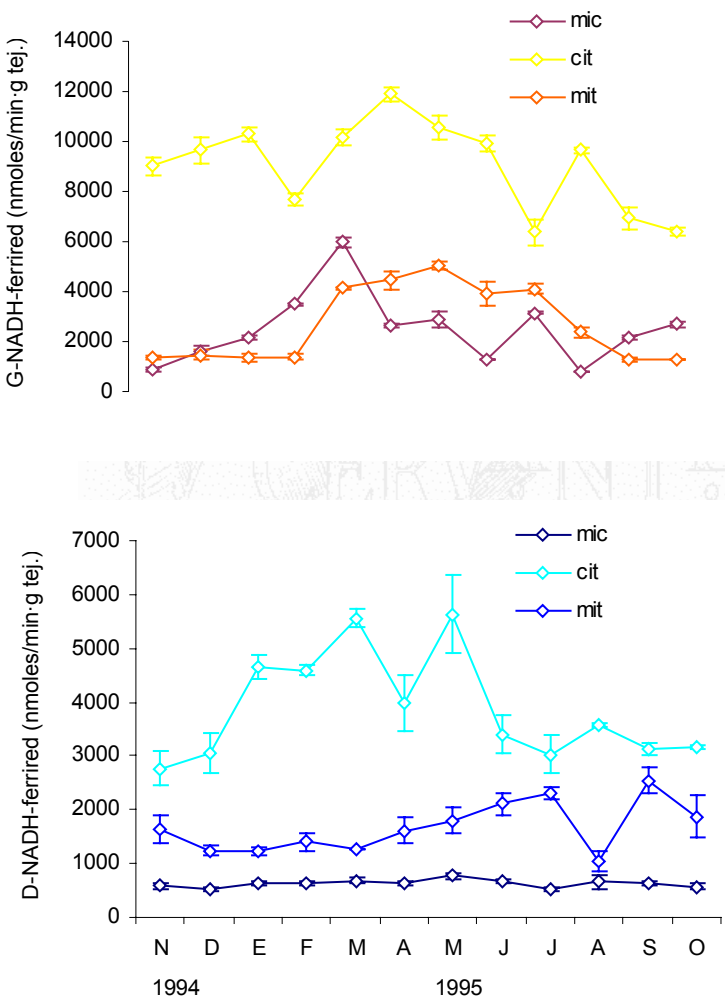


Fig. 4.6. Variación estacional de las actividades específicas (nmoles/min·g tejido fresco) de la **NADH-ferricianuro reductasa** (ferrired) en las **fracciones subcelulares** (mic=microsomas, cit=citosol y mit=mitocondrias) de las **gónadas** (G) y del **contenido digestivo** (D) de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

Por último, la **NADH-ferricianuro reductasa del contenido digestivo** de *P. lividus* muestra un comportamiento similar a la del tejido gonadal, siendo de nuevo el citosol el componente mayoritario de la actividad por g de tejido fresco (entre un 49,74% y un 73,95% de la actividad total) y los microsomas el de la actividad por mg de proteína **(Tabla 4.6).** En este caso, son los microsomas y el citosol los que tienen un perfil de variación estacional análogo, con mínimos en diciembre y noviembre de 1994, respectivamente, y máximos en mayo de 1995, mientras que las mitocondrias presentan los valores más altos de actividad en septiembre de 1995 y los más bajos, un 41% del máximo, en el mes anterior (**Fig. 4.6**).

4.3.3 Relación entre las actividades totales y de las fracciones subcelulares de las reductasas asociadas al sistema MFO

En la **Tabla 4.7** aparecen reflejadas las **relaciones entre el índice gonadal, los niveles de peroxidación lipídica y las actividades específicas totales de las reductasas de *P. lividus***, expresadas como nmoles/min·g tejido fresco. Es de destacar que las actividades de las reductasas gonadales por g de tejido fresco se correlacionan muy bien con el índice gonadal, especialmente la NADPH-citocromo c reductasa (r_s=0,853, p<0,001) y, en menor medida, la NADPH-ferricianuro y la NADH-citocromo c reductasas (r_s=0,594, 0,01<p<0,05 y r_s=0,664, 0,01<p<0,05, respectivamente); mientras que en el caso de las reductasas del digestivo, el índice gonadal sólo presenta una correlación significativa con la NADPH-cytcred (r_s=0,664, 0,01<p<0,05) y con la NADH-ferrired (r_s=0,608, 0,01<p<0,05).

Otro hecho que llama la atención en esta tabla es la buena correlación encontrada entre los niveles de lípidos peroxidizados y de lípidos susceptibles de peroxidación gonadales con la NADPH-citocromo c reductasa de este mismo tejido (r_s=0,643, 0,01<p<0,05 y r_s=0,629, 0,01<p<0,05, respectivamente). Por último, se debe mencionar el alto grado de similitud observado entre todas las reductasas del tejido gonadal: por un lado, entre las dos citocromo c reductasas (r_s=0,853, p<0,001) y las dos ferricianuro reductasas (r_s=0,811, p<0,001) y, por el otro, entre las NADPH-reductasas (r_s=0,734, 0,001<p<0,01) así como entre las NADH-reductasas (r_s=0,692, 0,01<p<0,05).

				G-NADPH		G-NADH		D-NADPH		D-NADH	
	G-LPX	**G-LSPX**	**D-LPX**	**cytcred**	**ferrired**	**cytcred**	**ferrired**	**cytcred**	**ferrired**	**cytcred**	**ferrired**
IG	0,769**	0,804**	0,531	0,853***	0,594*	0,664*	0,566	0,664*	0,399	-0,224	0,608*
G-LPX		0,867***	0,559	0,643*	0,112	0,475	0,196	0,524	0,392	-0,070	0,168
G-LSPX			0,427	0,629*	0,238	0,385	0,154	0,678**	0,580*	-0,210	0,315
D-LPX				0,350	0,238	0,287	0,566	0,224	0,343	-0,154	0,329
G-NADPH											
cytcred					0,734**	0,853***	0,678*	0,678*	0,378	-0,273	0,399
ferrired						0,629*	0,811***	0,427	0,217	-0,259	0,434
G-NADH											
cytcred							0,692*	0,406	0,182	-0,196	0,413
ferrired								0,252	0,182	-0,434	0,538
D-NADPH											
cytcred									0,615*	-0,028	0,189
ferrired										-0,510	-0,084
D-NADH											
cytcred											-0,252

*0,01<p<0,05, **0,001<p<0,01, ***p<0,001

Tabla 4.7. Matriz de los coeficientes de correlación de Spearman entre el **índice gonadal** (IG), los niveles de **peroxidación lipídica** (LPX=lípidos peroxidizados y LSPX=lípidos susceptibles de peroxidación) y las **actividades específicas totales** (nmoles/min·g tejido fresco) de las NAD(P)H citocromo c reductasas (cytcred) y de las NAD(P)H ferricianuro reductasas (ferrired) en las **gónadas** (G) y el **contenido digestivo** (D) de *P. lividus*.

La **Tabla 4.8** nos muestra las **relaciones entre las actividades específicas de las reductasas gonadales de *P. lividus* en las distintas fracciones subcelulares** (microsomal, citosólica y mitocondrial), expresadas como nmoles/min·g tejido fresco. Se observan, en primer lugar, correlaciones significativas entre distintas enzimas pertenecientes a una misma fracción subcelular, como es el caso de la encontrada entre la actividad de la NADPH-cytcred y de la NADH-cytcred del citosol (r_s=0,776, 0,001<p<0,01) o la observada entre la actividad de las dos ferricianuro reductasas también de la fracción citosólica (r_s=0,804, 0,001<p<0,01). En segundo lugar, es importante destacar las numerosas correlaciones encontradas entre las actividades de una misma enzima en distintas fracciones subcelulares, por ejemplo, entre la NADPH-cytcred citosólica y la mitocondrial (r_s=0,692, 0,01<p<0,05). Por último, ha de mencionarse la buena correlación observada entre la NADPH-ferrired citosólica y la NADH-cyctcred mitocondrial (r_s=0,860, p<0,001), que resulta ser la más alta de toda la tabla.

La **Tabla 4.9** nos muestra **las relaciones entre las actividades específicas de las reductasas del digestivo de *P. lividus* en las distintas fracciones subcelulares** (microsomal, citosólica y mitocondrial), expresadas como nmoles/min·g tejido fresco. En el contenido digestivo se encuentran, al igual que en las gónadas, muchas correlaciones entre las distintas enzimas de una misma fracción subcelular, tales como las observadas entre las citocromo c reductasas citosólicas (r_s=0,902, p<0,001). Asimismo, también se observan correlaciones significativas entre la actividad de una misma enzima en distintas fracciones subcelulares, por ejemplo, entre la actividad de la NADH-ferrired en los microsomas y en el citosol (r_s=0,815, p<0,001).

	G-NADPH					G-NADH					
	cytcred-cit	**cytcred-mit**	**ferrired-mic**	**ferrired-cit**	**ferrired-mit**	**cytcred-mic**	**cytcred-cit**	**cytcred-mit**	**ferrired-mic**	**ferrired-cit**	**ferrired-mit**
G-NADPH											
cytcred-mic	0,119	0,420	0,189	-0,301	-0,165	0,280	0,175	-0,245	0,559	-0,182	-0,312
cytcred-cit		0,692*	0,413	0,678*	0,228	0,315	0,776**	0,741**	0,482	0,671*	0,518
cytcred-mit			0,475	0,252	0,140	0,140	0,594*	0,357	0,378	0,287	0,119
ferrired-mic				0,014	0,469	-0,168	0,189	0,336	0,427	-0,028	0,228
ferrired-cit					0,266	0,098	0,531	0,860***	0,154	0,804**	0,799**
ferrired-mit						-0,497	-0,007	0,210	0,038	0.228	0,244
G-NADH											
cytcred-mic							0,448	0,196	0,294	0,343	0,151
cytcred-cit								0,517	0,503	0,364	0,382
cytcred-mit									0,378	0,699*	0,925
ferrired-mic										-0,070	0,315
ferrired-cit											0,606*

*0,01<p<0,05, **0,001<p<0,01, ***p<0,001

Tabla 4.8. Matriz de los coeficientes de correlación de Spearman de las **actividades específicas** (nmoles/min·g tejido fresco) de las NAD(P)H citocromo c reductasas (cytcred) y de las NAD(P)H ferricianuro reductasas (ferrired) en las **fracciones subcelulares** (mic=microsomas, cit=citosol y mit=mitocondrias) de las **gónadas** (G) de *P. lividus*.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

	D-NADPH					D-NADH					
	cytcred-cit	**cytcred-mit**	**ferrired-mic**	**ferrired-cit**	**ferrired-mit**	**cytcred-mic**	**cytcred-cit**	**cytcred-mit**	**ferrired-mic**	**ferrired-cit**	**ferrired-mit**
D-NADPH											
cytcred-mic	0,580*	0,294	0,053	-0,480	-0,161	0,161	-0,657*	0,685*	0,281	-0,266	0,273
cytcred-cit		-0,308	0,056	0,613	0,210	0,000	0,902***	-0,650*	-0,039	0,392	-0,489
cytcred-mit			-0,091	-0,028	0,003	0,315	-0,294	0,482	-0,369	-0,650*	-0,049
ferrired-mic				-0,330	-0,163	-0,067	0,081	0,175	0,190	0,098	0,270
ferrired-cit					0,732**	-0,240	0,340	-0,732**	-0,327	0,035	-0,532
ferrired-mit						-0,188	-0,147	-0,455	-0,271	-0,059	-0,038
D-NADH											
cytcred-mic							0,168	0,501	-0,280	-0,417	0,487
cytcred-cit								-0,503	0,035	0,427	-0,406
cytcred-mit									0,007	-0,468	0,524
ferrired-mic										0,815***	-0,214
ferrired-cit											-0,392

*0,01<p<0,05, **0,001<p<0,01, ***p<0,001

Tabla 4.9. Matriz de los coeficientes de correlación de Spearman de las **actividades específicas** (nmoles/min·g tejido fresco) de las NAD(P)H citocromo c reductasas (cytcred) y de las NAD(P)H ferricianuro reductasas (ferrired) en las **fracciones subcelulares** (mic=microsomas, cit=citosol y mit=mitocondrias) del **contenido digestivo** (D) de *P. lividus*.

4.3.4 Influencia *in vitro* de metales pesados sobre las reductasas asociadas al sistema MFO

4.3.4.1 Cobre (II)

	[Cu^{+2}] (µg/ml)						
	0	**3,125**	**6,25**	**12,5**	**25**	**50**	**100**
NADPH-cytcred	2,07 (0,05)	1,39 (0,14)	1,35 (0,10)	1,48 (0,20)	1,82 (0,08)	1,24 (0,65)	N.P.*
NADH-cytcred	5,19 (0,55)	3,66 (0,31)	3,43 (0,18)	2,92 (0,14)	2,62 (0,19)	2,65 (0,12)	N.P.*
NADPH-ferrired	36,06 (1,67)	17,52 (3,60)	16,59 (2,60)	16,02 (0,64)	13,30 (0,82)	15,24 (0,69)	N.P.*
NADH-ferrired	79,91 (2,27)	73,05 (3,85)	63,38 (4,99)	63,63 (5,64)	59,34 (1,95)	54,72 (2,59)	N.P.*

Tabla 4.10. Efecto del **cobre** (Cu) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y de las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones (N.P.*=actividad no perceptible).

En las cuatro enzimas estudiadas se aprecia una reducción gradual de la actividad enzimática con concentraciones crecientes de cobre (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$) (**Tabla 4.10**), produciéndose en todos los casos una inhibición total para una concentración de metal de 100 µg/ml.

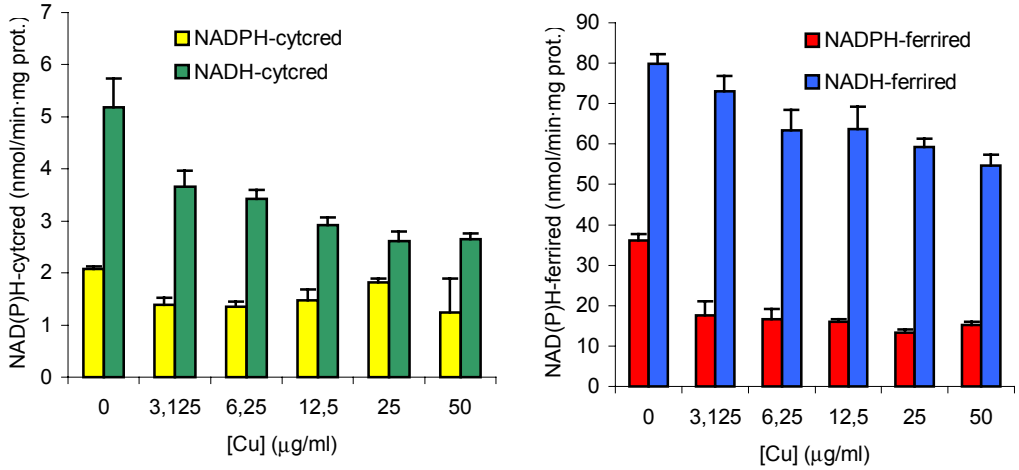


Fig. 4.7. Efecto del **cobre** (Cu) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

La enzima más sensible al cobre es la NADPH-ferrired, con un porcentaje de inhibición de un 58% para 50 µg/ml de cobre, mientras que la menos sensible

es la NADH-ferrired, con un porcentaje de inhibición de un 31% para la misma concentración de cobre (**Fig. 4.7**).

4.3.4.2 Cadmio

Al igual que en el caso del cobre, con el cadmio también se observa una inhibición total de la actividad enzimática al llegar a una cierta concentración del metal. Dicha inhibición aparece en las ferricianuro reductasas a concentraciones de tan sólo 25 μg/ml, mientras que en el caso de las citocromo c reductasas tiene lugar con concentraciones de cadmio de 100 μg/ml (**Tabla 4.11**).

	[Cd^{+2}] (μg/ml)								
	0	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**	**50**	**75**	**100**
NADPH -cytcred	1,75 (0,13)	---	1,61 (0,16)	---	---	1,23 (0,11)	0,76 (0,03)	0,45 (0,03)	N.P.*
NADH-cytcred	7,72 (0,47)	---	9,17 (0,29)	---	---	9,04 (0,33)	5,62 (0,33)	6,45 (0,63)	N.P.*
NADPH -ferrired	66,06 (6,93)	64,60 (4,45)	71,16 (2,58)	73,46 (2,49)	62,38 (4,82)	N.P.*	N.P.*	N.P.*	N.P.*
NADH-ferrired	140,25 (8,02)	148,86 (6,45)	151,07 (11,77)	167,89 (9,47)	153,77 (10,19)	N.P.*	N.P.*	N.P.*	N.P.*

Tabla 4.11. Efecto del **cadmio** (Cd) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y de las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones (N.P.*=actividad no perceptible).

También ha de destacarse el hecho de que en las ferricianuro reductasas, a concentraciones bajas del metal, los niveles de actividad se mantienen más o menos constantes (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$) y la inhibición enzimática aparece de forma brusca a una concentración de 25 μg/ml de cadmio; mientras que la NADPH-cytcred presenta un perfil similar al encontrado para el cobre, con una disminución progresiva de las actividades enzimáticas a medida que aumenta la concentración de cadmio, de manera que para una concentración de 75 μg/ml la inhibición es de un 74%. Por último en la NADH-cytcred se observa una ligera estimulación de la actividad enzimática a concentraciones bajas de cadmio,

mientras que a partir de 25 µg/ml empieza a aparecer una reducción de la actividad hasta de un 27% para una concentración de 50 µg/ml (**Fig. 4.8**).

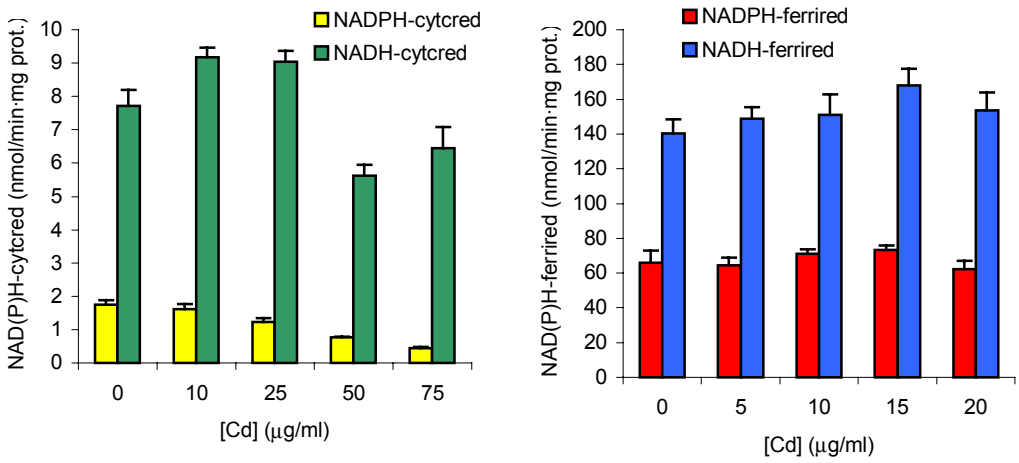


Fig. 4.8. Efecto del **cadmio** (Cd) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

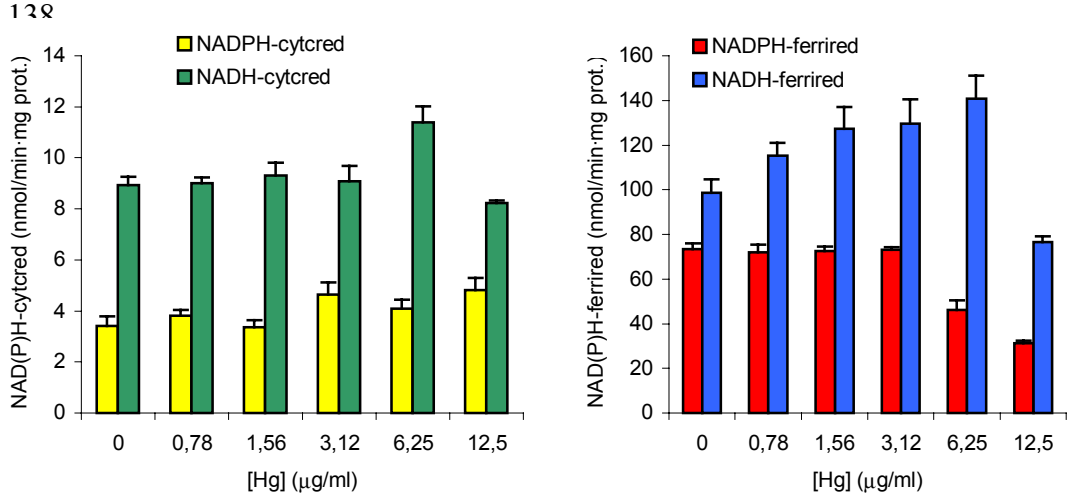
4.3.4.3 Mercurio (II)

El mercurio es, de los analizados, el metal que produce una inhibición más fuerte sobre las cuatro enzimas del estudio, ya que concentraciones del orden de 25 µg/ml son suficientes para provocar una completa inhibición de la actividad enzimática en todos los casos (**Tabla 4.12**).

	[Hg^{+2}] (µg/ml)						
	0	**0,78**	**1,56**	**3,12**	**6,25**	**12,5**	**25**
NADPH-cytcred	3,40 (0,40)	3,81 (0,22)	3,36 (0,28)	4,65 (0,47)	4,10 (0,33)	4,82 (0,47)	N.P.*
NADH-cytcred	8,93 (0,33)	9,01 (0,23)	9,30 (0,52)	9,08 (0,60)	11,40 (0,62)	8,23 (0,09)	N.P.*
NADPH-ferrired	73,37 (2,72)	71,85 (3,51)	72,41 (2,12)	73,22 (1,17)	46,17 (4,33)	31,12 (1,36)	N.P.*
NADH-ferrired	98,73 (6,03)	115,38 (5,69)	127,24 (9,94)	129,56 (10,89)	140,8 (10,23)	76,69 (2,42)	N.P.*

Tabla 4.12. Efecto del **mercurio** (Hg) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y de las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones (N.P.*=actividad no perceptible).

Al igual que en el caso del cadmio, el comportamiento de las enzimas frente al metal no es homogéneo: mientras que la NADPH-ferricianuro reductasa presenta, a partir de una concentración de 3,12 µg/ml de mercurio, un descenso gradual de la actividad hasta un porcentaje de inhibición del 58% (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$), la NADPH-cytcred sufre una estimulación con



concentraciones de mercurio menores de 6,25 µg/ml, manteniéndose los niveles de actividad a partir de dicha concentración y las NADH-reductasas muestran aumentos de actividad con las concentraciones de metal más bajas y una posterior disminución de los valores de dicha actividad para una concentración de 12,5 µg/ml de mercurio (**Fig. 4.9**).

Fig. 4.9. Efecto del **mercurio** (Hg) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

4.3.4.4 Plomo (II)

	$[Pb^{+2}]$ (µg/ml)						
	0	**12,5**	**25**	**50**	**100**	**200**	**500**
NADPH-cytcred	4,89 (0,18)	5,87 (0,48)	5,47 (0,37)	4,97 (0,43)	4,87 (0,55)	5,18 (0,92)	N.P.*
NADH-cytcred	7,69 (0,37)	8,90 (0,43)	7,37 (0,08)	8,32 (0,60)	8,14 (0,17)	8,58 (1,09)	N.P.*
NADPH-ferrired	77,59 (7,51)	66,27 (6,39)	52,61 (6,22)	29,76 (1,36)	32,63 (4,23)	29,72 (1,81)	N.P.*
NADH-ferrired	103,12 (5,20)	96,48 (7,95)	99,45 (0,97)	92,25 (7,28)	106,32 (12,83)	82,59 (16,37)	N.P.*

Tabla 4.13. Efecto del **plomo** (Pb) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y de las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones (N.P.*=actividad no perceptible).

A diferencia del mercurio, el plomo es el metal mejor tolerado por las reductasas objeto del presente estudio, ya que se pueden medir actividades enzimáticas hasta una concentración de metal de 200 µg/ml, apreciándose a dicha concentración la inhibición completa de todas las enzimas (**Tabla 4.13**).

La NADPH-ferrired es la única enzima que presenta una reducción gradual de su actividad hasta una concentración de 50 µg/ml de metal, manteniéndose un grado de inhibición del orden del 60% entre 50 y 200 µg/ml de plomo. Sin embargo, las citocromo c reductasas muestran sólo ligeras variaciones en sus actividades hasta una concentración de 200 µg/ml (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$), produciéndose la inhibición total de forma brusca con 500 µg/ml de plomo. Por último, en la NADH-ferrired se observan niveles constantes de actividad hasta 100 µg/ml de mercurio, mientras que con 200 µg/ml de metal ya se aprecia una inhibición enzimática del 20% (**Fig. 4.10**).

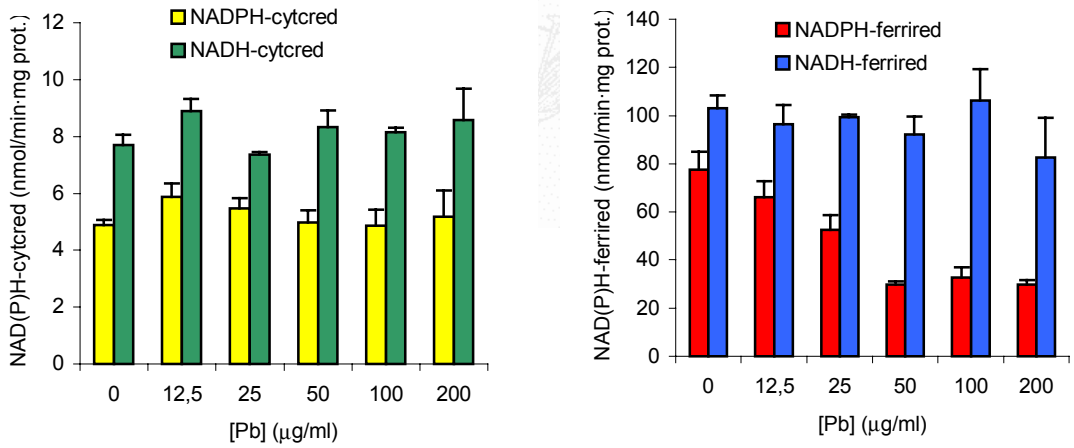


Fig. 4.10. Efecto del **plomo** (Pb) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

4.3.5 Influencia *in vitro* de xenobióticos sobre las reductasas asociadas al sistema MFO

4.3.5.1 Menadiona

La menadiona produce, en general, un efecto estimulatorio en las actividades de todas las enzimas objeto de estudio, excepto en la NADH-ferrired, donde se aprecia una disminución de actividad del 19% para una concentración de MD de 1000 µM (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$) (**Tabla 4.14**).

	[MD] (µM)					
	0	**125**	**250**	**500**	**750**	**1000**
NADPH-cytcred	1,41 (0,10)	3,32 (0,50)	3,86 (0,49)	5,56 (0,89)	6,07 (0,87)	7,60 (0,10)
NADH-cytcred	8,17 (1,33)	9,60 (0,23)	12,63 (0,72)	15,96 (1,42)	17,55 (2,02)	25,85 (4,29)
NADPH-ferrired	83,84 (6,24)	92,06 (6,68)	103,31 (5,49)	98,90 (2,60)	107,70 (6,14)	101,82 (9,75)
NADH-ferrired	165,50 (18,16)	180,51 (17,94)	171,58 (26,33)	166,27 (17,00)	175,24 (18,09)	134,61 (3,03)

Tabla 4.14. Efecto de la **menadiona** (MD) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y de las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones.

La enzima que parece ser más sensible al efecto de la menadiona es la NADPH-cytcred, ya que para la concentración máxima de menadiona ensayada sus valores de actividad son 5,4 veces superiores a los obtenidos en ausencia de dicho xenobiótico (**Fig. 4.11**). Es de destacar, además, el mayor grado de estimulación en presencia de MD de las citocromo c reductasas frente a las ferricianuro reductasas.

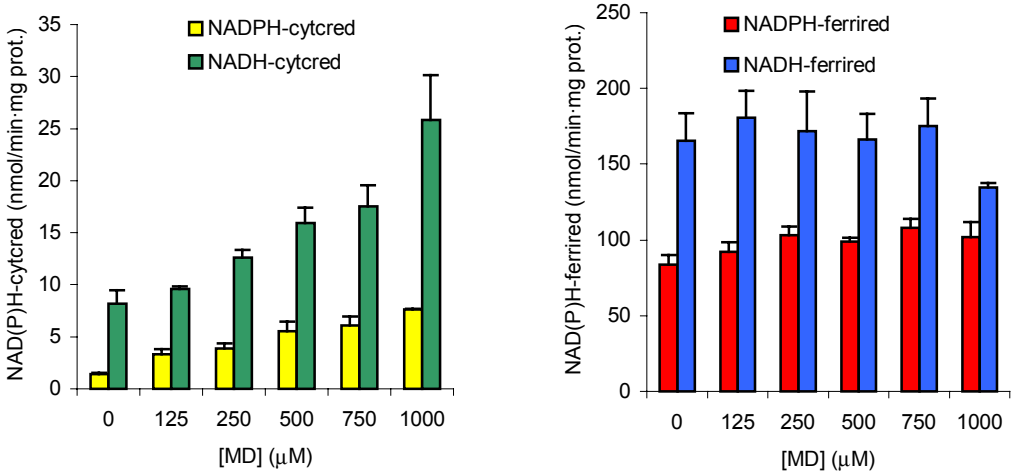


Fig. 4.11. Efecto de la **menadiona** (MD) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

4.3.5.2 Paraquat

En el caso del paraquat, el comportamiento de las enzimas es bastante distinto al observado en presencia de menadiona: mientras que la NADPH-cytcred no sufre cambios apreciables en su actividad, las otras tres se ven estimuladas por este xenobiótico (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$) (**Fig. 4.12**).

	[PQ] (μM)					
	0	**250**	**500**	**1000**	**1500**	**2000**
NADPH-cytcred	1,61 (0,21)	1,69 (0,15)	1,50 (0,13)	1,88 (0,09)	1,79 (0,01)	1,37 (0,17)
NADH-cytcred	6,72 (0,75)	10,44 (0,33)	11,78 (0,34)	14,14 (0,19)	16,25 (0,62)	15,56 (0,72)
NADPH-ferrired	53,28 (4,19)	56,73 (3,35)	61,42 (6,37)	72,16 (2,27)	69,51 (2,43)	70,43 (0,81)
NADH-ferrired	130,36 (2,73)	165,06 (13,54)	235,38 (5,91)	208,06 (5,85)	249,71 (6,93)	198,11 (6,94)

Tabla 4.15. Efecto del **paraquat** (PQ) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y de las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus.* Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones.

La NADH-cytcred es la enzima que sufre una mayor estimulación por efecto del paraquat, presentando su máxima actividad para una concentración de 1500 μM de xenobiótico, actividad que se mantiene en presencia de la máxima concentración de PQ analizada (**Tabla 4.15**).

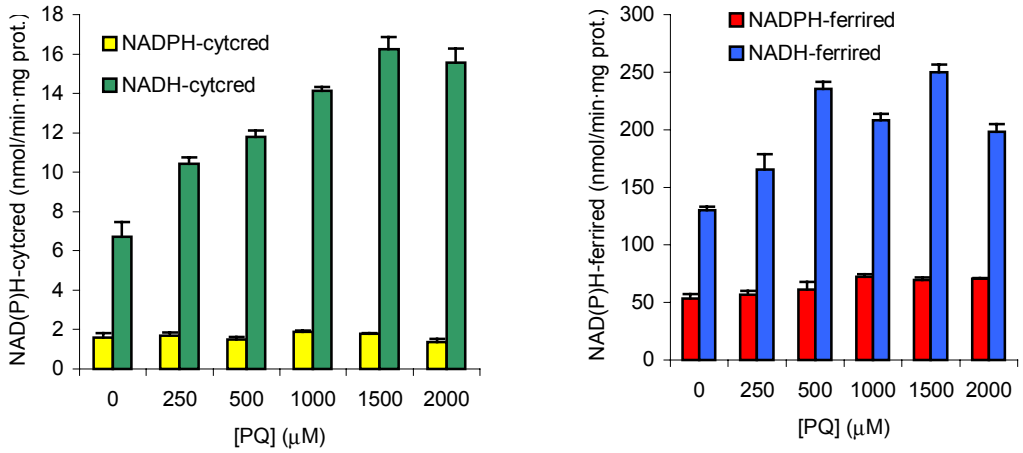


Fig. 4.12. Efecto del **paraquat** (PQ) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

4.3.5.3 Nitrofurantoína

El comportamiento de la nitrofurantoína es similar al apreciado con la menadiona: mientras que se observa un efecto estimulatorio en las citocromo c reductasas y en la NADPH-ferrired, en la NADH-ferrired se produce una inhibición del 12% para la máxima concentración analizada (ANOVA de una sola vía, $p<0,05$) (**Fig. 4.13**).

	[NF] (µM)					
	0	**31,25**	**62,5**	**125**	**250**	**500**
NADPH-cytcred	2,32 (0,13)	2,72 (0,42)	2,86 (0,39)	2,92 (0,33)	3,82 (0,08)	4,08 (0,24)
NADH-cytcred	4,28 (0,20)	4,33 (0,32)	4,59 (0,19)	4,89 (0,25)	5,03 (0,09)	5,32 (0,15)
NADPH-ferrired	65,01 (1,61)	88,31 (6,13)	82,05 (4,57)	98,15 (3,80)	79,23 (3,80)	78,59 (4,78)
NADH-ferrired	109,58 (6,22)	91,45 (6,20)	86,11 (5,18)	92,20 (3,71)	107,64 (7,50)	96,08 (7,59)

Tabla 4.16. Efecto de la **nitrofurantoína** (NF) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y de las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones.

Cabe destacar que, mientras en el caso de las dos citocromo c reductasas este aumento de los niveles de actividad es continuo hasta la concentración máxima de NF de 500 µM, la mayor actividad para la NADPH-ferrired (98,15) se obtiene con una concentración de NF de 125 µM, observándose unos niveles menores de actividad a concentraciones mayores de xenobiótico.

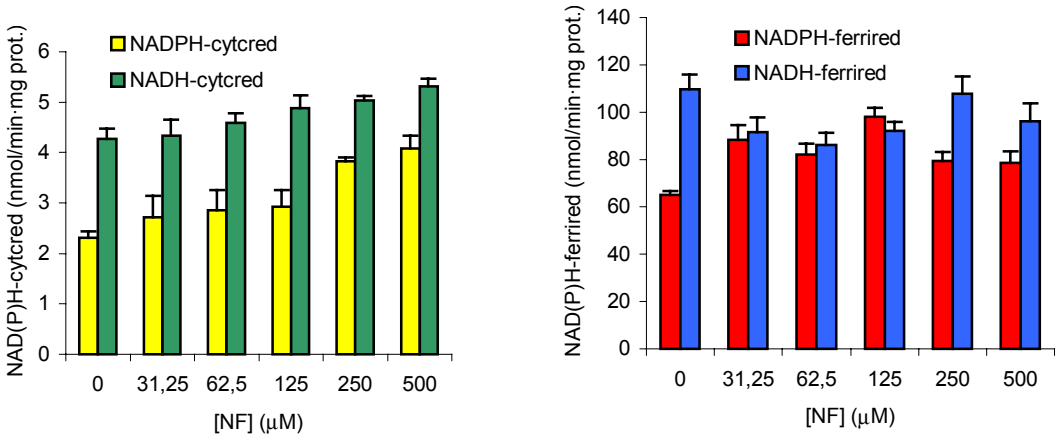


Fig. 4.13. Efecto de la **nitrofurantoína** (NF) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

Nuevamente, al igual que en el caso de la menadiona, la enzima más sensible al efecto de la nitrofurantoína parece ser la NADPH-cytcred, que presenta niveles de actividad para una concentración de NF de 500 µM unas 1,8 veces superiores a los observados en ausencia de xenobiótico (**Tabla 4.16**).

4.3.5.4 Benzo(a)pireno

	[BaP] (µM)					
	0	**31,25**	**62,5**	**125**	**250**	**500**
NADPH-cytcred	1,60 (0,07)	1,48 (0,06)	1,55 (0,07)	1,68 (0,01)	1,71 (0,19)	2,09 (0,09)
NADH-cytcred	3,88 (0,20)	3,97 (0,14)	4,34 (0,04)	4,34 (0,14)	4,82 (0,06)	4,87 (0,15)
NADPH-ferrired	63,83 (1,07)	62,65 (0,58)	61,05 (4,45)	64,73 (5,93)	65,64 (1,75)	61,72 (0,56)
NADH-ferrired	117,17 (4,56)	116,72 (3,60)	117,29 (2,23)	115,34 (1,18)	109,38 (2,11)	91,28 (1,64)

Tabla 4.17. Efecto del **benzo(a)pireno** (BaP) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y de las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media (e.s.) para 4 determinaciones.

El comportamiento de las diferentes reductasas frente al benzo(a)pireno no es homogéneo. En primer lugar, la NADPH-ferrired no resulta apenas afectada ANOVA de una sola vía, $p<0,05$) (**Tabla 4.17**).

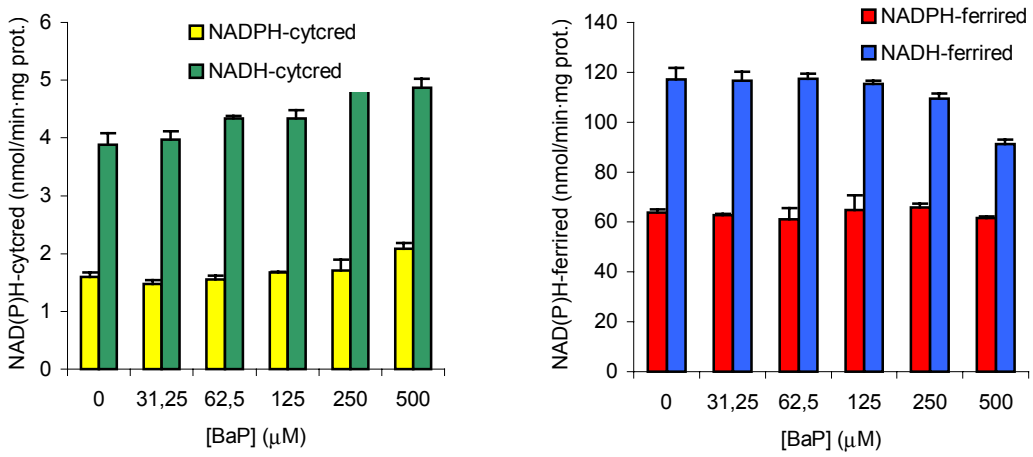


Fig. 4.14. Efecto del **benzo(a)pireno** (BaP) sobre las **actividades específicas** (nmoles/min·mg proteína) de las citocromo c reductasas (cytcred) y las ferricianuro reductasas (ferrired) en las gónadas de *P. lividus*. Los resultados son la media ± e.s. para 4 determinaciones.

Sin embargo, en las citocromo c reductasas se produce una estimulación de la actividad prácticamente del mismo orden, siendo los valores de dicha actividad para una concentración de BaP de 500 μM entre un 25% y un 30% superiores a los medidos en ausencia de xenobiótico (**Fig. 4.14**).

Respecto a la NADH-ferrired, se observa una inhibición a partir de una concentración de xenobiótico de 125 μM, al igual que en el caso de la nitrofurantoína y la menadiona, que es del orden del 22% para la máxima concentración analizada.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

4.4 DISCUSIÓN

4.4.1 Niveles de actividad totales y de las fracciones subcelulares de las reductasas asociadas al sistema MFO

En primer lugar, deben mencionarse las dificultades encontradas al intentar medir el citocromo P450, uno de los componentes principales del sistema MFO, en el erizo de mar, *P. lividus*. Problemas similares tuvieron Wenning y Di Giulio (1988) al tratar de medir dicho citocromo en los moluscos *Geukensia demissa* y *Rangia cuneata* y los atribuyeron tanto a la alta inestabilidad del citocromo P450 asociada al manejo de los ejemplares y a la preparación de las muestras como a la presencia de enzimas digestivas inhibidoras de su actividad metabolizante. Teniendo en cuenta que, a pesar de los intentos, hasta el momento no se ha determinado la presencia del citocromo P450 en erizos de mar (Den Besten *et al*., 1990) y que, además, dicho citocromo no parece jugar un papel significativo en el ciclo redox de producción de O_2^- por parte de xenobióticos (ver **Introducción**), se optó por centrar el presente estudio en las actividades de las reductasas asociadas al sistema MFO, dejando el análisis del citocromo P450 en *P. lividus* para estudios posteriores.

Además, es necesario destacar el hecho de que, en la mayor parte de los estudios realizados sobre el sistema MFO, se analizó únicamente la fracción microsomal, donde se encuentra el mayor porcentaje de actividad, puesto que el sistema de monoxigenasa de función mixta se supone que se encuentra ligado al retículo endoplasmático, que sedimenta con dicha fracción. Por tanto, a la hora de comparar niveles de actividad de las reductasas de *P. lividus* con las medidas en otras especies, sólo se pudieron emplear las actividades microsomales, expresadas como nmoles/min·mg proteína, tal y como se expone en la **Tabla 4.I**.

Los valores de actividad microsomal medidos para la **NADPH-cytcred en las gónadas** de *P. lividus* son entre 2 y 10 veces inferiores a los observados en el mismo órgano de *Echinus sculentus* y entre 20 y 90 veces inferiores a los medidos en las gónadas de *Asterias rubens* (Den Besten *et al.*, 1990). En cambio, al analizar los niveles de actividad microsomal de la **NADPH-cytcred en el contenido digestivo**, los valores máximos son tan sólo un 19% inferiores a los medidos en los ciegos pilóricos de *A. rubens* (Den Besten *et al*., 1990).

Especie	Tejido	NADPH-cytcred	NADPH-ferrired	NADH-cytcred	NADH-ferrired	Cita
Mytilus edulis	Gl. digestiva Branquias	12,4 ± 1,3 5,0 ± 0,3	7,6 ± 2,1 32,1 ± 3,0	119,2 ± 2,1 68,0 ± 4,3	818,6± 33,1 724,1 ± 52,5	Livingstone y Farrar (1984)
Carcinus aestuarii	Hepatopáncr. Branquias	18 ± 2 ---	--- ---	80 ± 40 ---	1200 ± 200 35 ± 5	Fossi *et al*. (1997)
Asterias rubens	Cieg. pilóric. Gónadas Estómago	10,6 ± 1,1 47,0 ± 4,9 4,8 ± 0,7	--- --- ---	341,6 ± 56,7 580,8 ± 116,9 161,1 ± 20,1	2048 ± 269 4324 ± 668 1133 ± 185	Den Besten *et al*. (1990)
Marthasterias glacialis	Cieg. pilóric.	12,4 ± 5,7	---	44,1 ± 12,8	482 ± 131	Den Besten *et al*. (1990)
Holoturia forskali	Plexo hemal	13,0 ± 0,9	---	79,6 ± 15,0	715 ± 106	Den Besten *et al*. (1990)
Echinus sculentus	Gónadas	5,6 ± 1,9	---	26,1 ± 13,7	207 ± 85	Den Besten *et al*. (1990)
Paracentrotus lividus	Gónadas Cont. digest.	0,5-2,5 1,9-8,6	11,8-33,7 20,7-63,0	12,3-45,1 7,0-42,9	201,4-959,2 219,2-1171,7	Presente estudio

Tabla 4.I. Tabla comparativa de las **actividades específicas microsomales** (nmoles/min·mg proteína) de las **enzimas componentes del sistema MFO** (cytcred=citocromo c reductasa y ferrired=ferricianuro reductasa) en distintas especies de **organismos acuáticos**.

Sólo se han encontrado referencias de la **NADPH-ferrired** microsomal en el mejillón *M. edulis* (Livingstone y Farrar, 1984), siendo sus valores de actividad en la glándula digestiva entre 1,5 y 4,4 veces inferiores a los encontrados **en las gónadas** de *P. lividus* en el presente estudio y entre 2,7 y 8,3 veces menores a los medidos **en el contenido digestivo** de dicho animal.

Las actividades microsomales medias encontradas para la **NADH-cytcred gonadal** en *P. lividus* son del mismo orden que las medidas en las gónadas de *E. sculentus* y entre 10 y 20 veces inferiores a las observadas en las gónadas de *A. rubens* (Den Besten *et al.*, 1990). Mientras tanto, las actividades microsomales máximas de dicha enzima **en el contenido digestivo** de *P. lividus* son del mismo orden que las correspondientes a los ciegos pilóricos de *Marthasterias glaciaris,* unas 8 veces inferiores a las medidas en el mismo órgano de *A. rubens* (Den Besten *et al.*, 1990) y un 64% menores que las obtenidas en la glándula digestiva de *M. edulis* (Livingstone y Farrar, 1984).

Por último, es necesario destacar que la actividad enzimática mínima de la **NADH-ferrired** encontrada en los microsomas **de las gónadas** de *P. lividus* es similar a la medida en el mismo órgano de *E. sculentus*, mientras que la máxima es unas 4 veces inferior a la observada en las gónadas de la estrella de mar *A.*

rubens (Den Besten *et al.*, 1990). Respecto a los valores de la actividad de dicha enzima **en el contenido digestivo** de *P. lividus*, estos son entre 2 y 10 veces menores que los medidos en los ciegos pilóricos de *A. rubens* y entre un 73% inferiores y un 43% superiores que los encontrados en la glándula digestiva de *M. edulis* (Livingstone y Farrar, 1984).

Al analizar las **actividades enzimáticas totales de las reductasas** en *P. lividus*, se observa que las NADH-reductasas presentan una actividad más elevada que sus correspondientes NADPH-reductasas, siendo en las gónadas esta relación entre 3,5 y 7 veces en el caso de las dependientes de citocromo c y entre 9 y 10,5 veces en el caso de las dependientes de ferricianuro. Dicho fenómeno ya se apreció en otros estudios, como el realizado por Livingstone y Farrar (1984) en *M. edulis*, donde se observó que las actividades de las NADH-reductasas eran mucho mayores que las correspondientes a mamíferos, atribuyéndose este hecho a que las enzimas reductasas que intervienen el metabolismo de compuestos orgánicos en invertebrados serían de una naturaleza más primitiva que las presentes en vertebrados.

En cuanto a la **distribución subcelular de las actividades de las reductasas**, expresadas por g de tejido, se observa un fuerte predominio de la actividad citosólica, tanto en las gónadas como en el contenido digestivo de *P. lividus*. Los resultados obtenidos son similares a los observados en la glándula digestiva de *M. edulis* por Livingstone y Farrar (1984), que explicaban la baja actividad microsomal obtenida en contra de lo esperado inicialmente por dos razones: por un lado, parte de los microsomas cosedimentarían con la fracción mitocondrial a 12.000 *g* y, por el otro, durante el proceso de homogeneización y extracción habría una pérdida de material desde el retículo endoplasmático hacia el citosol. Asimismo, en el estudio de fraccionamiento subcelular realizado por Den Besten *et al.* (1990) en los ciegos pilóricos de *A. rubens* tuvieron también un problema de contaminación de microsomas en la fracción citosólica. Estas hipótesis estarían avaladas en *P. lividus* por la existencia de fuertes correlaciones entre las fracciones subcelulares, como es el caso de las encontradas entre las mitocondrias y el citosol en la NADPH-cytcred gonadal o entre los microsomas y el citosol en la NADH-ferrired del contenido digestivo (ver **Figs. 4.3** y **4.6**).

Además, al expresar las actividades enzimáticas de las fracciones subcelulares de *P. lividus* por mg de proteína, se observa que dichas actividades son más similares, lo cual evidenciaría que en el citosol, donde la cantidad de proteína medida es mucho mayor que la de las otras dos fracciones, se habría producido una contaminación durante el proceso de homogeneización y fraccionamiento. Para completar dicho estudio, sería necesaria la caracterización subcelular de dichas enzimas por otros métodos, tales como el empleo de enzimas marcadores y el uso de microscopía electrónica. Sin embargo, en el presente trabajo se optó por no continuar con dicha caracterización, puesto que el objetivo principal era el de la evaluación del posible uso de biomarcadores en *P. lividus* y no su caracterización completa, dejando entonces dicho análisis de las fracciones subcelulares para estudios posteriores.

BIBLIOTECA VIRTUAL

4.4.2 Variación estacional de la actividad de las reductasas asociadas al sistema MFO

La coincidencia en el perfil estacional de la NADH-citocromo c reductasa y de la NADH-ferricianuro reductasa en las gónadas de *P. lividus* (ver **Fig. 4.2**) es un indicio de que ambas son actividades específicas de la NADH-citocromo b_5 reductasa, tal y como ya fue comprobado en el caso del mejillón *M. edulis* (Kirchin *et al*., 1992). De forma análoga, también se observa una gran similitud entre los perfiles de variación estacional de la NADPH-citocromo c reductasa y de la NADPH-ferricianuro reductasa de las gónadas de *P. lividus* (ver **Fig. 4.1**), lo que indicaría que ambas serían un reflejo de la actividad de la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa.

Esta variación estacional en la actividad de las enzimas reductasas asociadas al sistema MFO es consecuencia de multitud de factores, tanto de tipo exógeno (temperatura, biodisponibilidad de alimento) como de tipo endógeno (hormonas esteroideas, PUFA, estado reproductivo).

Uno de los factores que sin duda influye en mayor grado en esta variación estacional de la actividad del sistema MFO es **la temperatura**. El efecto que ejerce, denominado compensación positiva por temperatura (a menor temperatura, mayor actividad del sistema), fue observado por primera vez en peces aclimatados

a aguas frías (Ankley *et al*., 1985). En invertebrados marinos también se encontró un efecto similar en un estudio realizado en *M. galloprovincialis*: se producía un descenso en las actividades del sistema MFO cuando la temperatura empezaba a aumentar (Solé *et al*., 1995). Sin embargo, en otro estudio en glándula digestiva de mejillón *M. edulis,* se observó el efecto contrario: los descensos de los componentes del sistema MFO tuvieron lugar entre finales del invierno y principios de la primavera, coincidiendo con la temperatura mínima del agua (Kirchin *et al*., 1992). Se cree que lo que podría determinar la temperatura óptima del sistema MFO sería la composición de los fosfolípidos de membrana que rodean el lugar activo del citocromo P450 unido a la membrana (Gurumurthy y Mannering, 1985), de manera que cambios en la temperatura ambiental provocarían alteraciones en la **composición de los PUFA** integrantes de los fosfolípidos y, por tanto, afectarían a la actividad del sistema MFO. En el presente estudio realizado en *P. lividus* no se ha llevado a cabo un estudio de temperaturas, pero lo que sí se puede observar es que las reductasas del sistema MFO presentan dos picos de actividad máxima (uno en diciembre y otro en marzo-abril), que coinciden con las épocas del año con temperaturas menores, por lo que la compensación positiva por temperatura sobre la actividad de dicho sistema parece un hecho bastante probable. Además, las gónadas de *P. lividus* contienen un alto porcentaje de PUFA (De la Cruz-García *et al*., 2000), lo cual reforzaría la hipótesis de una posible relación entre temperatura, estructura de la membrana y actividad del sistema MFO.

También se ha comprobado la influencia que ejercen **las hormonas sexuales** y **el ciclo reproductivo** sobre la actividad del sistema MFO. Así, por ejemplo, en los ciegos pilóricos de la estrella de mar *Asterias rubens*, se comprobó la coincidencia entre los niveles máximos de citocromo P450 y el inicio de la síntesis de hormonas esteroideas, necesarias para la regulación de la gametogénesis (Den Besten, 1998). Además se ha apuntado un posible efecto indirecto de las hormonas esteroideas sobre el sistema MFO y que sería consecuencia de la ruptura, reabsorción y reordenamiento general que acompañaría al desove inducido por dichas hormonas, que provocaría un descenso en las actividades enzimáticas (Lowe *et al.*, 1982). Recientemente, se ha demostrado la influencia de las hormonas esteroideas en el ciclo reproductivo de

los equinoideos, concretamente en el erizo de mar, *Lytechinus variegatus*, proponiéndose un mecanismo paracrino para la movilización de nutrientes desde los fagocitos nutritivos hasta las células gametogénicas (Wasson *et al*., 2000). Por tanto, parece claro que en el ciclo gonadal del erizo de mar, *P. lividus*, también intervendrán dichas hormonas esteroideas, que estarán reguladas a su vez por el sistema MFO (ver **Introducción**). Esta hipótesis estaría avalada por las buenas correlaciones encontradas entre el índice gonadal y las actividades totales de las reductasas gonadales (ver **Tabla 4.7**).

Al igual que otros parámetros bioquímicos, el sistema MFO se puede ver afectado por **la composición de la dieta**, así como por **la biodisponibilidad de alimento**, factores que sufren variaciones a lo largo del año debido a parámetros abióticos tales como la luz o la temperatura. Respecto a la composición de la dieta, debe destacarse que puede contener tanto activadores como inhibidores del sistema MFO, habiéndose comprobado además la influencia sobre la actividad monoxigenasa de factores tales como el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados o de hierro procedente de la dieta (Bucheli y Fent, 1995). Con respecto a la biodisponibilidad de alimento, se han realizado estudios en peces donde se comprobó la coincidencia del pico máximo de actividad del sistema MFO con la época de alimentación intensiva y del pico mínimo con el período de alimentación esporádica, justo después del desove (George *et al*., 1990). De forma análoga, en el presente estudio realizado en las gónadas de *P. lividus*, aparecen las actividades más altas en el período de acumulación de reservas (en marzo-abril) y las más bajas durante el desove (en agosto), cuando las demandas nutritivas son menores.

Debe mencionarse la buena correlación encontrada entre los niveles de **peroxidación lipídica** y la actividad total de la **NADPH-cytcred en las gónadas** de *P. lividus*, lo que podría ser una evidencia de la relación entre la producción de oxirradicales por dicha enzima (posible biomarcador de exposición) y la aparición de la peroxidación lipídica (posible biomarcador de efecto).

Respecto a la **variación estacional de las reductasas en el contenido digestivo** de *P. lividus*, ha de señalarse que es mucho menos evidente que la

encontrada en las gónadas de dicho animal. Puesto que no existe trasvase de energía entre las gónadas y el contenido digestivo de *P. lividus* (ver **capítulo 2**), los factores que influirían en dicha variación serían los de tipo ambiental, tales como la temperatura o la biodisponibilidad de alimento.

4.4.3 Influencia *in vitro* de metales pesados sobre las reductasas asociadas al sistema MFO

Es bien conocido el efecto inhibitorio que ejercen generalmente los metales pesados sobre los distintos componentes del sistema MFO, tanto en peces (Viarengo *et al*., 1997) como en invertebrados marinos (Manelis *et al*., 1993). Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con algunos de estos estudios precedentes realizados en organismos acuáticos (ver **Tabla 4.II**).

Especie	Met. pesado	Tratamiento	Influencia sobre el sist. MFO	Cita
Dicentrarchus labrax	Cu^{+2}	-*In vivo* (15 días). 1 mg disuelto en agua en inyección. -*In vitro*. 1-2 mM en medio.	NADPH-citocromo P450: ↓	Stien *et al.* (1997)
Asterias rubens	Cd^{+2}	*In vivo* (3 meses). 25 µg/l en agua.	NADPH-cytcred:=	Den Besten *et al*. (1991)
Monodonta turbinata	Cd^{+2} Hg^{+2}	*In vivo.* 1 ppm (Cd) y 0,1 ppm (Hg) en agua.	NADPH-cytcred:↓	Manelis *et al*. (1993)
Carcinus aestuarii	Hg^{+2}	*In vivo* (3 días). 1-10 µg disuelto en DMSO en inyec.	NADPH-cytcred:= NADH-cytcred: = NADH-ferrired: ↑	Fossi *et al*. (1997)
Paracentrotus lividus	Cu^{+2} Cd^{+2} Hg^{+2} Pb^{+2}	*In vitro.* 3,12-50 µg/ml (Cu), 5-75 µg/ml (Cd), 0,8-12,5 µg/ml (Hg) y 12,5-200 µg/ml (Pb) en medio.	NADPH-cytcred:↓ NADPH-ferrired:↓ NADH-cytcred: ↓ NADH-ferrired: ↓	Presente estudio

Tabla 4.II. Tabla comparativa de los efectos de los **metales pesados** (Cu=cobre, Cd=cadmio, Hg=mercurio y Pb=plomo) sobre **las enzimas componentes del sistema MFO** (↑: aumento, =: no afecta, ↓: disminución) en distintas especies de **organismos acuáticos**.

4.4.3.1 Influencia del cobre (II)

Se ha demostrado la influencia negativa que ejerce el cobre sobre los distintos componentes del sistema MFO en diversos organismos vivos, tal y como es el caso del estudio realizado por Stien *et al*. (1997) en el pez *Dicentrarchus*

labrax. En dicho estudio comprobaron el efecto inhibitorio que el cobre ejercía, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre el citocromo P450 y la NADPH-citocromo P450 reductasa. El efecto provocado sobre la reductasa lo atribuyeron a la capacidad del metal para unirse a los residuos de cisteína de las enzimas proteicas del sistema MFO y a la posible estimulación de la peroxidación lipídica de las membranas, que provocaría cambios en la estructura y función del retículo endoplasmático, principal localización subcelular del sistema MFO. Además, observaron la modificación por parte del cobre de las propiedades cinéticas de esta reductasa por medio de una inhibición de tipo competitivo, que provocaba un aumento de la K_m sin producir ningún cambio en la V_{max}. Por otro lado, la pérdida del contenido de citocromo P450 la atribuyeron a varios procesos, tales como la destrucción de dicho citocromo por el metal o la inducción de la hemooxigenasa, que llevaría consigo una aceleración de la degradación del grupo hemo y, como consecuencia, del citocromo P450.

También se ha demostrado la capacidad del cobre para disminuir *in vivo* la velocidad de síntesis de proteínas, tales como las reductasas del sistema MFO, por varias vías: frenando la síntesis de ARN, modificando la capacidad de unión de los polisomas al retículo endoplasmático rugoso y, probablemente, también dañando a los propios ribosomas (Viarengo *et al*., 1980). Todo ello también sería una posible causa que explicaría la inhibición del sistema MFO por parte del cobre.

En el presente estudio queda comprobada esta capacidad del cobre para inhibir *in vitro* a las reductasas asociadas al sistema MFO en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*. Este efecto del cobre sobre las reductasas podría ser debido a su capacidad para unirse a grupos tiol. El mecanismo de acción *in vitro* del cobre en *P. lividus* podría deberse a la estimulación de la síntesis de metalotioneínas en presencia de dicho metal, apuntada por Ringwood *et al.* (1998). Dicha síntesis provocaría una disminución de la peroxidación lipídica (ver **capítulo 3**) y, como además una de las posibles fuentes de la cisteína necesaria para esa síntesis serían las reductasas del sistema MFO, también daría lugar a una disminución en la actividad de dichas enzimas. Es importante destacar además que esta inhibición se produce de forma gradual en todos los casos, por lo que bien podría tratarse de una inhibición competitiva de la actividad de las reductasas por parte del cobre, tal y como se observó en el pez *Dicentrarchus labrax* (Stien *et al.*, 1997).

4.4.3.2 Influencia del cadmio

Diversos autores han demostrado el efecto inhibitorio que el cadmio ejerce sobre los distintos componentes del sistema MFO. El estudio más relacionado con *P. lividus* fue el realizado en la estrella de mar, *Asterias rubens*, perteneciente también a los equinodermos. En dicho trabajo, realizado por Den Besten *et al.* (1991), se observaba una disminución de los niveles de los citocromos P450 y b_5 en los microsomas de los ciegos pilóricos de dichos animales expuestos a cadmio. Esta disminución era atribuida al efecto de este metal sobre la síntesis y metabolismo del grupo hemo. Sin embargo, no encontraron ningún cambio apreciable en la actividad de la NADPH-cytcred.

En cambio, George y Young (1986) sí encontraron un efecto inhibitorio del cadmio sobre la actividad catalítica del sistema MFO, medida como EROD (etoxirresorufina O-deetilasa), en el hígado del pez *Pleuronectes platessa*, así como un aumento de los niveles de metalotioneínas, sugiriendo estos autores una posible utilización de los residuos de cisteína de dicha enzima para la síntesis de metalotioneínas. Además, al igual que se observó en el caso del cobre, el cadmio también presenta una alta afinidad por los grupos tiol (Viarengo *et al*., 1993).

El efecto inhibitorio *in vitro* del cadmio sobre las reductasas asociadas al sistema MFO en las gónadas de *P. lividus* queda demostrado en el presente estudio, lográndose una inhibición total de la actividad enzimática con 100 μg/ml de metal en el caso de las NAD(P)H-cytcred y con tan sólo 25 μg/ml para las NAD(P)H-ferrired. Estas diferencias encontradas en las enzimas podrían atribuírse a un mecanismo de acción posiblemente distinto del metal sobre dichas enzimas: mientras que en las citocromo c reductasas es probable que exista una inhibición de tipo competitivo con el sustrato por el sitio de unión al enzima, igual que se propuso para el cobre, para las ferricianuro reductasas se produciría una desnaturalización de la proteína enzimática debida a la unión del cadmio con los grupos tiol de dicha enzima, lo que provocaría una pérdida brusca de la función enzimática a concentraciones relativamente bajas del metal.

4.4.3.3 Influencia del mercurio(II)

El mercurio, al igual que otros metales pesados, presenta una alta afinidad por los grupos -SH, lo que le proporciona la capacidad de alterar la estructura y función de, entre otras proteínas, las enzimas reductasas del sistema MFO, siendo

además esta capacidad mucho más alta que la de otros metales como el cobre, cadmio o zinc (Viarengo y Nott, 1993). Esta inhibición es evidente a concentraciones mucho más bajas que en el caso del cobre, tal y como quedó demostrado por Viarengo *et al.* (1997), que observaron dicho efecto en microsomas hepáticos del pez *Dicentrarchus labrax* expuestos a mercurio y otros metales.

También se ha comprobado la capacidad *in vivo* del mercurio tanto para desplazar al Zn^{+2} de las metalotioneínas presentes habitualmente en las células, como para inducir la síntesis del ARN_m que codifica las metalotioneínas, aumentando, por tanto, los niveles de dichas proteínas a nivel citosólico (Viarengo *et al*., 1987). Según esto, parece evidente que los residuos de cisteína necesarios para dicha síntesis puedan ser obtenidos por el mercurio a partir de las enzimas reductasas, hecho que estaría avalado por la inhibición que dicho metal ejerce sobre la peroxidación lipídica (ver **capítulo 3**) y que se explicaría también por el aumento de la síntesis de metalotioneínas, con función antioxidante.

En las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*, queda demostrado el efecto inhibitorio *in vitro* del mercurio, produciéndose una pérdida total de la actividad enzimática a concentraciones de tan sólo 25 µg/ml, tal y como era de esperar por la alta afinidad de dicho metal por los grupos tiol, mucho mayor que la de los otros metales objetos de estudio. Además dicha inhibición se produce, excepto en el caso de la NADPH-cytcred, de forma gradual, posiblemente por una competición por el lugar de unión al sustrato de las reductasas.

4.4.3.4 Influencia del plomo (II)

No existen apenas estudios sobre el efecto del plomo en el sistema MFO. Únicamente se ha constatado la capacidad de este metal para unirse a los grupos tiol de enzimas y proteínas tales como las metalotioneínas (Alcutt y Pinto, 1994).

En las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*, la influencia *in vitro* del plomo es negativa, produciéndose la inhibición total de la actividad enzimática, de forma brusca para las citocromo c reductasas y de forma gradual para las ferricianuro reductasas, a 500 µg/ml. Por tanto, parece claro que el mecanismo de acción del plomo sobre las reductasas dependientes de citocromo c estará basado en la unión de dicho metal a los residuos de cisteína de estas enzimas, así como en la utilización de parte de esta cisteína en la síntesis *de novo* de metalotioneínas, todo

lo cual traerá consigo una pérdida repentina de la función enzimática. Es de destacar además que dicha inhibición se produce a concentraciones mayores que para el resto de los metales objetos del presente estudio, por lo que se podría deducir que el plomo es el metal que presenta una menor afinidad por los grupos -SH de las reductasas. Sin embargo, parece posible que la inhibición del plomo sobre las reductasas dependientes de ferricianuro sea de tipo competitivo sobre el lugar de unión al sustrato, al igual que se enunció para las cytcred en el caso del cadmio.

Finalmente, se podría concluir que los **metales pesados** analizados en el presente estudio ejercen, en general, una **influencia negativa** *in vitro* sobre las enzimas **reductasas asociadas al sistema MFO** en las gónadas de *P. lividus*, probablemente a causa de su capacidad para unirse a los grupos tiol de estas enzimas, siendo el orden de afinidad por dichos grupos tiol: Hg>Cu>Cd>Pb.

4.4.4 Influencia *in vitro* de xenobióticos sobre las reductasas asociadas al sistema MFO

Los xenobióticos orgánicos producen, en general, un efecto estimulatorio sobre los componentes del sistema MFO. En la **Tabla 4.III** se realiza un análisis comparativo de los principales estudios realizados sobre la influencia de los xenobióticos orgánicos en las reductasas asociadas al sistema MFO en distintas especies de organismos acuáticos.

4.4.4.1 Influencia de la menadiona

La menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) es un compuesto quinónico que ha sido ampliamente estudiado como productor de EROs a través de los distintos componentes del sistema MFO, tanto en peces (Lemaire *et al*., 1994) como en invertebrados marinos (Livingstone *et al.*, 1989a).

Especie	Xenob. usado	Tratamiento	Influencia sobre el sistema MFO	Cita
Mytilus galloprovincialis	BaP	*In vivo* (3 días). 0,04-3 μM en agua.	NADPH-cytcred: ↑	Michel *et al*. (1993)
Carcinus aestuarii	BaP	*In vivo* (3 días). 1 mg disuelto en DMSO en inyec.	NADPH-cytcred: ↑ NADH-cytcred: ↑ NADH-ferrired: ↑	Fossi *et al*. (1997)
Geunkensia	PQ	*In vitro.*	NADPH-cytcred:	Wennig y Di

demissa	NF	1 µM en medio.	↑ (PQ, NF).	Giulio (1988)
Mytilus edulis	MD	*In vitro.* 0,5 µM en medio.	NADPH-cytcred: ↑ NADH-cytcred: ↑	Livingstone *et al*. (1989a)
Paracentrotus lividus	MD PQ NF BaP	*In vitro.* 125-1000 µM(MD), 250-2000 µM(PQ), 31,25-500 µM(NF y BaP) en medio.	NADPH-cytcred: = (PQ), ↑ (resto). NADPH-ferrired: = (BaP), ↑ (resto). NADH-cytcred: ↑ NADH-ferrired: =(MD),↑(PQ), ↓(resto).	Presente estudio

Tabla 4.III. Tabla comparativa de los efectos de los **xenobióticos** (MD=menadiona, PQ=paraquat, NF=nitrofurantoína y BaP=benzo(a)pireno) sobre las **enzimas componentes del sistema MFO** (↑: aumento, =: no afecta, ↓: disminución) en distintas especies de **organismos acuáticos**.

De forma general, se cree que participan en dicha producción de oxirradicales tanto las flavoproteínas NADPH-citocromo P450 reductasas como las NADH-citocromo b_5 reductasas, las cuales llevan a cabo el llamado ciclo redox, que consiste en una reducción monoeléctronica de la quinona (Q), dando lugar al radical semiquinona ($Q^{\cdot}$) **(d)**, que reacciona fácilmente con el oxígeno, originando el radical anión superóxido (O_2^{-}) **(e)**. Dicho radical puede entonces reaccionar con el H_2O_2, dando lugar al radical hidroxilo, a través de la reacción de Haber-Weiss. El citocromo P450 también origina O_2^{-} y H_2O_2, pero su participación en el ciclo redox de xenobióticos es mínima (Lemaire *et al*., 1994).

$$\mathbf{Q + 1e^- \longrightarrow Q^{\cdot}} \qquad \mathbf{(d)}$$

$$\mathbf{Q^{\cdot} + O_2 \longrightarrow Q + O_2^-} \qquad \mathbf{(e)}$$

Total: $O_2 + 1e^- \longrightarrow O_2^-$ **Ciclo redox**

Por otro lado, se ha demostrado la existencia de una enzima, la flavoproteína DT-diaforasa (NAD(P)H: quinona oxidorreductasa, E.C. 1.6.99.2), que actúa como un mecanismo de protección celular frente a la toxicidad de las quinonas, ya que cataliza la reducción dielectrónica de dicha menadiona a su correspondiente hidroquinona (menadiol) (QH_2) **(f)**, evitando de esta manera el ciclo redox de producción de oxirradicales. Además, estas hidroquinonas son más fácilmente conjugadas por las enzimas del metabolismo oxidativo de fase II, como

la glutatión-S-transferasa (GST), y, por tanto, más fácilmente excretables que las quinonas (Smith *et al*., 1985).

$$Q + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow QH_2 \qquad \textbf{(f)}$$

En general, se han observado mayores velocidades de producción de oxirradicales por la menadiona para las NADPH-reductasas en peces y para las NADH-reductasas en invertebrados marinos. Este último hecho se explica por la mayor actividad de las NADH-reductasas frente a las dependientes de NADPH, así como por la menor actividad de la NADH-DT-diaforasa frente a la dependiente de NADPH en los invertebrados marinos (Sjölin y Livingstone, 1997).

En el presente estudio realizado en las gónadas del erizo de mar, *P. lividus*, se observa una clara estimulación de las citocromo c reductasas por parte de la menadiona, mientras que las ferricianuro reductasas sufren una estimulación mucho menor o, incluso, ninguna modificación apreciable de sus niveles de actividad. Este hecho no es fácilmente explicable, ya que no se tiene constancia de trabajos donde se haya analizado la influencia de la MD sobre las ferricianuro reductasas, pero lo que sí parece claro es que el xenobiótico requiere un lugar específico de unión a la NADPH-citocromo P450 reductasa en mamíferos (Sadowski *et al.*, 1986), por lo que se podría pensar que dicho lugar de unión a la enzima, cuando el sustrato es el ferricianuro, es menos accesible a la menadiona o, incluso, podría quedar inutilizado.

Además, a diferencia de estudios realizados en otros invertebrados marinos donde la MD estimulaba principalmente a las NADH-reductasas (Livingstone *et al*., 1989a), en *P. lividus* la enzima más afectada por la presencia *in vitro* de la menadiona es la NADPH-cytcred, lo que se podría justificar por el hecho de que los equinodermos sean el phylum más próximo a los vertebrados (ambos son deuteróstomos) y, por tanto, es muy probable que muestren similitudes en el sistema MFO (Den Besten *et al*., 1993a) como podría ser la de que en ambos la NADPH-cytcred sea la enzima más susceptible a la MD. Por otro lado, este fenómeno también se podría atribuír a una posible actividad elevada de las

NADH-DT-diaforasas (estudios que será preciso realizar), lo que disminuiría la cantidad de MD destinada al sistema MFO en *P. lividus*, tal y como se comprobó en *M. edulis* para las NADPH-DT-diaforasas (Livingstone *et al*., 1989a).

4.4.4.2 Influencia del paraquat

El paraquat (dicloruro de 1,1´-dimetil-4,4´-bipiridilo) es un herbicida que ha sido estudiado en muchas ocasiones como un compuesto modelo del ciclo redox, en el cual el catión divalente del paraquat (PQ^{++}) se reduce a su radical monocatiónico (PQ^{+}) **(g)**, reacción de transferencia monoeléctronica que puede ser catalizada por la NADPH-citocromo P450 reductasa, así como por otras enzimas tales como la xantín oxidasa o la ferredoxín reductasa (Kappus, 1986). Este catión monovalente dará lugar, al combinarse con el oxígeno molecular, a la formación del radical anión superóxido (O_2^-) **(h)**:

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

$$PQ^{++} + 1e^- \longrightarrow PQ^{+} \qquad \textbf{(g)}$$

$$PQ^{+} + O_2 \longrightarrow PQ^{++} + O_2^- \qquad \textbf{(h)}$$

Total: $O_2 + 1e^- \longrightarrow O_2^-$ **Ciclo redox**

Además, se ha demostrado que el radical paraquat *per se* puede reducir directamente al H_2O_2 en una reacción análoga a la de Fenton, que conduciría a la formación de radical hidroxilo **(i)** (Winterbourne, 1981):

$$PQ^{+} + H_2O_2 \longrightarrow PQ^{++} + OH^{\cdot} + OH^- \qquad \textbf{(i)}$$

En invertebrados marinos, se ha comprobado la reducción del paraquat en presencia de NADPH en el hepatopáncreas del mejillón *Geukensia demissa* y de la almeja *Rangia cuneata* (Wenning y Di Giulio, 1988). Esta reducción se atribuyó a la presencia de una NADPH-citocromo c reductasa microsomal, que proporcionaría los electrones necesarios para la reducción del PQ^{++} a PQ^{+}.

Sin embargo, en el presente estudio realizado en gónadas de *P. lividus*, la NADPH-cytcred es la única reductasa que no resulta afectada por la presencia *in*

vitro de paraquat. Este hecho puede deberse a que el paraquat en *P. lividus* siga otra ruta metabólica distinta, que esté más relacionada con las NADH-reductasas, que se observa resultan fuertemente estimuladas, sobre todo la dependiente de citocromo c. Otra posible causa de esta ausencia clara de estimulación podría ser la apuntada por Wenning *et al.* (1988) para el caso del hepatopáncreas del mejillón *G. demissa*, donde observaron que la SOD (enzima antioxidante) resultaba estimulada a concentraciones bajas de paraquat, mientras que cuando estas concentraciones eran más altas resultaba inhibida, fenómeno que atribuían a los posibles efectos nocivos del O_2^- producido por el PQ sobre los procesos de síntesis proteica celular implicados directa o indirectamente en la síntesis de la enzima SOD. De forma análoga, se podría pensar que en el caso de las gónadas de *P. lividus* también el radical superóxido producido podría inhibir *in vivo* a concentraciones altas la síntesis de la NADPH-cytcred.

BIBLIOTECA VIRTUAL

4.4.4.3 Influencia de la nitrofurantoína

La nitrofurantoína (N-(5-nitro-2-furfurilideno)-1-aminohidantoína), al igual que los dos xenobióticos anteriormente estudiados, también participa a través del ciclo redox en la formación de oxirradicales. Este compuesto nitroaromático (NF), por acción de la NAD(P)H-citocromo P450 reductasa, se convierte en la correspondiente especie radicalar ($NF^{\cdot}$) **(j)**, que será capaz de reducir el oxígeno a radical anión superóxido (O_2^-) **(k)**. Dicho radical podrá entonces sufrir una dismutación para dar lugar a H_2O_2, el cual por la reacción de Haber-Weiss originará el radical hidroxilo (García-Martínez *et al*., 1995).

$$\mathbf{NF + 1\ e^- \longrightarrow NF^{\cdot}} \qquad \mathbf{(j)}$$

$$\mathbf{NF^{\cdot} + O_2 \longrightarrow NF + O_2^-} \qquad \mathbf{(k)}$$

$$\mathbf{Total:\ O_2 + 1e^- \longrightarrow O_2^-} \qquad \mathbf{Ciclo\ redox}$$

Al igual que para la menadiona se podía producir una disminución del efecto estimulatorio sobre el sistema MFO por acción de las DT-diaforasas, la estimulación sobre la actividad de las reductasas por la nitrofurantoína también puede verse afectada por la presencia de una NAD(P)H-nitrorreductasa

microsomal, que catalizaría la reducción dielectrónica de la nitrofurantoína (NF-NO_2) a su correspondiente hidroxilamina (NF-NH_2) **(l)** (García-Martínez *et al*., 1989).

$$\mathbf{NF\text{-}NO_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NF\text{-}NH_2} \qquad \mathbf{(l)}$$

Análogamente a lo observado en el estudio de la influencia *in vitro* de la menadiona sobre las gónadas de *P. lividus*, también para la nitrofurantoína se comprueba una mayor influencia de dicho xenobiótico sobre las citocromo c reductasas. Del mismo modo que en el caso anterior, sólo se ha comprobado el efecto estimulatorio de la NF sobre la reducción del citocromo c en peces y en moluscos (Washburn y Di Giulio, 1988; García-Martínez *et al*., 1995), siendo la explicación de dicho fenómeno también análoga y se atribuiría al posible bloqueo por parte del ferricianuro del lugar de unión de la NF a la enzima reductasa.

De forma similar a la MD, vuelve a ser la NADPH-cytcred la enzima que sufre una mayor estimulación por efecto de la nitrofurantoína en las gónadas de *P. lividus*, lo cual se podría atribuír a una mayor actividad de las NADH-nitrorreductasas, lo que provocaría una menor participación de las NADH-citocromo b_5 reductasas en el ciclo redox originado por la presencia de la NF. Otras posibles explicaciones serían la existencia de otras enzimas citosólicas y microsomales con actividad NADH-reductasa (Suntres y Shek, 1992), así como la presencia de sustancias antioxidantes, tales como el glutatión reducido y las vitaminas A, C y E (Hetherington *et al*., 1996), que eliminarían de forma efectiva los oxirradicales generados por las NADH-reductasas, con lo que el efecto de la NF sobre éstas sería menor.

4.4.4.4 Influencia del benzo(a)pireno

El benzo(a)pireno, un xenobiótico perteneciente al grupo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), ha sido ampliamente estudiado en vertebrados como un inductor del sistema MFO. Se incluye dentro de los inductores del tipo 3-MC (3-metilcolantreno), caracterizados por poseer una estructura plana, ser capaces de unirse al receptor Ah (aril hidrocarburo) e inducir formas del citocromo P450 pertenecientes a la subfamilia 1A (Robertson *et al*.,

1991). En invertebrados, sin embargo, no se han encontrado evidencias de la presencia de dicho receptor Ah (aunque podría ser que la concentración de dicho receptor esté por debajo del límite de detección), pero se supone que debe existir un mecanismo más primitivo para lograr la inducción del sistema MFO, el cual respondería a compuestos similares a los de vertebrados (incluido el benzo(a)pireno), pero tendría una capacidad de inducción menor (Den Besten *et al.*, 1993a).

El benzo(a)pireno, una vez que entra en los organismos vivos, es metabolizado a través del sistema MFO, siguiendo bien una monooxigenación dielectrónica **(m)**, que origina la producción de compuestos fenólicos (BaP-OH) o bien una oxidación monoelectrónica **(n)**, que da lugar a la formación de quinonas (BaP-dionas) y aductos proteicos. Mientras que la primera vía es frecuente en crustáceos, la segunda es utilizada por los moluscos bivalvos y equinodermos (Lemaire *et al*., 1993a; Den Besten *et al*., 1993b).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

BaP ⟶ BaP-OH + 2e⁻ **(m)**

BaP ⟶ BaP⁺· + 1e⁻ → **BaP-dionas** / → **Aductos proteicos** **(n)**

Estas BaP-dionas, fundamentalmente 1,6 y 3,6 disustituídas, son capaces de entrar entonces en el ciclo redox de producción de oxirradicales por el sistema MFO **(o** y **p)**, con lo cual podría explicarse la toxicidad del BaP en invertebrados marinos, tal y como se demostró en la glándula digestiva de *M. edulis* (García-Martínez y Livingstone, 1995).

BaP-diona + 1e⁻ ⟶ BaP-diona· **(o)**

BaP-diona· + O_2 ⟶ BaP-diona + O_2^- **(p)**

Total: O_2 + 1e⁻ ⟶ O_2^- **Ciclo redox**

En el presente estudio, realizado en las gónadas de *P. lividus*, queda demostrada la inducción *in vitro* por el BaP en las citocromo c reductasas, mientras que las ferricianuro reductasas no varían su actividad o son inhibidas. Un comportamiento similar se observó en la glándula digestiva de *M. edulis* tras la exposición a 25 ppb de aceite diesel durante 4 meses, de manera que la NADPH-cytcred fue la enzima más fuertemente estimulada, mientras que la NADH-cytcred se vio sólo aumentada ligeramente y la NADH-ferrired no resultó prácticamente afectada (Livingstone *et al.*, 1985), según lo cual parece que *P. lividus* sigue un patrón de comportamiento habitual respecto a la inducción del sistema MFO encontrado en invertebrados marinos. De todas formas, esta capacidad de inducción en invertebrados marinos es muy limitada, en comparación con la observada en vertebrados e insectos, siendo esto explicado por el hecho de que sólo alguna de las vías a través de las cuales es metabolizado el BaP induciría el sistema MFO, mientras que el resto no conllevaría cambios apreciables en la actividad de dicho sistema (Livingstone *et al*., 1990a).

De nuevo, la enzima que es más sensible a la presencia *in vitro* de xenobiótico en las gónadas de *P. lividus* es la NADPH-cytcred, al igual que la mayoría de estudios realizados hasta el momento, como el llevado a cabo por Fossi *et al.* (1997), en el que comprobaron la influencia del BaP sobre las reductasas del hepatopáncreas del cangrejo *Carcinus aestuarii* o el realizado por Livingstone (1988) en la glándula digestiva de los moluscos *M. edulis* y *Littorina littorea* expuestos a PAHs. En cualquier caso, parece clara la existencia de un mayor metabolismo *in vitro* dependiente de NADPH para el BaP en las gónadas de *P. lividus*, que probablemente conducirá a la formación de quinonas y aductos proteicos, de modo similar al observado en los ciegos pilóricos de *A. rubens* (Den Besten *et al*., 1993b).

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados de la presente Tesis Doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El ciclo gonadal de *Paracentrotus lividus* en Lorbé es claramente anual, con un solo desove entre junio y agosto.

2. La composición bioquímica de las gónadas de *P. lividus* presenta una variación estacional, claramente relacionada con el ciclo gonadal. Las proteínas son el componente mayoritario, con valores entre un 36 y un 60 %PS, coincidiendo sus niveles máximos con los mínimos de los glúcidos, por lo que parece evidente el papel de estos últimos como fuente de energía para la síntesis de proteínas. Los lípidos totales gonadales presentan una variación estacional mucho menos definida, siendo los triglicéridos el principal componente y apareciendo el colesterol total en una proporción inferior al 1%.

3. El aparato digestivo no parece actuar como órgano de reserva de nutrientes en *P. lividus*, siendo este papel desempeñado por las mismas gónadas, y la variación estacional de los componentes bioquímicos del digestivo parece ser debida únicamente a factores de tipo ambiental como la biodisponibilidad de alimento.

4. La peroxidación lipídica es un fenómeno presente tanto en las gónadas como en el contenido digestivo de *P. lividus*, apareciendo unos niveles entre 3,8 y 8,8 veces mayores en las gónadas y mostrando en ambos tejidos una variación estacional claramente relacionada con el ciclo gonadal.

5. Los niveles de lípidos peroxidizados presentes en las gónadas de *P. lividus* parecen ser buenos indicadores *in vitro* de la presencia de cobre, mercurio y menadiona, mientras que se muestran ineficaces para detectar cadmio, plomo y paraquat.

6. Las enzimas reductasas asociadas al sistema MFO presentan una clara variación estacional tanto en el tejido gonadal como en el contenido digestivo de *P. lividus*, siendo las enzimas gonadales dependientes de NADPH un

reflejo de la actividad de la NADPH-citocromo P450 reductasa y las dependientes de NADH de la actividad de la citocromo b5 reductasa. Además, las NADH-reductasas gonadales presentan una actividad más elevada que sus correspondientes NADPH-reductasas, siendo dicha relación entre 3,5 y 7 veces para las dependientes de citocromo c y entre 9 y 10,5 veces para las dependientes de ferricianuro.

7. La actividad enzimática por g de tejido en *P. lividus* es mayoritaria en el citosol, mientras que la actividad enzimática por mg de proteína es similar en las tres fracciones subcelulares, lo que sería explicable por una contaminación proteica en el citosol durante el proceso de fraccionamiento subcelular.

BIBLIOTECA VIRTUAL

8. Los metales pesados inhiben la actividad enzimática de las enzimas reductasas asociadas al sistema MFO en las gónadas de *P. lividus*, probablemente por su alta reactividad con los grupos tiol de dichas enzimas, siendo su capacidad de inhibición: Hg>Cd>Cu>Pb.

9. Mientras que las ferricianuro reductasas no parecen ser buenos indicadores *in vitro* de contaminación en las gónadas de *P. lividus*, las citocromo c reductasas sí se muestran eficaces en la detección de contaminantes orgánicos. Así, la NADPH-citocromo c reductasa parece ser un buen biomarcador *in vitro* de la contaminación producida por los xenobióticos menadiona, nitrofurantoína y benzo(a)pireno, mientras que la NADH-citocromo c reductasa sería el biomarcador *in vitro* más adecuado en el caso de una contaminación por paraquat.

10. Se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre los niveles de lípidos peroxidizados y la actividad total de la NADPH-cytcred en las gónadas de *P. lividus*, lo que podría ser una evidencia de la relación entre la producción de oxirradicales por dicha enzima y la aparición de peroxidación lipídica.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOGRAFÍA

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1990). Toxicological profile for copper. *U.S. Public Health Service*, Atlanta, Georgia, TP-90-08. 143 pp.

Alcutt, F. y Pinto, J.T. (1994). Glutathione concentrations in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, following laboratory exposure to lead (a potential model system for evaluating exposure to carcinogens and toxins). *Comp. Biochem. Physiol.*, 107C(3): 347-352.

Allen, R.G., Farmer, K.J., Newton, R.K. y Sohal, R.S. (1984). Effects of paraquat administration on longevity, oxygen consumption, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides and glutathione in the adult housefly. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78C(2): 283-288.

Ankley, G.T., Reinert, R.E., Wade, A.E. y White, R.A. (1985). Temperature compensation in the hepatic mixed-function oxidase system of bluegill. *Comp. Biochem. Physiol*., 81C(1): 125-129.

Arasu, S.M. y Reddy, P.S. (1995). Changes in lipid peroxidation in the gill and muscle of the marine bivalve (*Perna viridis*) during exposure to cadmium and copper. *Chem. Ecol*., 11: 105-112.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Laughton, M.J., Quinlan, G.J. y Gutteridge, J.M.C. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem. J.,* 258: 617-620.

Baker, R.T.M., Handy, R.D., Davies, S.J. y Snook, J.C. (1998). Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the grey mullet, *Chelon labrosus. Mar. Environ. Res.,* 45(4/5): 357-365.

Bano, Y. y Hassan, M. (1989). Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish *Heteropneustes fossilis. J. Environ. Sci. Health*, B24: 145-166.

Barker, M.F. y Xu, R.A. (1991). Seasonal changes in biochemical composition of body walls, gonads and pyloric caeca in two populations of *Sclerasterias mollis* (Echinodermata: Asteroidea) during the annual reproductive cycle. *Mar. Biol*., 109: 27-34.

Basuyaux, O., Mathieu, M. y Day, C. (1998). Effets de la salinité sur la consommation alimentaire et sur la croissance de l´oursin *Paracentrotus lividus* et de l´ormeau *Haliotis tuberculata* en élevage en circuit semi-fermé. *Bull. Soc. Zool. Fr.,* 123(2). 141-150.

Bayne, B.L. (1985). Cellular and physiological measures of pollution effects. *Mar. Pollut. Bull*., 16: 127-129.

Beninger, P.G. (1982). Étude biochimique comparée de deux populations de bivalves *Ruditapes decussatus* (Linne) et *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve). *Thése de Doctorat*. Université de Bretagne Occidentale. 193 pp.

Beninger, P.G. y Lucas, A. (1984). Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 79: 19-37.

Besnard, J.Y. (1988). Étude des constituents lipidiques dans la gonade femelle et les larves de *Pecten maximus* L. (Mollusque Lamellibranche). *Thése de Doctorat*. Université de Caen. 154 pp.

Besteiro, C. y Urgorri, V. (1988). Inventario dos equinodermos de Galicia (Echinodermata). En: *Cadernos da Área de Ciencias Biolóxicas, (inventarios).* Seminario de Estudos Galegos, Eds. do Castro, O Castro-Sada (A Coruña). Vol. I, 51 pp.

Beukema, J.J. y de Bruin, W. (1979). Calorific values of the soft parts of the tellinid bivalve *Macoma balthica* (L.) as determinated by two methods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 37:19-30.

Beyer, J. y Goksoyr, A. (1993). Cytochrome P450 observations in gulf fish. *Mar. Pollut. Bull*., 27: 293-296.

Biosca, X. (1997). Avaluació dels efectes del vessament de petroli de L´*Aegean Sea* en mol.luscs i peixos de la costa de La Coruña mijançant l´ús de marcadors químics i bioquímics. *Tesis Doctoral.* Universitat de Barcelona. 207 pp.

Bishop, C.D. y Watts, S.A. (1992). Biochemical and morphometric study of growth in the stomach and intestine of the echinoid *Lytechinus variegatus* (Echinodermata). *Mar. Biol*., 114: 459-467.

Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*., 37: 911-917.

Boolotian, R.A. (1966). Reproductive physiology. En: *Physiology of Echinodermata.* R.A. Boolotian (ed.), John Willey, New York. Cap. 25, pp. 561-613.

Bucheli, T.D. y Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*., 25(3): 201-268.

Bull, A.W. y Marnett, L.J. (1985). Determination of malondialdehyde by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem*., 149: 284-290.

Byrne, M. (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Mar. Biol*., 104: 275-289.

Canadian National Research Council (CNRC) (1985). The role of biochemical indicators in the assessment of ecosystem health. Their development and validation. *National Research Council Canada*, NRCC report. no 24371, 119 pp.

Carbonneau, M.A., Peuchant, E., Sess, D., Canioni, P. y Clerc, M. (1991). Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin. Chem.*, 37(8): 1423-1429.

Catoira, J.L. (1995). Spatial and temporal evolution of the gonad index of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in Galicia, Spain. En: *Echinoderm Research 1995*. Emson, Smith & Campbell (eds.), Balkema, Rotterdam. pp. 295-298.

Catoira, J.L. (1999). Outros recursos e outras economías: ourizos. En: *Cultivando o mar: a acuicultura do milenio*. J. Fernández, M. Rey y A. Cerviño (eds.). pp. 47-60.

Chan, T.M., Chen, E., Tatoyan, A., Shargill, N.S., Pleta, M. y Hochstein, P. (1986). Stimulation of tyrosine-specific protein phosphorylation in the rat liver plasma membrane by oxygen radicals. *Biochem. Biophys. Res. Comm*., 139(2): 439-445.

Chaudière, H. y Gérard-Monnier, D. (1995). Measurement of lipid peroxidation. A critical review. En: *Paraquat poisoning. Mechanisms, prevention and treatment.* C. Bismuth y A.H. Hall (eds.), Marcel Dekker Inc., New York. Cap. 5, pp. 65-88.

Chelomin, V.P. y Belcheva, N.N. (1992). The effect of heavy metals on processes of lipid peroxidation in microsomal membranes from the hepatopancreas of bivalve mollusc *Mizuhopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol*., 103C(2): 419-422.

Christie, N.T. y Costa, M. (1984). Review. *In vitro* assesment of the toxicity of metal compound. IV. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothioneins and DNA. *Biol. Trace Elem. Res.*, 6: 139-158.

Clarkson, T.W. y Marsh, D.O. (1982). Mercury toxicity in man. En: *Clinical, biochemical and nutritional aspects of trace elements*. A.S. Prasad (ed.), Alan R. Liss Inc., New York. Vol. 6, pp. 549-568.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A. y Vasseur, P. (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38: 122-131.

Crapp, G.B. y Willis, M.E. (1975). Age determination in the sea urchin *Pa* 173 *otus lividus* (Lmk), with notes on the reproduction cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 20: 157-178.

Dandapat, J., Rao, K.J. y Chainy, G.B.N. (1999). An *in vitro* study of metal iron-induced lipid peroxidation in giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de MAN). *Biometals*, 12: 89-97.

De la Cruz-García, C., López-Hernández, J., González-Castro, M.J., Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A.I. y Simal-Lozano, J. (2000). Protein, amino acid and fatty acid contents in raw and canned sea urchin (*Paracentrotus lividus*) harvested in Galicia (NW Spain). *J. Sci. Food Agric*., 80: 1189-1192.

Den Besten, P.J. (1998). Cytochrome P450 monooxygenase system in echinoderms. Review. *Comp. Biochem. Physiol*., 121C: 139-146.

Den Besten, P.J., Herwig, H.J., van Donselaar, E.G. y Livingstone, D.R. (1990). Cytochrome P-450 monooxygenase system and benzo(a)pyrene metabolism in echinoderms. *Mar. Biol*., 107: 171-177.

Den Besten, P.J., Elenbaas, J.M.L., Maas, J.R., Dieleman, S.J., Herwig, H.J. y Voogt, P.A. (1991). Effects of cadmium and polychlorinated biphenyls (Clophen A50) on steroid metabolism and cytochrome P-450 monooxygenase system in the sea star *Asterias rubens* L. *Aquat. Toxicol*., 20: 95-110.

Den Besten, P.J., Lemaire, P., Livingstone, D.R., Woodin, B., Stegeman, J.J., Herwig, H.J. y Seinen, W. (1993a). Time-course and dose-response of the apparent induction of the cytochrome P-450 monooxygenase system of pyloric caeca microsomes of the female sea star *Asterias rubens* L. by benzo(a)pyrene and polychlorinated biphenyls. *Aquat. Toxicol*., 26: 23-40.

Den Besten, P.J., Lemaire, P., O´Hara, S.C.M. y Livingstone, D.R. (1993b). Metabolism of benzo(a)pyrene by the sea star *Asterias rubens* L. *Polycl. Arom. Comp*., 3: 1055-1061.

Di Giulio, R.T. (1991). Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contamination. En: *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*. Mayes y Barron (eds.). Vol. 14, pp. 15-31.

Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W. y Jewell, C.S. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.,* 8: 1103-1123.

Dicker, E. y Cederbaum, A.I. (1991). NADH-dependent generation of reactive oxygen species by microsomes in the presence of iron and redox cycling agents. *Biochem. Pharmacol.*, 42(3): 529-535.

Eckelbarger, K.J. y Watling, L. (1995). Role of phylogenetic constraints in determining reproductive patterns in deep-sea invertebrates. *Invert. Biol*., 114(3): 256-269.

Eisler, R. (1990). Paraquat hazards to fish, widlife, and invertebrates: A synoptic review. *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.,* 85 (1.22), 28 pp.

Environmental Protection Agency (EPA) (1980). Ambient water quality criteria for polychlorinated biphenyls. *U.S. Environ. Protection Agency Rep.,* 440/5-80-068. 211 pp.

Erdelmeier, I., Gérard-Monnier, D., Yadan, J.C. y Chaudiére, J. (1998). Reactions of n-metil-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol*., 11: 1184-1194.

Esterbauer, H. y Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzym*., 186: 407-421.

Fenaux, L. (1968). Maturation des gonades et cycles saisonniers des larves chez *A. lixula*, *Paracentrotus lividus* et *Psammechinus microtuberculatus* (Echinides). *Vie Milieu*, 19(1A): 1-52.

Fenaux, L., Malara, G. y Charra, R. (1975). Effets d´un jeûne de courte durée sur les principaux constituants biochimiques de l´oursin *Arbacia lixula*. I. Stade de repos sexuel. *Mar. Biol*., 30: 239-244.

Fenaux, L., Malara, G., Cellario, C., Charra, R. y Palazzoli, I. (1977). Évolution des constituants biochimiques des principaux compartiments de l´oursin *Arbacia lixula* (L.) au cours dún cycle sexuel et effets d´un jeûne de courte durée au cours de la maturation sexuelle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 28: 17-30.

Fernandez, C. (1997). Effect of diet on the biochemical composition of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) under natural and rearing conditions (effect of diet on biochemical composition of urchins). *Comp. Biochem. Physiol*., 118A (4): 1377-1384.

Fernandez, C. (1998). Seasonal changes in the biochemical composition of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in a lagoonal environment. *Mar. Ecol*., 19(1): 1-11.

Folch, J., Lees, M. y Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem*., 226: 497-509.

Food and Agriculture Organization (FAO) (1998). FAOSTAT database results. En: *http://apps.fao.org*

Fossi, M.C., Savelli, C., Casini, S., Franchi, E., Mattei, N. y Corsi, I. (1997). Multi-response biomarker approach in the crab *Carcinus aestuarii* experimentally exposed to benzo(a)pyrene, polychlorobiphenyls and methyl-mercury. *Biomarkers*, 2: 311-319.

Frantzis, A. y Grémare, A. (1992). Ingestion, absorption, and growth rates of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different macrophytes. *Mar. Ecol. Prog. Ser*., 95: 169-183.

Gabín-Sánchez, C. y Lorenzo de Dios, F. (1993). El erizo de mar. Un recurso con futuro. *Aula del mar. Fundación Caixa Galicia.* 23 pp.

Gabryelak, T. y Klekot, J. (1985). The effect of paraquat on the peroxide metabolism enzyme of freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol.,* 81C (2): 415-418.

García de la Parra, L.M. (1998). Distribución de compuestos organoclorados en peces del Mediterráneo noroccidental. Metabolismo oxidativo y mecanismos de defensa. *Tesis Doctoral*. Universitat de Barcelona. 301 pp.

García-Martínez, P. y 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-Martínez, P., O´Hara, S.C.M., Winston, G.W. y Livingstone, D.R. (1989). Oxyradical generation and redox cycling mechanisms in digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Environ. Res*., 28: 271-274.

García-Martínez, P., Winston, G.W., Metash-Dickey, C., O´Hara, S.C.M. y Livingstone, D.R. (1995). Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 131: 332-341.

George, S., Young, P., Leaver, M. y Clarke, D. (1990). Activities of pollutant metabolising and detoxication systems in the liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*: sex and seasonal variations in non-induced fish. *Comp. Biochem. Physiol*., 96C(1): 185-192.

George, S.G. y Young, P. (1986). The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa. Comp. Biochem. Physiol.*, 83C(1): 37-44.

George, S.G., Pirie, B.J.S., Cheyne, A.R., Coombs, T.L. y Grant, P.T. (1978). Detoxification of metals by marine bivalves: an ultrastructural study on the compartmentation of copper and zinc in the oyster *Ostrea edulis. Mar. Biol*., 45: 147-156.

Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N. y Chaudière, J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.,* 11: 1176-1183.

Gibson, G. y Skeet, P. (1986). *Introduction to drug metabolism*. Chapman y Hall (eds.), London.

Giese, A.C. (1967). Some methods for study of the biochemical constitution of marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev*., 5: 159-186.

Goksoyr, A. y Förlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol*., 22: 287-312.

Gonor, J.J. (1973a). Reproductive cycles in Oregon populations of the echinoid, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). I. Annual gonad growth and ovarian gametogenic cycles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 12: 45-64.

Gonor, J.J. (1973b). Reproductive cycles in Oregon populations of the echinoid, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). II. Seasonal changes in oocyte growth and in abundance of gametogenic stages in the ovary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 12: 65-78.

Grant, A. y Tyler, P.A. (1983). The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *Int. J. Invert. Reprod.,* 6: 259-269.

Grove, E.L., Jones, R.A. y Mathews, W. (1961). The loss of sodium and potassium during the dry ashing of animal tissues. *Anal. Biochem*., 2. 221-283.

Guettaf, M. y San Martin, G.A. (1995). Étude de la variabilité de l´indice gonadique de l´oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinidae) en Méditerranée Nord-Occidentale. *Vie Milieu*, 45(2): 129-137.

Gurumurthy, P. y Mannering, G.J. (1985). Membrane bound cytochrome P-450 determines the optimal temperatures of NADPH-cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450-linked monooxygenase reactions in rat and trout hepatic microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm*., 127: 571-577.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M. (1991). Lipid peroxidation: a radical chain reaction. En: *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon press, Oxford. Cap. 4, pp. 188-276.

Hetherington, L.H., Livingstone, D.R. y Walker, C.H. (1996). Two- and one-electron dependent *in vitro* reductive metabolism of nitroaromatics by *Mytilus edulis*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol*., 113C(2): 231-239.

Hickman, C.P., Roberts, L.S. y Parson, A. (1998). Los equinodermos. En: *Principios integrales de Zoología*. Ed. Mc Graw-Hill, Madrid. Cap. 24, pp. 454-475.

Himmelman, J.H. (1975). Phytoplankton as a stimulus for spawning in three marine invertebrates. *J. Exp. Mar. Biol Ecol.*, 20: 199-214.

Ichikawa, Y., Yamano, T. y Fujishima, H. (1969). Relationship between interconversion of cytochrome P-450 and P-420 and its activities in hydroxylations and demethylations by P-450 oxidase systems. *Biochim. Biophys. Acta,* 171: 32-46.

Jangoux, M. y van Impe, E. (1977). The annual pyloric cycle of *Asterias rubens* L. (Echinodermata: Asteroidea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.,* 30: 165-184.

Kappus, H. (1986). An overview of enzymes involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.,* 35: 1-6.

Keesing, J.K. y Hall, K.C. (1998). Review of harvests and status of world sea urchin fisheries points to opportunities for aquaculture. *J. Shellfish Res*., 17(5): 1597-1604.

Keppler, D. y Decker, K. (1984). Glycogen. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. H.U. Bergmeyer (ed.), VCH, Weinheim. Vol. VI, pp. 11-18.

Khotimchenko, Y.S., Zalutskaya, E.A., Deridovich, I.I. y Kreimer, D.I. (1988). Glycogen synthase activity of the gonad of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* and the starfish *Asterias amurensis* (Echinodermata). *Comp. Biochem. Physiol.*, 89B(1): 9-13.

Kirchin, M.A., Wiseman, A. y Livingstone, D.R. (1992). Seasonal and sex variation in the mixed-function oxygenase system of digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.,* 101C: 81-91.

Klinger, T.S., Watts, S.A. y Forcucci, D. (1988). Effect of short-term feeding and starvation on storage and synthetic capacities of gut tissues of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.,* 117: 187-195.

Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M. y Narbonne, J.F. (1996). *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, 1: 21-28.

Lares, M.T. y Mc Clintock, J.B. (1991). The effects of temperature on the survival, organismal activity, nutrition, growth and reproduction of the carnivorous, tropical sea urchin *Eucidaris tribuloides. Mar. Behav. Physiol.,* 19(2): 75-96.

Lawrence, J.M. y Guille, A. (1982). Organic composition of tropical, polar and temperate-water echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B(2): 283-287.

Lawrence, J.M. y Lane, J.M. (1982). The utilization of nutrients by post-metamorphic echinoderms. En: *Echinoderm nutrition*. M. Jangoux y J.M. Lawrence (eds.), Balkema, Rotterdam. pp. 331-371.

Le Gall, P. (1991). El cultivo de erizos. En: *Acuicultura*. G. Barnabé (ed.), Omega, Barcelona. Vol. I, cap. 7, pp. 395-414.

Lemaire, P. y Livingstone, D.R. (1993). Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the *flounder Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis. Trends in Comp. Biochem. Physiol.*, 1: 1119-1150.

Lemaire, P., den Besten, P.J., O´Hara, S.C.M. y Livingstone, D.R. (1993a). Comparative metabolism of benzo(a)pyrene by microsomes of hepatopancreas of the shore crab *Carcinus maenas* L. and digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis* L. *Polycl. Arom. Comp*., 3: 1133-1140.

Lemaire, P., Viarengo, A., Canesi, L. y Livingstone, D.R. (1993b). Pro-oxidant and antioxidant processes in gas gland and other tissues of cod (*Gadus morhua*). *J. Comp. Physiol. B*, 163: 477-486.

Lemaire, P., Matthews, A., Förlin, L. y Livingstone, D.R. (1994). Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26: 191-200.

Livingstone, D.R. (1988). Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 37-43.

Livingstone, D.R. (1991). Towards a specific index of impact by organic pollution for marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.,* 100C: 151-155.

Livingstone, D.R. y den Besten, P.J. (1989). Mixed-function oxygenase system and benzo(a)pyrene metabolism in echinoderms. *Mar. Environ. Res.,* 28: 19-23.

Livingstone, D.R. y Farrar, S.V. (1984). Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo(a)pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L. *Sci. Total Environ.*, 39: 209-235.

Livingstone, D.R., Moore, M.N., Lowe, D.M., Nasci, C. y Farrar, S.V. (1985). Responses of the cytochrome P450 monooxygenase system to diese 179 he common mussel, *Mytilus edulis* L., and the periwinkle, *Littorina littorea* L. *Aquat. Toxicol*, 7: 79-91.

Livingstone, D.R., García-Martínez, P. y Winston, G.W. (1989a). Menadione-stimulated oxyradical formation in digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Aquat. Toxicol.*, 15: 213-236.

Livingstone, D.R., Kirchin, M.A. y Wiseman, A. (1989b). Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica*, 19(10): 1041-1062.

Livingstone, D.R., Arnold, R., Chipman, K., Kirchin, M.A. y Marsh, J. (1990a). The mixed-function oxygenase system in molluscs: metabolism, responses to xenobiotics and toxicity. *Oceánis*, 16(5): 331-347.

Livingstone, D.R., García-Martínez, P., Michel, X., Narbonne, J.F., O´Hara, S., Ribera, D. y Winston, G.W. (1990b). Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Funct. Ecol,* 4: 415-424.

López-Hernández, J., González-Castro, M.J. y Piñeiro-Sotelo, M. (1999). Determination of sterols in sea urchin gonads by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. Sci*., 37: 237-239.

Lowe, D.M., Moore, N.M. y Bayne, B.L. (1982). Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 62: 133-145.

Lowry, H.O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin fenol reagent. *J. Biol. Chem*., 193: 265-275.

Lozano, J., Galera, J., López, S., Turon, X., Palacín, C. y Morera, G. (1995). Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Mar. Ecol. Progr. Ser*., 122: 179-191.

Lukyanova, O.N. y Khotimchenko, Y.S. (1995). Lipid peroxidation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* and sea-urchin *Strongylocentrotus intermedius* during the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110B(2): 371-377.

Magniez, P. (1983). Reproductive cycle of the brooding echinoid *Abatus cordatus* (Echinodermata) in Kerguelen (Antarctic Ocean): changes in the organ indices, biochemical composition and caloric content of the gonads. *Mar. Biol*., 74: 55-64.

Manelis, R., Hornung, H., Fishelson, L. y Yawetz, A. (1993). The effects of exposure to heavy metal ions on cytochrome b_5 and components of the mixed-function oxidases from the digestive gland microsomes of the mollusc *Monodonta turbinata*. *Wat. Sci. Tech*., 27(7-8): 473-480.

Malins, D.C. y Ostrander, G.K. (1991). Perspective in aquatic toxicology. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*., 31: 371-399.

Matkovics, B., Witas, H., Gabryelak, T. y Szabó, L. (1987). Paraquat as an agent affecting antioxidant enzymes of common carp erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol*., 87C(1): 217-219.

Mc Clintock, J.B. y Pearse, J.S. (1987). Biochemical composition of antarctic echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol*., 86B (4): 683-687.

Michel, X.R., Suteau, P., Robertson, L.W. y Narbonne, J.F. (1993). Effects of benzo(a)pyrene, 3,3´,4,4´-tetrachlorobiphenyl and 2,2´,4,4´,5,5´-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquat. Toxicol*., 27: 335-344.

Mihara, K. y Sato, R. (1978). Detergent-solubilized NADH-cytochrome b_5 reductase. *Meth. Enzym*., LII(C): 102-108.

Milne, L., Nicotera, P., Orrenius, S. y Burkitt, M.J. (1993). Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys*., 304: 102-109.

Minotti, G. y Aust, S. (1987). The role of iron in the initation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lip.*, 44: 191-208.

Minotti, G. y Aust, S. (1992). Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids,* 27(3): 219-226.

Mita, M., Oguchi, A., Kikuyama, S., Namiki, H., Yasumasu, I. y Nakamura, M. (1994). Comparison of sperm lipid components among four species of sea-urchin based on echinoid phylogeny. *Comp. Biochem. Physiol*., 108B(4): 417-422.

Moss, J.E. y Lawrence, J.M. (1972). Changes in carbohydrates, lipids and proteins levels with age and season in the sand dollar *Mellita quinquiesperforata. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 8: 225-239.

Muriel, P. (1997). Peroxidation of lipids and liver damage. En: *Oxidants, antioxidants and free radicals*. Baskin y Salem (eds.), Taylor & Francis, New York. Vol. 14, pp. 237-257.

Musgrave, M.A., Gould, S.P. y Albert, R.F. (1987). Enzymatic lipid peroxidation in the gonadal and hepatopancreatic microsomal fraction of cultivated mussels (*Mytilus edulis* L.). *J. Food Sci*., 52: 609-612.

Nägele, U., Wahlefeld, A.W. y Ziegenhorn, J. (1985). Fatty acids and derivates. Tryglicerids. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. H.U. Bergmeyer (ed.), VCH, Weinheim. Vol. VIII, pp. 3-18.

Narbonne, J.F. y Michel, X. (1993). Use of biomarkers in the ass 181 t of contamination in marine ecosystems. Fundamental approach and applications. *MAP Tech. Repp. Ser.*, 71: 1-20.

Narbonne, J.F., Garrigues, P., Ribera, D., Raoux, C., Mathieu, A., Lemaire, P., Salaun, J.P. y Lafaurie, M. (1991). Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean sea. *Comp. Biochem. Physiol*., 100C: 37-42.

Naumenko, N.V. y Kostetsky, E.Y. (1987). Fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from muscle tissue of marine invertebrates in various seasons of the year. *J. Evol. Biochim. Physiol*., 23: 16-25.

Nebert, D.W. y Gonzalez, F.J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem*., 56: 945-993.

Nichols, D., Bishop, G.M. y Sime, A.A.T. (1985). Reproductive and nutritional periodicities in populations of the european sea-urchin, *Echinus esculentus* (Echinodermata: Echinoidea) from the English channel. *J. Mar. Biol. Ass. U.K*., 65: 203-220.

Ogus, I.H., Balk, M., Aksoy, Y., Muftuoglu, M. y Ozer, N. (1998). The effects of oxidative stress on the redox system of the human erythrocyte. En: *Free radicals, oxidative stress, and antioxidants. Pathological and physiological significance.* T. Ozben (ed.), Plenum Press, New York y London. NATO ASI Series, serie A, vol. 296, cap. 3, pp. 25-37.

Oudejans, R.C.H.M. y van der Sluis, I. (1979). Storage and depletion of lipid components in the pyloric caeca and ovaries of the seastar *Asterias rubens* during its annual reproductive cycle. *Mar. Biol*., 53: 239-247.

Oudejans, R.C.H.M., van der Sluis, I. y van der Plas, A.J. (1979). Changes in the biochemical composition of the pyloric caeca of female seastars, *Asterias rubens*, during their annual reproductive cycle. *Mar. Biol*., 53: 231-238.

Parant, M. (1998). Le métabolisme des xénobiotiques chez les bivalves. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, 321: 485-494.

Pazos-Castelos, A.J. (1993). Relaciones entre composición bioquímica y ciclo gametogénico en la vieira, *Pecten maximus* L. *Tesis doctoral*. Universidade de Santiago de Compostela. 276 pp.

Pearse, J.S., Mc Clary, D.J., Sewell, M.A., Austin, W.C., Perez-Ruzafa, A. y Byrne, M. (1988). Simultaneous spawning of six species of echinoderms in Barkley Sound, British Columbia. *Invert. Reprod. Develop*., 14: 279-288.

Pérez-Trigo, E., Montero-Torreiro, M.F. y García-Martínez, P. (1999). Variación estacional de los enzimas antioxidantes en las gónadas del erizo de mar, *Paracentrotus lividus* Lmk. en Lorbé, Galicia. En: *Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas* (en prensa).

Posthuma, L. y van Straalen, N. (1993). Heavy metal adaptation in terrestrial invertebrates. A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comp. Biochem. Physiol.,* 106C: 11-38.

Power, A. y Sheehan, D. (1996). Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis. Comp. Biochem. Physiol.,* 114C: 99-103.

Prakash, N.T. y Rao, K.S.J. (1995). Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Mol. Cell. Biochem*., 146: 107-113.

Puntarulo, S. y Cederbaum, A.I. (1989). Interactions berween paraquat and ferric complexes in the microsomal generation of oxygen radicals. *Biochem. Pharmacol.,* 38(17): 2911-2918.

Radi, A.A.R. y Matkovics, B. (1988). Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comp. Biochem. Physiol.,* 90C(1): 69-72.

Régis, M.B. (1979). Analyses des fluctuations des indices physiologiques chez deux échinoïdes (*Paracentrotus lividus* (Lmk) et *Arbacia lixula* (L.) du Golfe de Marseille. *Thétys*, 9(2): 167-181.

Ribera, D., Narbonne, J.F., Daubeze, M. y Michel, X. (1989). Characterization, tissue distribution and sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels. *Mar. Environ. Res*., 28: 279-283.

Ribera, D., Narbonne, J.F., Michel, X., Livingstone, D.R. y O´Hara, S. (1991). Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol.,* 100C(1-2): 177-181.

Ringwood, A.H., Conners, D.E. y Di Novo, A. (1998). The effects of copper exposures on cellular responses in oysters. *Mar. Environ. Res*., 46(1-5): 591-595.

Robertson, L.W., Silberhorn, E.M., Glauert, H.P., Schwarz, M. y Buchman, A. (1991). Do structure-activity relationships for the acute toxicity of PCBs and PBBs also apply for inductions of hepato-cellular carcinoma? *Environ. Toxicol. Chem*., 10:715-726.

Roméo, M. y Gnassia-Barelli, M. (1997). Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the mediterranean clam *Ruditapes decussatus. Comp. Biochem. Physiol.*, 118C(1): 33-37.

Roméo, M., Mathieu, A., Gnassia-Barelli, M., Romana, A. y Lafaurie, 183 **4).** Heavy metal content and biotransformation ezymes in two fish species from the NW Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser*., 107: 15-22.

Ryan, T.P. y Aust, S.D. (1992). The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Critic. Rev. Toxicol.*, 22(1): 119-141.

Sadowski, I.J., Wright, J.A., Ollman, D. e Israels, L.G. (1986). Menadione inhibition of benzo(a)pyrene metabolism in whole cells, microsomes and reconstituted system. *Int. J. Biochem*., 18: 565-568.

Scheibling, R.E. y Lawrence, J.M. (1982). Differences in reproductive strategies of morphs of the genus *Echinaster* (Echinodermata: Asteroidea) from the Eastern Gulf of Mexico. *Mar. Biol.,* 70: 51-62.

Serrao, E. (1988). Contribuçào para conhecimento da distribuçao e cartografía dos ouriços (Echinoïdea) a Norte do Cabo Espiches. *Recursos faunísticos marinhos portugeses*, II: 1-80.

Serrazanetti, G.P., Pagnucco, C. y Cattani, O. (1995). Hydrocarbons, sterols and fatty acids in sea urchin (*Paracentrotus lividus*) of the Adriatic Sea. *Chemosphere*, 30(8): 1453-1461.

Shafiq-ur-Rehman, Rehman, S., Chandra, O. y Abdulla, M. (1995). Evaluation of malondialdehyde as an index of lead damage in rat brain homogenates. *Biometals*, 8: 275-279.

Shimakata, T., Mihara, V. y Sato, R. (1972). Reconstitution of hepatic microsomal stearoyl-coenzyme A desaturase system from solubilized components. *J. Biochem.,* 72: 1163-1174.

Siedel, J., Wolfgang, R., Röschlau, P. y Ziegenhorn, J. (1985). Cholesterol. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. H.U. Bergmeyer (ed.), VCH, Weinheim. Vol. VIII, pp. 139-149.

Sjölin, A.M. y Livingstone, D.R. (1997). Redox cycling of aromatic hydrocarbon quinones catalysed by digestive gland microsomes of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Aquat. Toxicol.*, 38: 83-99.

Smith, M.T., Evans, C.G., Thor, H. y Orrenius, S. (1985). Quinone-induced oxidative injury to cells and tissues. En: *Oxidative Stress*. H. Sies (ed.), Academic Press, New York. pp. 91-113.

Solé, M. (1992). Ecotoxicología de microcontaminants organics: bioacumulació i indexs bioquímics d´estress en bivalves. *Tesis Doctoral.* Universitat de Barcelona. 287 pp.

Solé, M., Porte, C. y Albaigés, J. (1995). The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Sci. Total Environ*., 159: 147-153.

Solé, M., Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., Livingstone, D.R. y Albaigés, 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: 257-265.

Spirlet, C., Grosjean, P. y Jangoux, M. (1998). Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*. Analysis by means of the maturity index. *Invert. Reprod. Develop*., 34(1): 69-81.

Stien, X., Risso, C., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M. y Lafaurie, M. (1997). Effect of copper chloride *in vitro* and *in vivo* on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax. Environ. Toxicol. Chem*., 16(2): 214-219.

Stohs, S.J. y Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. Review article. *Free Radic. Biol. Med.,* 18(2): 321-336.

Strobel, H.W. y Dignam, J.D. (1978). Purification and properties of NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Meth. Enzym*., LII(C): 89-96.

Suntres, Z.E. y Shek, P.N. (1992). Nitrofurantoin-induced pulmonary toxicity. *In vivo* evidence for oxidative stress-mediated mechanisms. *Biochem. Pharmacol*., 43(5): 1127-1135.

Tort, L., Kargacin, B., Torres, P., Giralt, M. e Hidalgo, J. (1996). The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Comp. Biochem. Physiol*., 114C(1): 29-34.

Urgorri, V., Reboreda, P. y Troncoso, J.S. (1994). Dispersión, demografía y producción gonadal de una población de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Memoria final de resultados del proyecto de investigación.* FEUGA, Universidade de Santiago de Compostela. 172 pp.

Ursini, F., Maiorino, M. y Sevanian, A. (1991). Membrane hydroperoxides. En: *Oxidative stress. Oxidants and antioxidants.* H. Sies (ed.), Academic Press, London. Cap. 12, pp. 319-336.

Viarengo, A. (1989). Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *C.R.C. Rev. Aquat. Sci.*, 1: 295-317.

Viarengo, A. y Nott, J.A. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Mini-review. *Comp. Biochem. Physiol*., 104C(3): 355-372.

Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Capelli, R. y Orunesu, M. (1980). Effects of copper on the uptake of amino acids, on protein synthesis and on ATP content in different tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Mar. Environ. Res*., 4: 745-752.

Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K. y Farrar, S.V. (1987). Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and homeostasis in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Mar. Biol*., 94: 251-257.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N. y Orunesu, M. (1990). Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Physiol*., 97C (1): 37-42.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M. y Livingstone, D.R. (1991a). Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.,* 100C(1/2): 187-190.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R. y Orunesu, M. (1991b). Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of the antioxidant defence systems. *Experientia,* 47: 454-457.

Viarengo, A., Mancinelli, G., Pertica, M., Fabbri, R. y Orunesu, M. (1993). Effects of heavy metals on the Ca^{+2}-ATPase activity present in gill cell plasma-membrane of mussels *(Mytilus galloprovincialis* Lam.). *Comp. Biochem. Physiol.,* 106C(3): 655-660.

Viarengo, A., Canesi, L., García-Martínez, P., Peters, L.D. y Livingstone, D.R. (1995). Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). *Comp. Biochem. Physiol.,* 111B(1): 119-126.

Viarengo, A., Bettella, E., Fabbri, R., Burlando, B. y Lafaurie, M. (1997). Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics. Role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Mar. Environ. Res*., 44(1): 1-11.

Walker, C.W. y Lesser, M.P. (1998). Manipulation of food and photoperiod promotes out-of-season gametogenesis in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*: implications for aquaculture. *Mar. Biol.*, 132: 663-676.

Washburn, P.C. y Di Giulio, R.T. (1988). Nitrofurantoin-stimulated superoxide production by channel catfish (*Ictalurus punctatus*) hepatic microsomal and soluble fractions. *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 95: 363-377.

Wasson, K.M., Gower, B.A., Hines, G.A. y Watts, S.A. (2000). Levels of progesterone, testosterone and estradiol, and androstenedione metabolism in the gonads of *Lytechinus variegatus* (Ehinodermata: Echinoidea). *Comp. Biochem. Physiol*., 126C: 153-165.

Weinstein, J.E. (1995). Seasonal responses of the mixed-function oxygenase system in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791), to urban-derived polycyclic aromatic hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol.,* 112C: 299-307.

Wenning, R.J. y Di Giulio, R.T. (1988). Microsomal enzyme activities, superoxide production and antioxidant defenses in ribbed mussels (*Geunkensia demissa*) and wedge clams (*Rangia cuneata*). *Comp. Biochem. Physiol.,* 90C(1): 21-28.

Wenning, R.J., Di Giulio, R.T. y Gallagher, E.P. (1988). Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel, *Geukensia demissa. Aquat. Toxicol.*, 12: 158-171.

Wilber, R.M., Wolfson, N., Kenaston, C.B., Ottolenghi, A., Gaulden, M.E. y Bernheim, F. (1957). Inhibition of cell division by ultraviolet irradiated unsaturated fatty acids. *Expl. Cell Res*., 13: 503-509.

Winston, G.W. (1990). 4. Physiochemical basis for free radical formation in cells: Production and defenses. En: *Stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanisms*. Wiley-Liss Inc. pp. 57-86.

Winston, G.W. y Di Giulio, R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol*., 19: 137-161.

Winterbourne, C.C. (1981). Production of hydroxyl radicals from paraquat radicals and H_2O_2. *FEBS Lett*., 128: 339-342.

Wofford, H.W. y Thomas, P. (1988). Effect of xenobiotics on peroxidation of hepatic microsomal lipids from striped mullet (*Mugil cephalus*) and Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Mar. Environ. Res.,* 24: 285-289.

ANALYSIS OF BIOCHEMICAL COMPOSITION AND POSSIBLE CONTAMINATION BIOMARKERS IN THE SEA URCHIN, *Paracentrotus lividus*, Lmk.

The sea urchin, *Paracentrotus lividus*, is an echinoderm that is widely distributed along the Galician coast and its gonads have an increasing commercial relevance. Because of that, the first objective of the present work was the study of seasonal variation of **gonad index** (GI) as well as several **biochemical components**, in order to determine their nutritive value. An annual gonad cycle was observed in *P. lividus*, with a single spawning between June and August. The biochemical composition of gonads of *P. lividus* showed a seasonal variation, clearly related to gonad cycle. Proteins were the main component, with values ranging between 36 and 60 %DW, and their maximum levels appear at the same time as minimum values in carbohydrates. Because of that, it seems probable that carbohydrates have a relevant role as an energy source for protein synthesis. Gonad total lipids show a less clear seasonal variation, triacylglycerols are the main lipid component and total cholesterol appears in a percentage lower than 1%. Guts do not seem to act as an organ of nutrient storage in *P. lividus*, this role being developed by gonads and seasonal variation of biochemical components of guts is only caused by environmental factors such as food availability.
In addition to the study of the biochemical composition in *P. lividus*, its possible use as a bioindicator species of contamination was also analysed, using two biomarkers: one of contaminant exposure (mixed-function oxygenase system or MFO system) and one of effect (lipid peroxidation). **Lipid peroxidation** can be defined as oxidative damage that oxygen reactive species (RSOs) produce on polyunsaturated fatty acids (PUFA). This phenomenon is present in the gonads as well as in the digestive content of *P. lividus*, appearing in levels between 3.8 and 8.8 times higher in gonads and showing in both tissues a seasonal variation clearly related to gonad cycle. Levels of lipid peroxides in gonads of *P. lividus* seem to be a good *in vitro* biomarker of the presence of copper, mercury and menadione, while they are unable to detect cadmium, lead and paraquat. The **MFO system** is a multienzymatic system that catalyses processes of oxidative hydroxylation, being also able to participate in redox cycle of RSOs production. MFO-associated reductase enzymes show a clear seasonal variation in gonad tissue as well as in digestive content of *P. lividus*, gonad NADPH- and NADH-enzymes being responsible for NADPH-cytochrome P450 and NADH-cytochrome b_5 reductase activities, respectively. Moreover, gonad NADH-reductases display a higher activity than NADPH-reductases, this ratio being between 3.5 and 7 times for cytcred and between 9 and 10.5 times for ferrired. The analysis of several subcellular fractions shows that enzymatic activity per g of tissue of MFO-associated reductase activities is higher in cytosol, meanwhile enzymatic activity per mg of protein is similar in the three

subcellular fractions. This fact would be explainable by a protein contamination in cytosol during subcellular fractioning. Heavy metals cause an *in vitro* inhibition of enzymatic activity of MFO-associated reductase activities in gonads of *P. lividus*, probably due to their high reactivity with thiol groups of these enzymes, their reactivity ability being: Hg>Cd>Cu>Pb. Ferricyanide reductases do not seem appropriate as biomarkers of *in vitro* contamination in gonads of *P. lividus*, but cytochrome c reductases are efficient to detect organic contaminants. NADPH-cytochrome c reductase is an accurate biomarker of *in vitro* contamination caused by xenobiotics menadione, nitrofurantoin and benzo(a)pyrene, while NADH-cytochrome c reductase would be the best biomarker for an *in vitro* contamination by paraquat. A statiscally significant relationship between levels of lipid peroxides and total activity of NADPH-cytcred in gonads of *P. lividus* has been found, that would be an evidence of a link between oxyradicals production by this enzyme and the existence of lipid peroxidation.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES