

EFEECTO DE LA CALIDAD DEL AGUA SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO Y TASAS VITALES EN COPÉPODOS

Maestría en Biología
Sub-Área Ecología y Evolución
PEDECIBA

Mariano Martínez
Autor

Danilo Calliari
Orientador

Laura Rodríguez-Graña
CoOrientador



Efecto de la calidad del agua sobre el daño oxidativo y tasas vitales en copépodos

Lic. Mariano Martínez

Orientador: Dr. Danilo Calliari
Co-Orientador: Dra. Laura Rodríguez-Graña

Miembros del tribunal:

Dr. Rafael Radi
Presidente

Dra. Beatriz Yannicelli
Dr. Javier García

Tesis de Maestría en Biología
Sub-Área Ecología y Evolución
PEDECIBA

Universidad de la República
Uruguay

2015

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
<i>Estrés oxidativo: causas y consecuencias</i>	5
<i>Estrés oxidativo en ecosistemas acuáticos</i>	7
<i>Acartia tonsa como modelo de estudio</i>	8
HIPÓTESIS, PREDICCIONES Y OBJETIVOS.....	11
METODOLOGÍA.....	13
Sitios de referencia.....	13
Estimaciones in situ y colecta de copépodos.....	14
Estimaciones de laboratorio.....	16
Estimación de variables de respuesta.....	19
Análisis de datos.....	21
RESULTADOS.....	23
<i>Estimaciones in situ</i>	23
Estimaciones de laboratorio.....	25
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por PEDECIBA, ANII a través de Beca de Posgrado y Proyecto Fondo Clemente Estable “Implicancias de la senescencia sobre la biología reproductiva y eco-fisiología de copépodos marinos ”, y CSIC mediante el Programa Iniciación a la investigación y Programa Grupos I + D “Grupo ecología funcional de sistemas acuáticos”.

Agradezco a mis directores de tesis Danilo Calliari y Laura Rodríguez por su constante dedicación en todas las etapas de este trabajo. Al Centro Universitario Regional Este y PROBIDES por el apoyo logístico. Al Laboratorio de Físicoquímica Biológica de Facultad de Ciencias, especialmente a Leonardo Santos y Ana Denicola por su gran ayuda y paciencia durante la capacitación en técnicas de detección de daño oxidativo. A los miembros del tribunal por sus sugerencias para mejorar el trabajo. A Luis Meyer por el arte de la caratula. Y por último, agradezco a mi familia y amigos. A todos, Gracias.

RESUMEN

La acumulación de daño oxidativo en los organismos es un proceso natural, pero evidencia reciente indica que puede ser potenciada por el estrés ambiental. En los ecosistemas acuáticos, las fuentes de estrés pueden ser producto de la variabilidad ambiental natural (e.g. cambios de salinidad), pero también pueden estar asociadas a la presencia de sustancias de origen antropogénico. Los copépodos dominan entre los metazoarios marinos y cumplen un rol fundamental en las redes tróficas. Sin embargo, existe gran desconocimiento de los procesos que afectan sus tasas vitales, y en particular respecto de aquellos relacionados a la producción y acumulación de daño oxidativo. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la calidad del agua sobre el daño oxidativo (carbonilación de proteínas) y tasas vitales en el copépodo *Acartia tonsa* mediante aproximaciones de campo y de laboratorio. Se realizaron cuatro muestreos en dos estuarios con calidad de agua contrastante (Bahía de Montevideo, BM – Laguna de Rocha, LR; menor vs. mayor calidad de agua respectivamente) en los cuales se colectaron copépodos para análisis de carbonilación de proteínas. En el laboratorio, cultivos de edad sincronizada se mantuvieron en agua de cada sitio (BM y LR), y en agua de mar artificial (control); después de 16 días se determinaron los niveles de proteínas carboniladas, la tasa de consumo (TC) y producción de huevos (TPH), y el porcentaje de eclosión de huevos (PEH) en hembras adultas (Experimento 1). Un segundo experimento evaluó el efecto del estrés impuesto por condiciones de salinidad variable en las mismas respuestas biológicas; una cohorte se sometió a aumentos y descensos alternados de salinidad de 5 unidades entre 10 y 20 cada 12 horas durante 15 días, simulando las condiciones experimentadas por las poblaciones naturales en los estuarios. Un grupo control se sometió a la misma manipulación, pero manteniendo una salinidad constante de 15. Los niveles de carbonilación de proteínas fueron similares en los animales silvestres de ambos sitios. Los resultados experimentales indicaron mayores niveles de carbonilación de proteínas en el tratamiento de baja calidad de agua BM y en el tratamiento de salinidad variable como se esperaba. Sin embargo, las tasas vitales fueron similares entre tratamientos en ambos experimentos, o incluso mayores (TPH) en el tratamiento BM. Estos resultados cuestionan el patrón normalmente esperado de respuestas sincrónicas a diferentes niveles de organización y enfatizan la importancia de los enfoques integrales en evaluaciones de calidad ambiental.

ABSTRACT

Oxidative damage occurs as a natural process in organisms, but recently, several studies have suggested that it may be enhanced by environmental stress. Coastal waters and estuaries have long been regarded as naturally stressful systems for organisms due to their high variability in physico-chemical characteristics (e.g. salinity). At the same time, they are often exposed to high degree of anthropogenic pollution, which implies an external source of stress for organisms living there. Copepods dominate and play a key role in marine food webs. However, little is known about the processes that affect their vital rates, and in particular about those related to the production and accumulation of oxidative damage. Here we assessed water quality effects on protein carbonylation and vital rates in the copepod *Acartia tonsa* through field and laboratory approaches. Wild copepods were repeatedly sampled at two contrasting estuarine ecosystems: Laguna de Rocha (LR, high water quality) and Montevideo Bay (BM, low water quality), and analyzed for protein carbonylation. In the lab, age synchronized cultures were kept in water from each site (LR and BM), and in artificial seawater (control condition); after 16 days protein carbonylation was determined by immunoblotting analysis (Oxyblot) in adult females, and food ingestion (IR) and egg production rates (EPR), and egg hatching success (EHS) were measured in separate incubations (experiment 1). A second experiment evaluated the stress imposed by variable salinity levels on the same biological responses; a cohort was subjected to alternate salinity increases and decreases between 10 and 20 in steps of 5 units every 12 hours for 15 days, simulating conditions experienced by natural populations in estuaries. A control group was subjected to the same manipulation, but kept at a constant salinity of 15. Protein carbonylation levels were similar in wild animals from both sites. Experimental results indicated higher protein carbonylation in the low water quality BM treatment and in the variable salinity treatment, according to expectations. However, vital rates were similar between treatments in both experiments, or even higher (EPR) in the low water quality BM treatment. These results question the usually expected pattern of synchronic responses at different levels of organization and emphasize the importance of integrative approaches in environmental quality assessment.

INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas acuáticos los organismos están sometidos a múltiples fuentes de estrés. El concepto de estrés puede variar de acuerdo al contexto. En el presente trabajo se sigue aquél que propone que el estrés representa una condición en la cual un organismo es forzado fuera de su estado de equilibrio (homeostasis) por algún factor ambiental, resultando en mecanismos de acción conocidos o no, y en la cual las demandas del ambiente superan su capacidad de regulación (Koolhaas *et al.*, 2011). Las fuentes de estrés pueden ser producto de la variabilidad ambiental natural. En los sistemas acuáticos esta variabilidad puede estar representada por cambios de temperatura y salinidad, u otras características físico-químicas. Pero las fuentes de estrés pueden también estar asociadas a la presencia de sustancias de origen antropogénico. Los ecosistemas costeros son los más impactados por las actividades humanas debido a que más del 50 % de la población mundial habita en sus márgenes (Cohen *et al.*, 1997). A su vez, son extremadamente dinámicos y variables en términos físico-químicos por la influencia de mareas y descargas de aguas continentales que alteran la composición química y las características físicas del agua (salinidad, disponibilidad de macro y micro-nutrientes, densidad, propiedades ópticas, entre otras) (Mann & Lazier 2006). En conjunto, dichos procesos naturales y antrópicos definen las características físicas, químicas y biológicas de los sistemas costeros, y lo que se entiende habitualmente como calidad del agua (Wilhm & Dorris, 1968). De dicha definición se desprende que no existe un conjunto fijo de variables ni valores absolutos de referencia que definan la calidad del agua de un sistema, sino que ésta se define en función de los requerimientos de los organismos que en ella viven, así como de sus posibles usos por parte del Hombre. Entre las variables frecuentemente utilizadas para definir criterios de calidad de agua se encuentran la concentración de macro-nutrientes disueltos y totales, salinidad, clorofila *a*, sólidos en suspensión, presencia de contaminantes, entre otros (Johnson *et al.*, 1997; Diersing, 2009).

Estrés oxidativo: causas y consecuencias

Recientemente, se ha incrementado el número de estudios que indican que el estrés ambiental puede potenciar la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) en los organismos acuáticos promoviendo estrés oxidativo (Braconi *et al.*, 2011; Abele *et al.*, 2012).

Las ROS son especies químicas producidas naturalmente en organismos aeróbicos durante el metabolismo oxidativo, especialmente durante la respiración celular en la mitocondria. Estas especies pueden ser clasificadas en dos grupos, radicales y no radicales. Dentro del primero se encuentran radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$), aniones superóxidos ($\cdot\text{O}_2^-$), peroxilos ($\text{ROO}\cdot$), entre otros. Estos son considerados radicales ya que contienen al menos un electrón desaparejado, lo cual resulta en una alta reactividad debido a su afinidad por donar u obtener otro electrón para alcanzar estabilidad. El grupo de especies no radicales contiene una gran variedad de compuestos, alguno de estos altamente reactivos, pero no radicales por definición. Dentro de estos compuestos se encuentran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso (HClO), el ozono (O_3), entre otros, los cuales son producidos en el interior de la célula y pueden alcanzar altas concentraciones (Kohen & Nyska, 2002). Las RNS incluyen a la especie radicalar óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), la cual es sintetizada de forma endógena por diferentes isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), y sus intermediarios secundarios como el anión peroxinitrito (ONOO^-) y el radical dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) los cuales son típicamente más reactivos y tóxicos que el óxido nítrico en sí mismo (Radi 2004; Denicola *et al.*, 2008). En concentraciones moderadas, tanto las ROS como las RNS son esenciales en el control fisiológico de las funciones celulares, ya que cumplen un rol importante como mediadores de procesos de señalización celular (Dröge, 2002). Sin embargo cuando la generación de los mismos excede a la capacidad de los sistemas de defensa antioxidantes de neutralizarlos y eliminarlos, la superproducción de ROS y RNS conduce al denominado estado de estrés oxidativo (Sies, 2000). El estrés oxidativo ha sido asociado a un gran número de procesos tóxicos en las células, los cuales incluyen daño oxidativo a proteínas, lípidos, y ADN (Beckman & Ames, 1998). Un ejemplo de daño oxidativo en proteínas causado por RNS es la nitración de tirosinas, la cual consiste en la adición de un grupo nitro ($-\text{NO}_2$) al residuo de tirosina para formar 3-nitrotirosina. Esta modificación es fomentada principalmente por el ONOO^- el cual es generado a partir de la reacción de $\cdot\text{NO}$ y $\cdot\text{O}_2^-$. El ONOO^- promovido por ciertas metaloenzimas y CO_2 forma $\cdot\text{NO}_2$ y otros compuestos radicalares los cuales son muy eficientes en nitrar aminoácidos aromáticos (Radi, 2004; Denicola *et al.*, 2008). Por otra parte, uno de los daños más frecuentes en proteínas causado principalmente por ROS es la carbonilación, la cual involucra la adición irreversible de un grupo carbonilo ($-\text{CO}$) en las cadenas laterales de varios aminoácidos. La carbonilación de proteínas

puede ocurrir mediante la oxidación directa de los aminoácidos Prolina, Lisina, Arginina y Treonina por ROS generando productos carbonilos derivados, tanto aldehídos como cetonas. Existen otras vías que culminan en la adición de grupos carbonilo a las proteínas como por ejemplo la reacción de aldehídos producidos durante el proceso de peroxidación lipídica (e.g. Malondialdehído) con los aminoácidos Cisteína, Histidina, y Lisina, así como la reacción de azúcares reductores o sus productos de oxidación con Lisinas. Además la carbonilación de proteínas puede ser mediada por RNS mediante derivados radicalares del ONOO^- (Stadtman & Levine, 2003; Dalle-Donne *et al.*, 2006). La carbonilación de proteínas puede conducir a la agregación de proteínas, degradación o inactivación (Levine *et al.*, 1990). Con la edad, el daño se acumula debido a que los sistemas de protección antioxidantes se vuelven menos eficientes, razón por la cual se lo asocia con el envejecimiento (Finkel & Holbrook, 2000).

Estrés oxidativo en ecosistemas acuáticos

El surgimiento de la hipótesis que predice un incremento en los niveles de estrés oxidativo bajo condiciones ambientales adversas ha impulsado el desarrollo de numerosos estudios en distintos escenarios ambientales, los cuales abarcan una gran diversidad de aproximaciones. Estas incluyen mediciones de actividad y expresión de genes de distintas enzimas antioxidantes, cuantificación de ROS, y determinaciones de daño oxidativo como la peroxidación lipídica y carbonilación de proteínas (Abele *et al.*, 2012). La mayor parte de los estudios realizados en este contexto se centran en evaluar efectos de contaminantes exógenos (e.g., metales) indicando en general que éstos promueven la formación de ROS induciendo daño oxidativo (Li *et al.*, 2009; Sevcikova *et al.*, 2011; Pytharopoulou *et al.*, 2011). En menor proporción existen estudios que relacionan estrés oxidativo con otro tipo de variables ambientales. A modo de ejemplo, un aumento de la temperatura incrementa la formación de ROS y la actividad de enzimas antioxidantes en bivalvos (Abele *et al.*, 2002); la variabilidad de la salinidad, oxígeno disuelto y pH incrementan las respuestas antioxidantes en diferentes clases de moluscos (Abele *et al.*, 1998; Zaccaron da Silva *et al.*, 2005). Las variables ambientales de naturaleza biológica que contribuyen a definir la calidad del agua también pueden inducir estrés oxidativo. Tal es el caso de las toxinas liberadas por cianobacterias durante floraciones algales (Microcistina) las cuáles

alteran los sistemas antioxidantes e inducen estrés oxidativo en varias especies de peces e invertebrados (Amado *et al.*, 2010).

De los antecedentes sobre la ecología del estrés oxidativo se desprende un claro sesgo hacia aproximaciones metodológicas relacionadas con estimaciones de respuestas antioxidantes, probablemente producto de su menor complejidad. En tanto estimaciones directas de daño oxidativo como la carbonilación de proteínas han sido poco utilizadas en estudios ecológicos. Los escasos antecedentes relacionados a carbonilación de proteínas en contextos medioambientales se restringen a estudios realizados mayoritariamente en peces y moluscos. Se ha demostrado que la exposición a metales pesados como el cobre y a la irradiación inducen carbonilación de proteínas en *Mytilus edulis* (Kirchin *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 2000), mientras que algunas especies de peces (e.g. *Zoarces viviparus*) desarrollaron altos niveles de carbonilación de proteínas en aguas contaminadas (Almoroth *et al.*, 2005). Sin embargo, no existe evidencia de carbonilación de proteínas relacionada a estrés ambiental en copépodos. Los copépodos son crustáceos de tamaño pequeño, mayoritariamente de vida libre. En ambientes marinos, los copépodos de vida libre son numéricamente dominantes en el plancton y juegan un papel clave en las redes tróficas (Calbet *et al.*, 2000). Debido a su importancia, este grupo es objeto de estudio tradicional en oceanografía biológica y ecología marina (Mauchline, 1998). Biomarcadores de estrés oxidativo, tales como la peroxidación lipídica y la actividad y expresión génica de enzimas antioxidantes han sido empleados en este grupo de organismos. Seo y colaboradores (2006) registraron un aumento en la expresión de la enzima antioxidante Glutatión reductasa en el copépodo *Tigriopus japonicus* relacionado a incrementos de salinidad y exposición a metales pesados. De la misma manera, la peroxidación de lípidos y las actividades de enzimas antioxidantes aumentaron durante diferentes dosis de radiación UV y gamma en el copépodo *Paracyclops nana* conduciendo a un aumento en la mortalidad y alteración de la fisiología reproductiva (Won *et al.*, 2014; Won & Lee, 2014).

Acartia tonsa como modelo de estudio

Acartia tonsa es una especie de copépodo de vida libre dominante en muchas áreas estuarinas templadas y subtropicales de todo el mundo. El tamaño promedio de esta especie es ca. 1 mm (hasta 1.5 mm) en el estadio adulto, siendo las hembras ligeramente más grandes que los machos

(Fig. 1A). La longevidad de *A. tonsa* en cultivos de laboratorio alcanza una edad promedio de 40 días, aunque existe evidencia que indica que las hembras pueden superar los 44 días (Rodríguez-Graña *et al.*, 2010). La reproducción de esta especie ocurre de forma sexuada mediante cópula y posterior puesta de huevos por parte de las hembras, los cuales son liberados al medio para su eclosión. Su desarrollo incluye una serie de estadios larvales (nauplii, I – VI), pasando por cinco estadios juveniles mediante procesos de muda (copepodito, I – V), hasta alcanzar el estadio adulto, generalmente entre 12 y 14 días después de la eclosión (Fig. 1B). Cuando los organismos alcanzan el estadio adulto, estos no mudan más y en efecto dejan de crecer. Es por esto que las estimaciones de crecimiento (producción de biomasa) se realizan mediante estimaciones de producción de huevos en hembras (Mauchline, 1998).

Debido a su alta importancia ecológica, *A. tonsa* ha sido utilizada como modelo en una amplia gama de estudios (Mauchline, 1998). Sin embargo, sólo un estudio ha abordado el análisis del estrés oxidativo en esta especie, el cual estuvo relacionado al proceso de envejecimiento (Rodríguez-Graña *et al.*, 2010). Otras respuestas han sido mejor estudiadas en esta especie. En condiciones experimentales Calliari y colaboradores (2008) encontraron una disminución en las tasas de ingestión y altos niveles de mortalidad en organismos sometidos a *shocks* salinos extremos. Otros estudios realizados con esta especie han demostrado que la exposición a metales pesados y las condiciones de hipoxia conducen a efectos subletales (e.g. disminución de la producción y eclosión de huevos) (Marcus, 2004). Recientemente se reportó la ocurrencia de altos porcentajes de *A. tonsa* muertos en los estuarios de la bahía de Chesapeake (Elliot & Tang, 2011) y Río de la Plata (Martínez *et al.*, 2013) mediante la aplicación de una tinción vital (Tinción vital con Rojo Neutro, Dressel *et al.*, 1972; Elliot & Tang, 2009), la cual estaría asociada, según los autores, a las condiciones de estrés impuestas por los estuarios. Sin embargo, a pesar de la creciente evidencia relacionada a respuestas de copépodos al estrés ambiental a nivel fisiológico y poblacional, los procesos básicos a niveles de organización celular y molecular continúan siendo un camino casi inexplorado en este grupo.

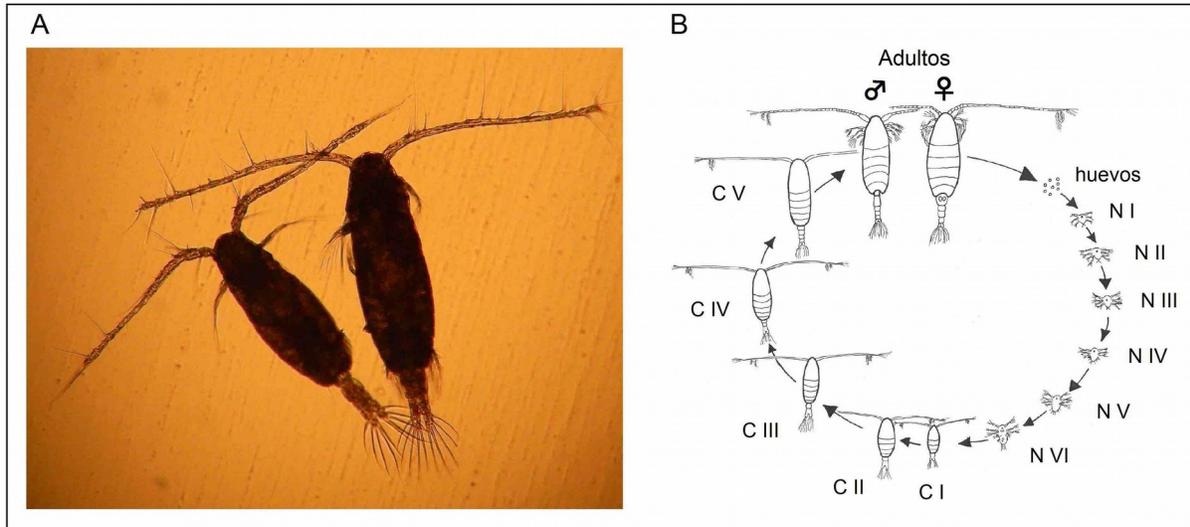


Figura 1. A) Macho adulto *A. tonsa* (izquierda) y hembra adulta *A. tonsa* (derecha). Foto por Danilo Calliari. B) Ciclo de vida de copépodos: N (I – VI) representa los estadios larvales nauplii y C (I – V) representa los estadios juveniles Copepodito.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la calidad del agua en el daño oxidativo (carbonilación de proteínas) y tasas vitales del copépodo calanoide *A. tonsa* mediante aproximaciones de campo y experimentales en laboratorio. Las aproximaciones experimentales involucraron el sometimiento de organismos provenientes de cultivos edad-sincronizados a condiciones de estrés durante períodos prolongados de tiempo. Por otro lado, se compararon los niveles de daño oxidativo e incidencia de organismos muertos en dos estuarios de la costa uruguaya con regímenes de salinidad y temperatura similares pero con condiciones de calidad de agua contrastante (Bahía de Montevideo – Laguna de Rocha; menor vs. mayor calidad de agua, respectivamente). Mediante este trabajo se espera generar información relacionada a forzantes externos causantes de estrés oxidativo, ampliando el conocimiento a organismos clave como lo son los copépodos en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos y profundizar en el estudio de su eco-fisiología mediante un enfoque multi-nivel.

HIPÓTESIS, PREDICCIONES Y OBJETIVOS.

Hipótesis

Las condiciones ambientales afectan las respuestas biológicas de los copépodos a nivel molecular y fisiológico. A nivel molecular afectan la acumulación de daño oxidativo por la alteración de los mecanismos antioxidantes o mediante la inducción de mayores niveles de ROS o RNS, y a nivel fisiológico modulan las tasas de procesos centrales como el consumo y la fecundidad afectando su supervivencia

Predicciones

Se espera encontrar un mayor nivel de daño oxidativo en organismos sometidos a condiciones de baja calidad de agua en comparación a aquellos sometidos a condiciones de alta calidad. A su vez, los organismos en condiciones de baja calidad de agua presentarán una menor tasa de consumo y producción de huevos, y un menor porcentaje de eclosión de huevos. La baja calidad de agua representará además un factor significativo de mortalidad en copépodos. De esta manera, las condiciones de baja calidad de agua presentarán una mayor incidencia de copépodos muertos que las de alta calidad. Por su parte, las variaciones de salinidad implicarán una fuente de estrés para los organismos. Esto se evidenciará a través de un mayor nivel de daño oxidativo, y menores tasas de consumo y producción de huevos en condiciones de salinidad variable.

Objetivo general

Determinar el efecto de la calidad del agua sobre el daño oxidativo y tasas vitales en el copépodo *Acartia tonsa*.

Objetivos específicos

(i) Comparar el nivel de carbonilación de proteínas (in situ y experimentalmente) y tasas vitales (experimentalmente) de copépodos *A. tonsa* en dos estuarios con calidad de agua contrastante (Bahía de Montevideo vs. Laguna de Rocha)

(ii) Comparar el porcentaje de copépodos *A. tonsa* muertos en dos estuarios de calidad de agua contrastante (Bahía de Montevideo vs. Laguna de Rocha) mediante la técnica de tinción vital con Rojo Neutro

(iii) Evaluar el efecto de la variabilidad de la salinidad en la carbonilación de proteínas y tasas vitales en *A. tonsa* bajo condiciones experimentales

METODOLOGÍA

El diseño metodológico involucró una aproximación de campo y una aproximación experimental en laboratorio. Para la aproximación de campo, se realizaron 4 muestreos en dos sitios de referencia de alta y baja calidad de agua, donde se colectaron organismos silvestres para análisis de daño oxidativo e incidencia de organismos muertos. La aproximación experimental constó de dos experimentos realizados con organismos cultivados en el laboratorio, en los cuales se evaluó el efecto de dos atributos de la calidad del agua sobre el daño oxidativo y tasas vitales. El primero de ellos (experimento 1) se realizó de forma simultánea a la aproximación de campo y consistió en evaluar el efecto de la composición del agua de alta y baja calidad colectada durante los muestreos en los sitios de referencia. El segundo (experimento 2) apuntó a evaluar el efecto de un atributo dinámico de la calidad del agua, como lo es la variabilidad de la salinidad, el cual es típico de sistemas estuarinos. La Figura 2 resume la estrategia de trabajo.

Sitios de referencia

El trabajo de campo se desarrolló en dos estuarios de la costa uruguaya: Laguna de Rocha (LR, 34 ° 35 'S - 54 ° 17' W) y Bahía de Montevideo (BM, 34 ° 53 'S - 54 ° 13' W) (Figura 2). Estos fueron seleccionados con fines comparativos como sitios de referencia de alta (LR) y baja (BM) calidad del agua debido a su similitud en características hidrográficas y ecológicas clave, como lo son los rangos de variabilidad de salinidad y temperatura, y la composición de la comunidad zooplanctónica; en particular, el copépodo *A. tonsa* suele ser un componente dominante de la comunidad de copéodos en ambos sitios (Muñiz *et al.*, 2002; Rodríguez-Graña *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, LR y BM se caracterizan por presentar condiciones altamente contrastantes de calidad de agua.

La Laguna de Rocha es una laguna costera conectada periódicamente con el Océano Atlántico por un canal que se abre a través de una estrecha barra de arena (Conde *et al.*, 1999). Es un sitio bien conservado ubicado en una zona rural dentro de un parque nacional (parte del Sistema Nacional de Áreas Protegidas, SNAP) con impacto antropogénico muy limitado (Rodríguez-Gallego *et al.*, 2010). Los antecedentes relacionados a impacto antrópico en Laguna de Rocha son escasos. La evaluación de pesticidas (*ca* 30 pesticidas analizados) en agua, sedimento y

peces no detectó resultados positivos (Nardo, 2011), mientras que sí fueron detectadas trazas del herbicida Glifosato (Gerardo Evia, PROBIDES., Com pers). La Bahía de Montevideo se encuentra en la costa de Montevideo (capital de Uruguay, ca. 1,5 millones de habitantes). Esta bahía alberga el principal puerto del país y recibe la descarga de tres arroyos urbanos altamente contaminados (Miguelete, Pantanoso y Seco). En la costa N de BM se encuentra la refinería de petróleo de la Teja, la cual procesa y entrega combustible a todo el país (alrededor de 1,7 millones de $\text{m}^3 \text{año}^{-1}$ ANCAP 2015). Algunos estudios han caracterizado esta zona como altamente contaminada por presentar bajos niveles de oxígeno disuelto en agua de fondo y altos niveles de sólidos en suspensión, hidrocarburos, coliformes fecales y metales pesados como el Cr y Pb (Danulat *et al.*, 2002; Muniz *et al.*, 2002;. Venturini *et al.*, 2004, Intendencia de Montevideo, 2013).

Estimaciones in situ y colecta de copépodos

Se llevaron a cabo cuatro muestreos (S1 a S4) en cada sitio durante dos períodos: primavera 2013 (noviembre de 2013; S1 y S2) y otoño 2014 (marzo-abril 2014, S3 y S4). Los muestreos estuvieron separados por una semana de diferencia dentro de cada período, y se centraron en una única estación de muestreo. Se registraron datos hidrográficos mediante sensores electrónicos de salinidad, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), concentración de oxígeno disuelto (mg L^{-1}) y turbidez (NTU) (Multiparámetro Horiba U-50). La salinidad se midió de acuerdo a la Escala Práctica de Salinidad y se reporta sin unidades. Se colectaron muestras de agua subsuperficiales para análisis de clorofila-*a* (mg m^3), nutrientes ($\mu\text{mol L}^{-1}$) y materia orgánica particulada (MOP, mg L^{-1}). La concentración de clorofila-*a* en agua (indicador de biomasa fitoplanctónica) se analizó mediante fluorimetría antes y después de acidificar (HCl , 1,2 N) en un fluorómetro Turner 111, y la MOP se estimó gravimétricamente como la diferencia de peso después del secado y combustión (Parsons *et al.*, 1984). Los análisis de nutrientes incluyeron nitrito (NO_2^{2-} , Strickland & Parsons, 1972), nitrato (NO_3^- , Mackereth *et al.*, 1978), amonio (NH_4^+ , Koroleff, 1970) y fosfato (PO_4^{3-} , Murphy & Riley, 1962). Además, se colectó y almacenó agua de cada sitio para incubaciones de laboratorio (experimento 1).

Para las estimaciones de daño oxidativo, se colectó zooplancton por triplicado mediante arrastres horizontales subsuperficiales (1-2 m de profundidad) con red de plancton de 100 micras

de tamaño de poro. Inmediatamente después de ser colectadas, las muestras se diluyeron en contenedores de 20 L aislados térmicamente y se llevaron al laboratorio donde 120 hembras *A. tonsa* adultas fueron cuidadosamente separadas vivas, almacenadas en tubos Eppendorf y congeladas en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Para la tinción vital, se colectó zooplankton por triplicado mediante arrastres horizontales subsuperficiales lentos ($0,5 \text{ m s}^{-1}$) y cortos (2 min) utilizando una red de plancton de 100 micras de tamaño de poro y copo no filtrante. El contenido del copo se transfirió inmediatamente a un vaso de bohemia donde se incubó con Rojo neutro (solución stock 1:1000) durante 15 min a una concentración final de 1:67.000, temperatura *in situ* y oscuridad. Posteriormente, se filtró el contenido del vaso de bohemia a través de un tamiz de 100 micras, se enjuagó con agua de mar filtrada y se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis posterior.

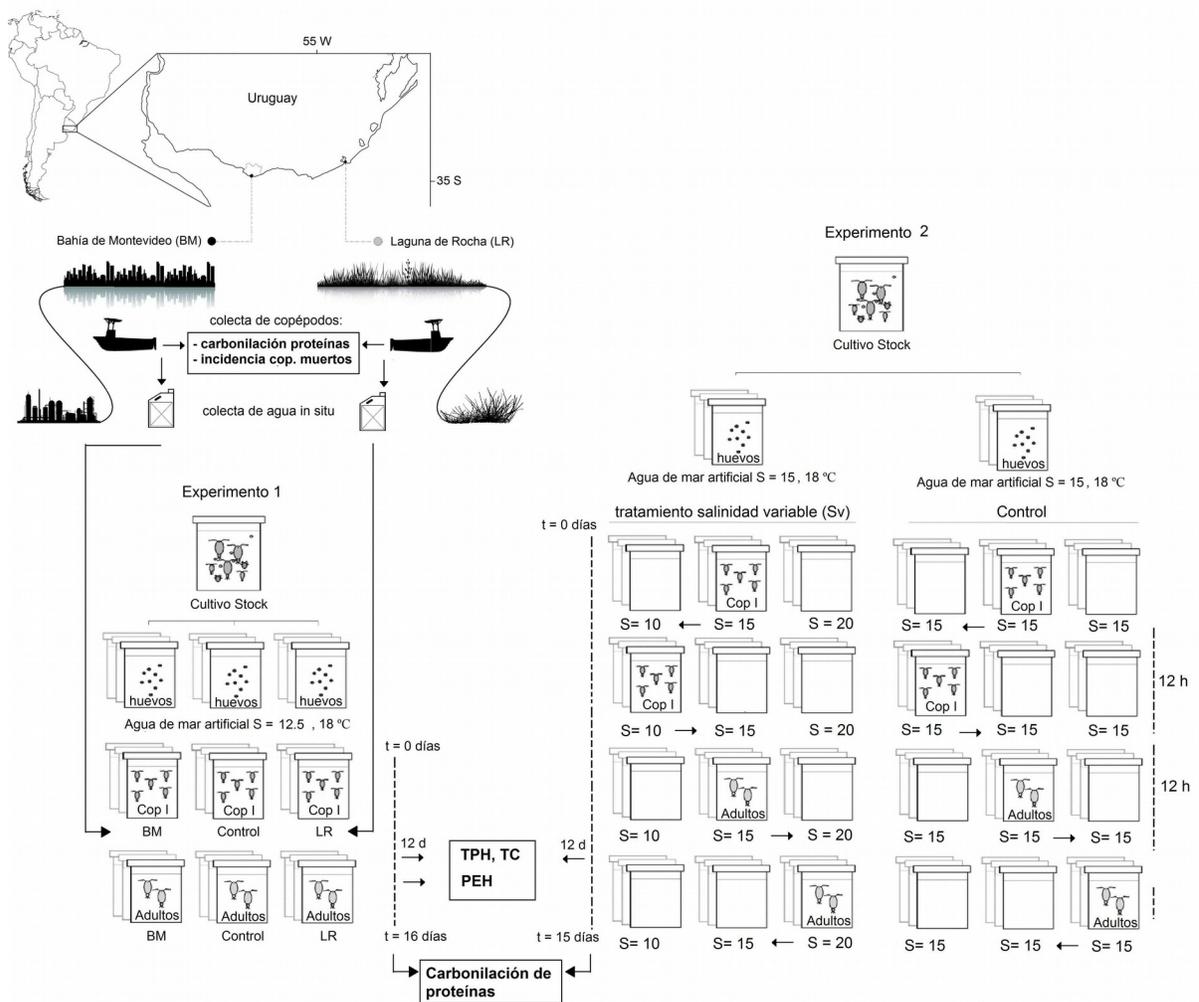


Figura 2. Estrategia general de trabajo. Variables estimadas para *Acartia tonsa*: *in situ*: carbonilación de proteínas e incidencia de copépodos muertos; en el laboratorio: tasa de producción de huevos (TPH), tasa de consumo (TC), porcentaje de eclosión de huevos (PEH) y carbonilación de proteínas

Estimaciones de laboratorio

Animales experimentales. Los copépodos para experimentación fueron obtenidos de cultivos de laboratorio originados a partir de poblaciones de la Laguna de Rocha (Rocha, Uruguay), mantenidas durante varias generaciones (> 20 gen.) a una salinidad ca. 15 (agua de mar artificial) y a 18 °C. Tales condiciones se ajustan adecuadamente al rango experimentado por *A. tonsa* en condiciones naturales (Calliari *et al.*, 2006). Los cultivos de copépodos fueron alimentados rutinariamente *ad libitum* con el alga *Rhodomonas* sp. en fase de crecimiento exponencial y mantenida en medio B1.

Experimento 1. Se incubaron huevos de *A. tonsa* provenientes del cultivo de laboratorio en tanques de 20 L con agua de mar artificial (salinidad = 12.5, ca. 500 huevos L⁻¹) y se mantuvieron a 18 °C hasta el estadio copepodito I (correspondiente a 7 días de edad). Una vez en este estadio, los copépodos fueron filtrados cuidadosamente a través de un tamiz de 75 micras y trasladados a tanques de 20 L con agua natural de LR (tratamiento de alta calidad de agua), BM (baja calidad de agua) o agua de mar artificial (control), tres réplicas para cada condición (Fig. 2 y 3). En todos los casos, el agua de mar artificial se preparó mediante la dilución de una mezcla comercial de sal marina (Sera® - Marin) en agua destilada/declorada. La transferencia de los copépodos a los tratamientos experimentales se consideró como el inicio del experimento (t₀); el agua utilizada para las incubaciones en t₀ correspondió a aquella colectada en LR y BM durante S3. Al día 8, el agua de incubación fue sustituida por agua recién colectada del sitio correspondiente durante S4, en la cual los organismos permanecieron hasta el final del experimento (día 16). Al mismo momento, el agua control también fue reemplazada por agua de mar artificial recién preparada. El agua natural colectada en LR y BM se filtró a través de una malla de 50 micras y se ajustó a una salinidad de 15. La salinidad del agua colectada en BM durante S3 fue incrementada de su valor original (7,9) al encontrado en LR (14,8) mediante la adición de una cantidad apropiada de sal marina. No fue necesario ajustar la salinidad del agua

recogida durante S4 ya que ambos sitios presentaron valores similares y cercanos de 15 (LR = 15.9, MB = 16,1).



Figura 3. Tanques experimentales durante el experimento 1

Durante el experimento, los copépodos fueron alimentados con *Rhodomonas* sp. a un nivel constante de $500 \mu\text{gC L}^{-1}$. La medición de concentración de alimento en los tanques experimentales y en la solución algal de adición se llevó a cabo aproximadamente a la misma hora todos los días. La concentración celular se midió con un analizador de partículas Elzone 5390 II equipado con un tubo de 95 micras de orificio, y el contenido de carbono algal se estimó a partir del volumen de las células de acuerdo con Mullin y colaboradores (Mullin *et al.*, 1966). Típicamente, estos análisis implicaron el conteo de entre 1×10^4 y 1.4×10^6 células/mL.

Con el fin de mantener las poblaciones experimentales sincronizadas en edad, únicamente los adultos fueron colectados y regresados a los tanques experimentales durante el reemplazo del agua en el día 8. La sincronización en edad de los tratamientos experimentales fue necesaria ya que estudios previos en esta especie indican que el daño oxidativo es afectado por la edad de los organismos (Rodríguez-Graña *et al.*, 2010). Al día 12, se estimó la tasa de consumo, tasa de producción de huevos y porcentaje de eclosión de huevos, y al final del experimento (día 16) 120 hembras adultas fueron colectadas de cada tanque y almacenadas en tubos eppendorf en

nitrógeno líquido para su posterior análisis de daño oxidativo. Paralelamente, se extrajeron muestras de densidad de cada tanque a lo largo del experimento (día 3, 7, 13 y 16).

Previo al inicio del experimento, se desarrolló un ensayo piloto con agua colectada durante S1 y S2 bajo un protocolo idéntico al descrito anteriormente, excepto por el uso de agua de mar natural de la costa de La Paloma (Rocha, Uruguay, 34 ° 39 'S - 54 ° 10' W) como control. Por razones desconocidas, las poblaciones en los tanques control colapsaron cerca del final del ensayo, por lo que no fue posible la colecta de organismos para el análisis de daño oxidativo. Sin embargo, las tasas de producción de huevos y consumo fueron estimadas para cada tratamiento en el día 12 y los datos se muestran en la sección Resultados.

Experimento 2. Se incubaron huevos de *A. tonsa* provenientes del cultivo de laboratorio en tanques de 20 L con agua de mar artificial (salinidad = 15, ca. 500 huevos L⁻¹) y se mantuvieron a 18 °C hasta el estadio copepodito I (correspondiente a 7 días de edad). Una vez en este estadio, una cohorte fue sometida a incrementos y descensos alternados de salinidad de 5 unidades cada 12 horas respecto al nivel de aclimatación de largo plazo (salinidad= 15, de modo de abarcar el rango 10 – 20) durante 15 días. Los cambios de salinidad se realizaron moviendo de una vez la cohorte experimental de un tanque con un nivel de salinidad a otro tanque con una salinidad diferente mediante un procedimiento análogo al utilizado por Calliari & Tiselius (Calliari & Tiselius, 2005) (Fig. 4). Una segunda cohorte se sometió al mismo protocolo de movimientos entre tanques con una salinidad constante de 15 durante todo el experimento. Cada condición experimental se consideró por triplicado (Fig. 2). El primer cambio de salinidad se consideró como el inicio del experimento (t0). El agua de mar artificial se preparó mediante la dilución de una mezcla comercial de sal marina en agua destilada/declorada. Al día 8, se recambió el agua de todos los tanques experimentales por agua de mar artificial recién preparada con su correspondiente salinidad, la cual se mantuvo hasta el final del experimento (día 15).

Los copépodos fueron alimentados durante el experimento con *Rhodomonas* sp. a un nivel constante de 500 µgC L⁻¹. Las mediciones de concentración de alimento en los tanques experimentales y en la solución algal de adición se llevaron a cabo inmediatamente antes del pasaje de los animales a la condición de salinidad/control en cuestión, utilizando el Elzone 5390 II de igual forma a lo descrito para el *experimento 1*.

Con el fin de mantener las poblaciones experimentales sincronizadas en edad, únicamente los adultos fueron transferidos durante los cambios de salinidad removiendo huevos y nauplios. Al día 12, se estimó la tasa de consumo y producción de huevos, y al final del experimento (día 15) 120 hembras y 120 machos en estadio adulto fueron colectados de cada tanque y almacenados en tubos eppendorf en nitrógeno líquido para su posterior análisis de daño oxidativo. A diferencia de lo realizado en el experimento 1, también fueron colectados *A. tonsa* machos para análisis de daño oxidativo y se realizaron comparaciones entre sexos. De forma rutinaria se extrajeron muestras de densidad de cada tanque a lo largo del experimento (día 0, 3, 6, 12 y 15).



Figura 4. Experimento 2. Movimiento de organismos entre tanques experimentales de distinta/igual salinidad

Estimación de variables de respuesta

Incidencia de copéodos muertos (ICM). Las muestras colectadas en BM y LR fueron descongeladas utilizando agua filtrada *in situ* y acidificadas con HCl 1 M para desarrollar el color de la tinta en el interior de los animales. Después de esto, se observaron bajo microscopio estereoscópico para determinar el estado de los organismos (vivo / muerto) (Dressel *et al.*, 1972; Elliott & Tang, 2009).

Daño oxidativo: carbonilación de proteínas. Las muestras se homogeneizaron en un buffer de lisis Tris-HCl 50 mM (pH = 7.8, DTT 50 mM, 0.5% Triton e inhibidor de proteasas) utilizando

un sonicador (Omni-OR250-115), se centrifugaron a 14.000 g durante 8 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteína se calculó por triplicado utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) con albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La oxidación de proteínas fue analizada mediante la medición de los niveles de dinitrofenilhidrazona derivados de la reacción covalente entre los grupos carbonilos de las proteínas y 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) utilizando el Kit Oxyblot S7150 (Millipore®). Las muestras protéicas fueron derivatizadas (7,5 µg por muestra) y separadas por electroforesis unidimensional (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida 11%, seguido por Western blot realizado según lo descrito en las especificaciones del Kit (No. Catalogo S7150). El patrón de marcaje de los anticuerpos se visualizó mediante quimioluminiscencia usando ECL plus (GE Healthcare) y posterior revelado por autorradiografía. La intensidad de la señal se cuantificó por densitometría con el software Image J (Schneider *et al.*, 2012). Para el análisis cuantitativo, sólo fueron consideradas aquellas bandas de proteínas con límites bien definidos. Los resultados se muestran en términos de intensidad, los cuales corresponden a la suma de las intensidades individuales de cada banda para cada tratamiento/sitio (Fig. 5).

Identificación de proteínas carboniladas: En el marco del proyecto ANII FCE_2011_1_6872 “Implicancias de la senescencia sobre la biología reproductiva y eco-fisiología de copépodos marinos” se procedió a la identificación de proteínas carboniladas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/MS). Un extracto de proteínas de copépodos (15 µg) sin ningún tratamiento fue separado por electroforesis (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida 11% y teñido con azul de coomassie. Aquellas bandas con el mismo peso molecular que las observadas en el western blot realizado con el Kit oxyblot fueron cortadas manualmente y conservadas a -20 C para su identificación por MALDI-TOF/MS en el Instituto Pasteur de Montevideo.

Tasas vitales: Se estimó la tasa de producción de huevos (TPH, huevos ind⁻¹ d⁻¹), porcentaje de eclosión de huevos (PEH, %) y tasa de consumo (TC, µgC ind⁻¹ d⁻¹) para cada réplica de los tanques experimentales al día 12, mediante la incubación de 5 hembras en una botella de borosilicato (312 ml) durante 24 h. Las hembras adultas fueron separadas de forma individual y transferidas a botellas con el agua correspondiente de cada tratamiento (LR, BM y control en el experimento 1, y agua artificial a salinidad 15 en el experimento 2) y una suspensión de *Rhodomonas* sp. a una concentración de 500 µgC L⁻¹. Tres botellas control (sin copépodos)

fueron preparadas para cada tratamiento. Todas las botellas fueron selladas para evitar la presencia de burbujas, y se mantuvieron a 18 °C bajo un ciclo natural de luz:oscuridad. A las 24 h, los contenidos de las botellas se tamizaron por una malla de 50 micras, se registró el número hembras supervivientes, y se contaron los huevos bajo microscopio para estimar TPH (expresada como huevos $\text{ind}^{-1} \text{d}^{-1}$). Los huevos se transfirieron a placas de múltiples pocillos con agua correspondiente a cada tratamiento y se mantuvieron a 18 °C. El número de nauplios eclosionados se registró después de 48 h, y el PEH se calculó como el número de nauplios eclosionados dividido por el número total de huevos producidos en cada botella. Para estimar TC, se contó el número de células al final de las incubaciones en las botellas experimentales y controles utilizando un Elzone 5390 II y se calculó la tasa de aclarado de acuerdo a Frost (Frost, 1972), la cual corresponde al volumen de agua filtrada por unidad de tiempo (F ; $\text{Ind ml}^{-1} \text{d}^{-1}$). La TC se calculó multiplicando F por la concentración media de células durante la incubación y se expresa en unidades de Carbono ($\mu\text{gC ind}^{-1} \text{d}^{-1}$).

Análisis de datos

Se utilizaron modelos lineales generalizados (GLM) con distribución normal para evaluar diferencias entre los tratamientos experimentales, y entre sitios (para las respuestas estimadas *in situ*). En el caso de la variable intensidad de bandas (= carbonilación) en el experimento 2 y la variable ICM en la aproximación de campo, se analizó además la interacción entre tratamiento y sexo, y entre sitios y fecha de muestreo, respectivamente, mediante ANOVA de dos vías. La normalidad y homocedasticidad de los residuales fue verificada por métodos gráficos. Se utilizaron gráficos Cuantil-cuantil (*QQ-plots*) de los residuales de la regresión para evaluar el supuesto de distribución normal de los errores, y gráficos de residuales estandarizados *vs.* valores ajustados para identificar patrones inesperados de varianza. Además, la normalidad y homocedasticidad fue corroborada mediante test de Shapiro-Wilk y Levene's respectivamente. Cuando los supuestos de normalidad y/o homocedasticidad no fueron cumplidos, se realizaron transformaciones simples (raíz cuadrada, log, o arcsen raíz). En un único caso (PEH) se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis ya que ninguna transformación resultó útil. Todos los análisis de datos se realizaron con el software R (R Core Team, 2011).

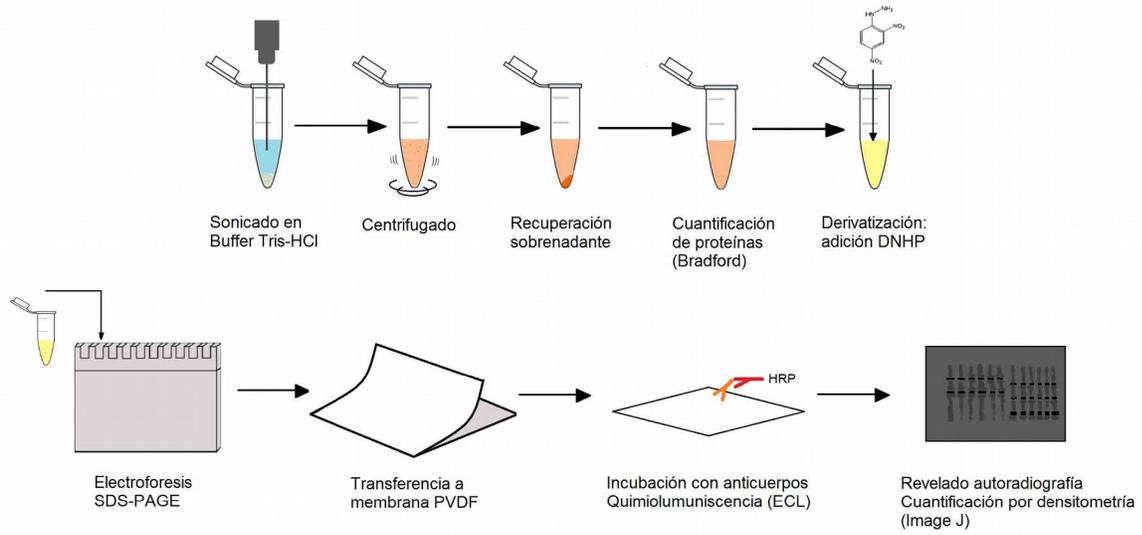


Figura 5. Método de detección de proteínas carboniladas mediante la utilización del Kit oxyblot (Millipore)

RESULTADOS

Estimaciones in situ

Las condiciones ambientales de los sitios de referencia se resumen en la Tabla I. Ambos sitios presentaron valores similares de salinidad, temperatura y oxígeno disuelto, mientras que la turbidez, MOP y clorofila-*a* fueron mayores en LR. La mayor diferencia entre los sitios correspondió a la concentración de nutrientes disueltos la cual en todos los casos fue claramente mayor en BM. Además, se detectaron colonias de cianobacterias *Microcystis* sp en muestras de agua de BM durante S1 y S3. Respecto a la comunidad zooplanctónica, *A. tonsa* fue la especie dominante en ambos sitios en todos los muestreos.

Tabla I. Rango de profundidad (*z*), salinidad (Sal), temperatura (Temp), turbidez (Turb), oxígeno disuelto (OD), Clorofila-*a* (Clo-*a*), materia orgánica particulada (MOP) y nutrientes disueltos (NO₂²⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻) en Laguna de Rocha (LR) y Bahía de Montevideo (BM)

Sitio	<i>z</i> (m)	Sal.	Temp. (°C)	Turb. (NTU)	OD (mg L ⁻¹)	Clo- <i>a</i> (mg m ³)	MOP (mg L ⁻¹)	NO ₂ ²⁻ (μmol L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (μmol L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (μmol L ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ (μmol L ⁻¹)
LR	1.0-1.5	11.2-15.9	19.2-21.5	16.5-128.0	8.0-10.4	2.0-19.2	20.9-35.2	0.12-0.18	0.29-2.04	0.06-2.71	0.28-0.51
BM	1.8-2.2	2.6-16.1	18.7-20.4	0.0-35.3	7.3-9.6	2.5-7.7	2.4-13.6	0.46-1.08	1.77-3.90	6.73-94.40	0.49-1.92

Los valores representan el rango observado en cada sitio durante los cuatro muestreos.

La Figura 6A muestra los Western blots de proteínas carboniladas en organismos *in situ*, en los cuales pudieron ser detectadas proteínas dañadas como bandas oscuras bien definidas. Ambos sitios presentaron un patrón de bandas similar (i.e. número y peso molecular). Los análisis cuantitativos de la intensidad de bandas muestran una tendencia a mayores valores promedio en BM respecto a LR en todos los muestreos, pero no se hallaron diferencias significativas en ningún caso (Fig. 6B). La incidencia promedio de copépodos muertos total fue similar en BM (4.4 %) y LR (3.8 %). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre sitios en los cuatro muestreos (e.g. S1: GLM, $t = 4.3$, $gl = 5$, $p = 0.013$); aunque se halló un patrón opuesto en cada período, el cual se reflejó en una interacción significativa entre sitio y muestreo (ANOVA, $F = 26.1$, $gl = 3$, $p = 2.1 \times 10^{-6}$) (Fig. 7).

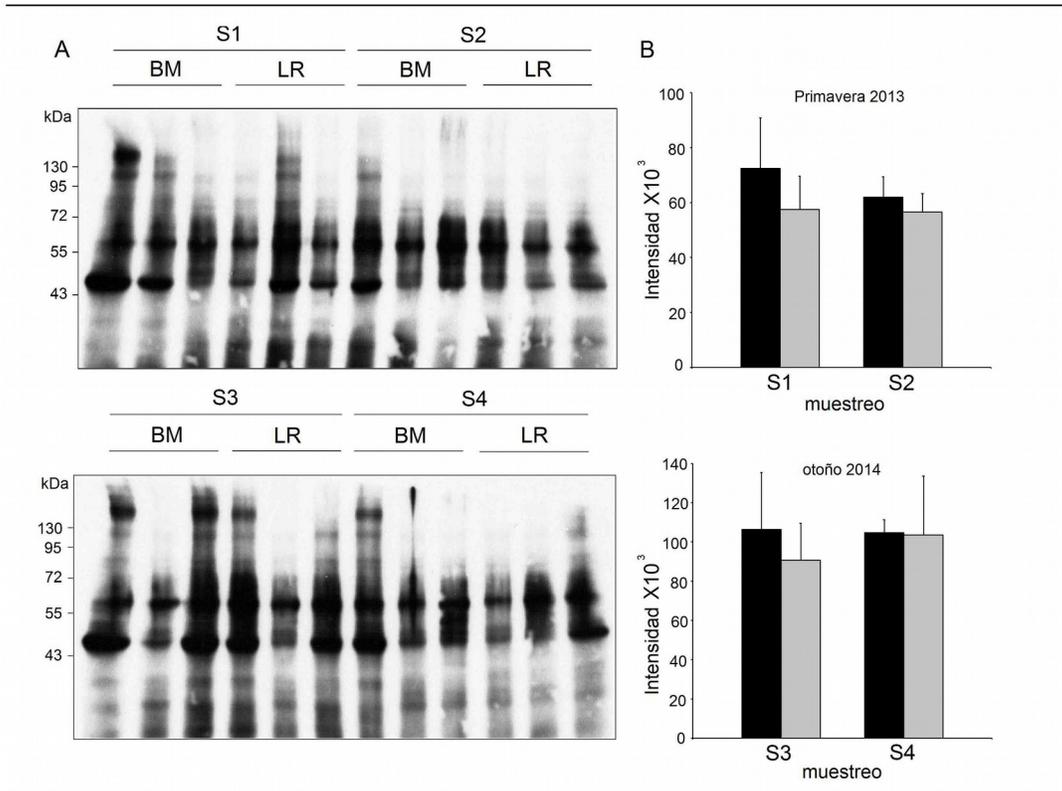


Figura 6. A) Western blots de proteínas carboniladas en copépodos de BM y LR para cada muestreo (S1-S4). B) Análisis cuantitativos: Niveles de intensidad en BM (barras negras) y LR (barras grises). Mayor intensidad indica mayor nivel de proteínas carboniladas. Los resultados de cuantificación se muestran en gráficos separados por período debido a que fueron obtenidos de geles diferentes. Líneas de error corresponden a desvíos estándar.

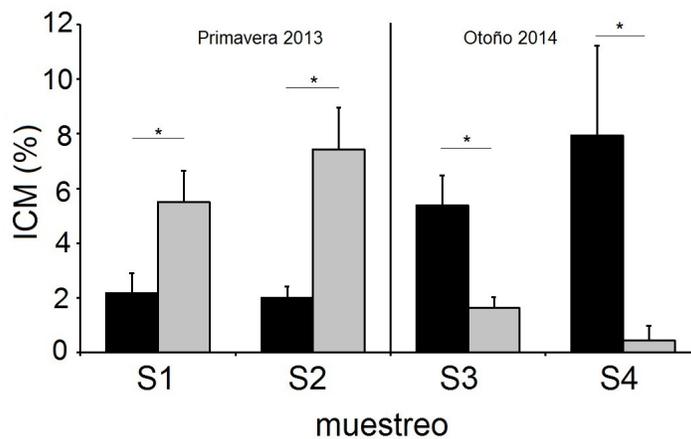


Figura 7. Incidencia de copépodos muertos en BM (barras negras) y LR (barras grises) en cada muestreo (S1-S4). (*) diferencias significativas ($p < 0.05$). Líneas de error corresponden a desvíos estándar.

Estimaciones de laboratorio

Experimento 1. Los análisis de daño oxidativo evidenciaron mayores niveles de carbonilación de proteínas en el tratamiento de baja calidad de agua BM en comparación a LR (GLM; $t = -3.4$, $gl = 8$, $p = 0.015$) y al control (GLM; $t = -2.7$, $gl = 8$, $p = 0.035$). Los tratamientos presentaron un patrón de bandas similar, en el cual las proteínas entre 43 y 72 kDa de peso molecular (PM) fueron las más susceptibles a la oxidación (Fig. 8). La TC y PEH no fueron afectadas bajo condiciones experimentales, presentado valores promedio entre 2.9 y 3.9 $\mu\text{gC ind}^{-1} \text{d}^{-1}$ y $>90\%$ respectivamente. En cambio, la TPH fue mayor en el tratamiento BM en comparación a LR y al control, pero únicamente se observaron diferencias significativas entre BM y el control (GLM; $t = -2.8$, $gl = 8$, $p = 0.033$). Las tasas vitales estimadas en el experimento 1 y ensayo piloto presentaron patrones idénticos, excepto por las diferencias significativas encontradas en las TC entre el tratamiento BM y LR en el ensayo piloto (GLM, $t = -2.5$, $gl = 8$, $p = 0.045$) (Fig. 9). La densidad de organismos presentó una tendencia de disminución a lo largo del experimento, la cual fue similar en los tratamientos y control (Fig. 10A).

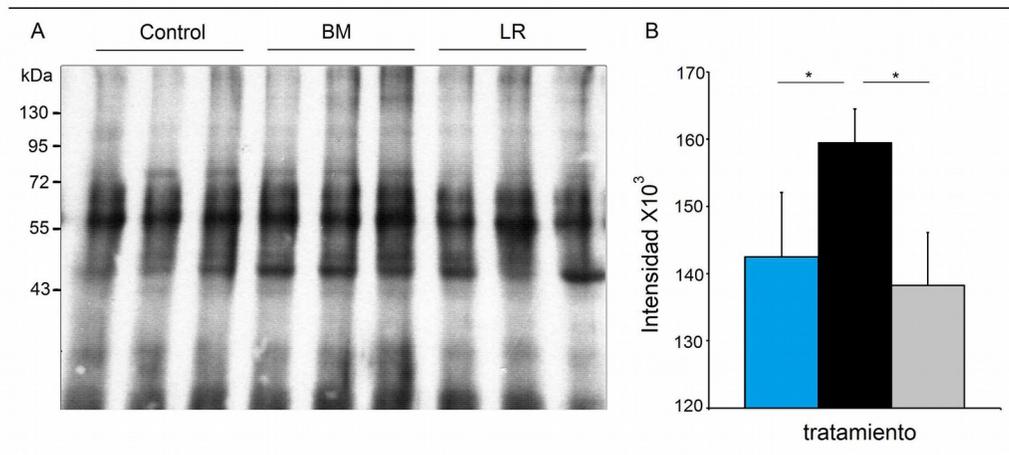


Figura 8. Experimento 1: A) Western blot de proteínas carboniladas de copépodos *A. tonsa* en cada tratamiento. B) Análisis cuantitativo: niveles de intensidad en tratamiento control (barra azul), BM (barra negra) y LR (barra gris). Mayor intensidad indica mayor nivel de proteínas carboniladas. (*) diferencias significativas ($p < 0.05$). Líneas de error corresponden a desvíos estándar.

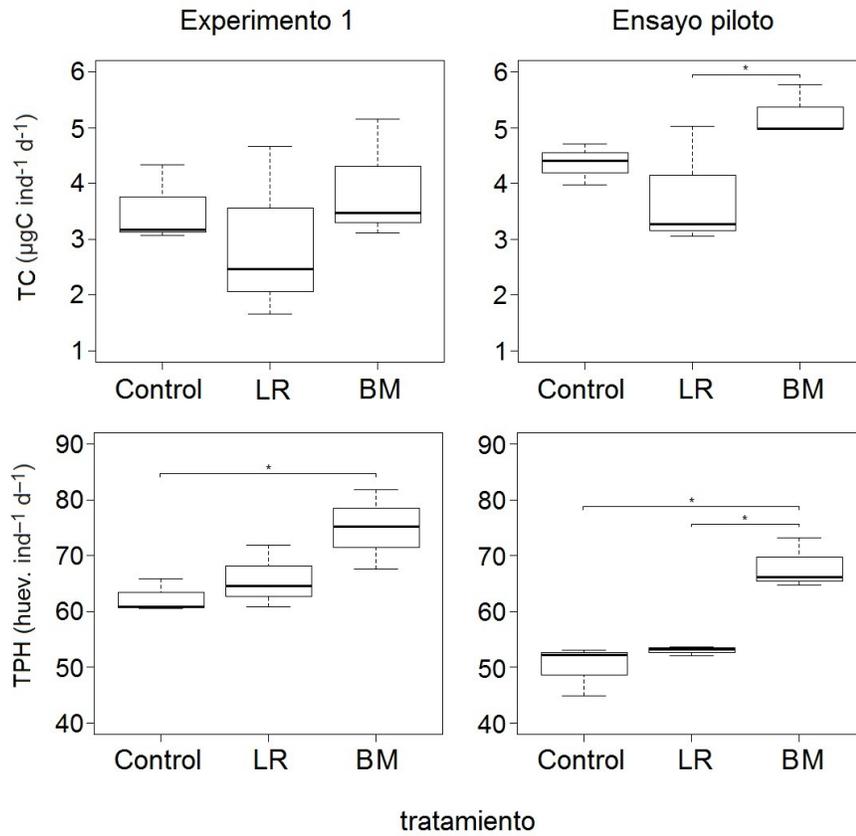


Figura 9. Tasas de consumo (TC, $\mu\text{gC ind}^{-1} \text{d}^{-1}$) y producción de huevos (TPH, huevos $\text{ind}^{-1} \text{d}^{-1}$) de *A. tonsa* medidas en el Experimento 1 y Ensayo piloto en el tratamiento Control, Laguna de Rocha (LR) y Bahía de Montevideo (BM). La línea media representa la mediana, la caja representa el rango entre el primer y tercer cuartil, y la línea punteada el intervalo de confianza 95%. (*) diferencias significativas ($p < 0.05$)

Experimento 2. El análisis de proteínas carboniladas mostró mayores niveles en hembras sometidas al tratamiento de salinidad variable (Sv) en comparación al control (GLM, $t = 9.6$, $gl = 5$, $p = 6.5 \times 10^{-4}$), mientras que en los machos no se observaron diferencias. Esta diferencia en el patrón de respuesta entre hembras y machos se vio reflejada en una interacción significativa entre los factores tratamiento y sexo (ANOVA, $F = 10.50$, $gl = 1$, $p = 0.012$). El patrón de baneo fue similar entre tratamientos dentro de cada sexo, pero distinto entre sexos. Los machos presentaron niveles significativamente mayores de proteínas carboniladas que las hembras (ANOVA, $F = 46.47$, $gl = 1$, $p = 1.4 \times 10^{-4}$), así como un mayor número de proteínas carboniladas

(machos: 6 bandas, rango de PM ca. 40 – 130 kDa; hembras: 2 bandas, rango de PM ca. 50 – 72 kDa) (Fig. 11). Al igual que en el experimento 1, no se observaron diferencias en las tasas vitales entre el tratamiento de salinidad variable y control (Fig. 12). En la Figura 10B se muestra las densidades de organismos en el tratamiento de salinidad variable y control a lo largo del experimento

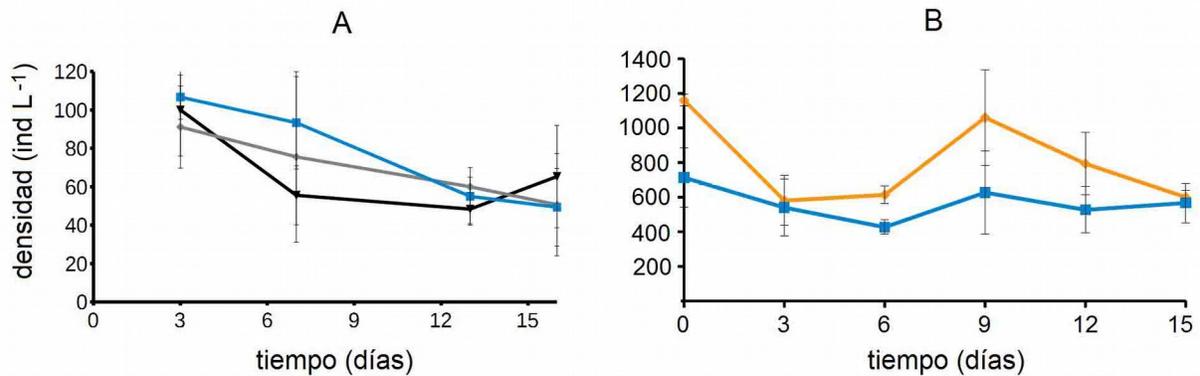


Figura 10. A) Densidad de individuos durante el Experimento 1 en los tanques experimentales: Control (azul), LR (gris) y BM (negro). B) Densidad de individuos durante el Experimento 2 en los tanques experimentales: Control (azul) y tratamiento de salinidad variable (anaranjado). Líneas de error corresponden a desvíos estándar.

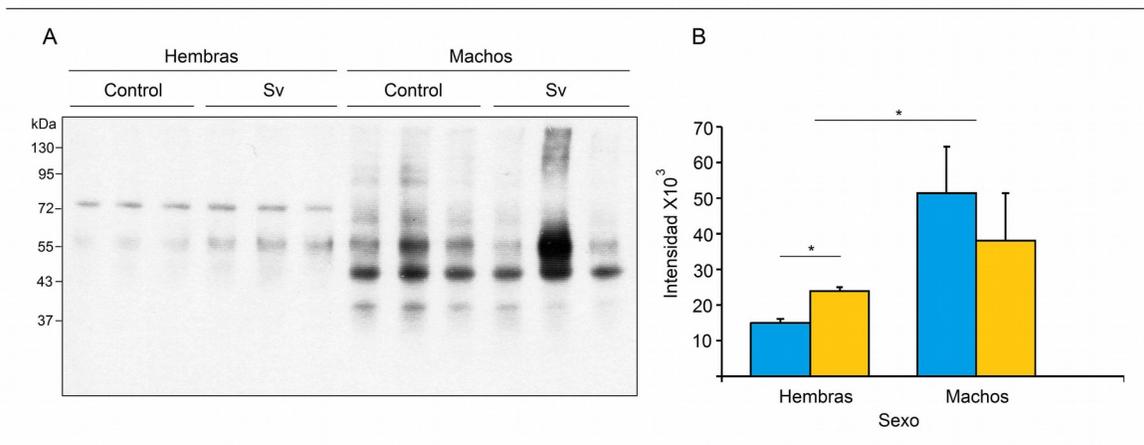


Figura 11. Experimento 2: A) Western blot de proteínas carboniladas de copépodos *A. tonsa* hembras y machos en el control y tratamiento de salinidad variable (Sv). B) Análisis cuantitativo: niveles de intensidad en hembras y machos del tratamiento control (barra azul) y salinidad variable (barra anaranjada). Mayor intensidad indica mayor nivel de proteínas carboniladas. (*) diferencias significativas ($p < 0.05$). Líneas de error corresponden a desvíos estándar.

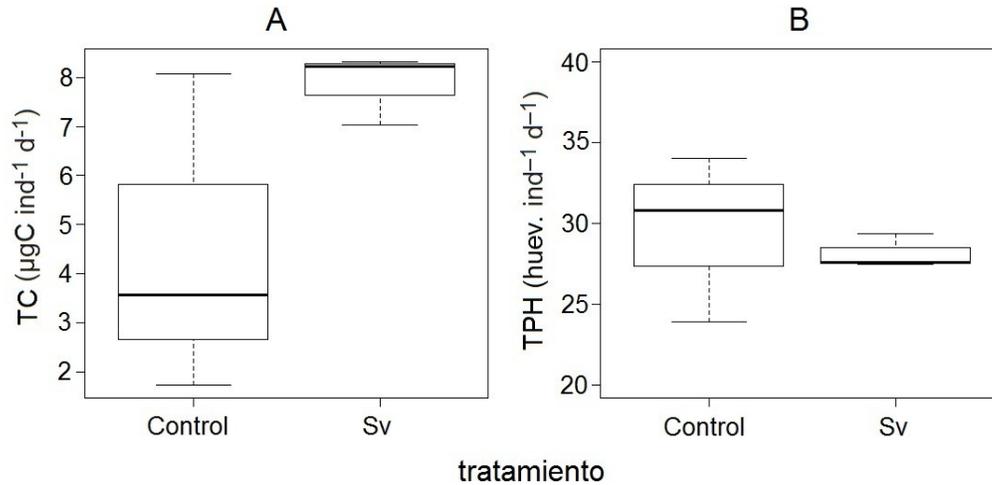


Figura 12. Tasas de consumo (TC, $\mu\text{gC ind}^{-1} \text{d}^{-1}$) y producción de huevos (TPH, $\text{huevo. ind}^{-1} \text{d}^{-1}$) de *A. tonsa* medidas en el Experimento 2 en el tratamiento Control y de salinidad variable (Sv). La línea media representa la mediana, la caja representa el rango entre el primer y tercer cuartil, y la línea punteada el intervalo de confianza 95%.

Identificación de proteínas carboniladas. El análisis de espectrometría de masas (MALDI-TOF/MS) permitió la identificación de una banda cercana a 43 kDa como Actina. La misma presentó altos niveles de intensidad (i.e. carbonilación) y fue observada en los western blots tanto de organismos colectados in situ (Fig. 6A) como de los organismos provenientes de las incubaciones de laboratorio (Fig. 8A y 11A).

DISCUSIÓN

El estrés oxidativo se define como una perturbación en el equilibrio entre la producción de especies pro-oxidantes (e.g. ROS) y la capacidad de defensa antioxidante en favor de los primeros, la cual puede conducir a la alteración de macromoléculas (Sies, 2000). Es por esto que el estrés oxidativo puede ser determinado mediante la estimación de la producción de ROS, de la capacidad de defensas antioxidantes, o directamente a través de la estimación de algún tipo de daño oxidativo actual. Las ROS son moléculas altamente reactivas e inestables, por lo que su detección consiste en medidas de productos finales que se forman cuando estas reaccionan con sustancias específicas (e.g. 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato). Las respuestas antioxidantes son también utilizadas como medidas indirectas de ROS, y han sido ampliamente utilizadas como indicadores de estrés oxidativo en estudios de impacto ambiental (Amado *et al.*, 2009). Sin embargo, la producción intracelular de ROS (o los mayores niveles de antioxidantes en la célula) no necesariamente implica toxicidad celular, ya que lo determinante es el equilibrio dinámico pro-oxidantes/antioxidantes, el cual podría resultar en un estado de estrés oxidativo y finalmente en daño intracelular. Por lo tanto, la forma más directa y precisa para evaluar el efecto de estresores externos es mediante la medida de su consecuencia final, el daño oxidativo. En este estudio se utilizó un producto oxidado, carbonilos proteicos, para explorar la relación entre el estrés ambiental y el estrés oxidativo usando copépodos como organismo modelo. Este trabajo es, a nuestro conocimiento, el primero en evaluar la carbonilación de proteínas en este grupo de organismos en un contexto de estrés ambiental.

Las condiciones de alta y baja calidad de agua atribuidas a LR y BM, respectivamente, basadas en estudios previos fueron apoyadas por los datos físicoquímicos y biológicos registrados durante la presente investigación. Tanto el nitrógeno inorgánico disuelto (NID) como el fósforo inorgánico disuelto (FID) fueron mayores en BM; y específicamente la forma reducida de NID (NH_4^+) fue entre uno y dos órdenes de magnitud superior en BM, probablemente reflejando altos niveles de materia orgánica y procesos activos de nitrificación, en consonancia con el entorno ambiental general de BM (puerto, refinería de petróleo, descarga de arroyos contaminados). Además, la presencia de la cianobacteria *Microcystis* sp en BM es un indicador de degradación ambiental y una probable fuente adicional de estrés para los organismos que allí

habitan (Amado & Monserrat, 2010; Engström-Öst *et al.*, 2015). Los mayores niveles de MOP y turbiedad en LR en comparación a BM son el resultado de su escasa profundidad (ca. 1m) la cual favorece la resuspensión continua de fitoplancton y otras partículas entre la columna de agua y el sedimento (Calliari *et al.*, 2009).

Las condiciones contrastantes de calidad de agua en LR y BM no resultaron en diferencias claras en los niveles de carbonilación de proteínas de copépodos silvestres. Se observó una tendencia sistemática de mayores niveles de oxidación de proteínas en BM respecto a LR, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En contraste, bajo condiciones experimentales los copépodos incubados en agua colectada en BM presentaron niveles significativamente más altos de carbonilación de proteínas que aquellos incubados en agua de LR y control. La aparente inconsistencia entre los resultados de campo y de laboratorio en relación a la carbonilación de proteínas puede ser consecuencia de la alta variabilidad en la respuesta de los copépodos silvestres. Esto no es sorprendente, considerando que en condiciones naturales hay muchos factores no controlados que pueden potencialmente contribuir a la varianza de tales respuestas. Estos factores incluyen la historia reciente de las condiciones experimentadas por los individuos, así como aquellas a las que fueron expuestas durante su desarrollo ontogénico (i.e. salinidad, temperatura, sustancias tóxicas naturales y de origen antropogénico). El flujo de organismos entre los sitios de referencia y los ecosistemas próximos (aguas atlánticas costeras en el caso de LR, y el estuario del Río de la Plata en el caso de BM) podría implicar que la variabilidad en las respuestas debido a las diferencias en las condiciones experimentadas por los organismos en el pasado sea muy importante. Además, la edad es otra posible fuente de variabilidad en los niveles de oxidación de proteínas. Estudios previos en *A. tonsa* han encontrado un incremento en los niveles de proteínas carboniladas en organismos senescentes (Rodríguez-Graña *et al.*, 2010; Rodríguez-Graña, proyecto ANII FCE_2011_1_6872, 2015). Si bien en el presente estudio sólo se seleccionaron hembras adultas para el análisis de carbonilación de proteínas, en el caso de organismos silvestres su edad no puede ser determinada. Tratándose además de organismos de reproducción continua, en la práctica esto implica que las muestras analizadas seguramente hayan estado representadas por hembras adultas de diferentes edades.

Por otra parte, la incidencia de copépodos muertos fue baja en ambos sitios en comparación con estudios anteriores en el Río de la Plata (Martínez *et al.*, 2013) y en otros ecosistemas (Tang *et al.*, 2006). Durante el primer período la ICM fue mayor en LR que en BM, mientras que durante el segundo ocurrió lo contrario. Los mayores porcentajes de organismos muertos encontrados en BM durante el segundo período (S3 y S4) fueron consistentes con los mayores niveles de daño oxidativo encontrados bajo condiciones experimentales en el tratamiento BM en el que se utilizó agua colectada durante S3 y S4.

De acuerdo a lo esperado, los resultados del Experimento 1 evidenciaron mayores niveles de proteínas carboniladas en el tratamiento de baja calidad de agua BM en comparación al tratamiento LR y control. Todas las bandas cuantificadas siguieron este patrón, pero la banda correspondiente a la actina (banda ca. 43 kDa) presentó la mayor diferencia entre el tratamiento BM y control (los datos de intensidades individuales por banda no se muestran). Aunque generalmente se asume que cualquier proteína es un potencial blanco de oxidación, algunas proteínas pueden ser más susceptibles que otras (Nystrom, 2005). La actina ha sido señalada como una proteína altamente susceptible a la oxidación, no sólo por su presencia ubicua en las células, sino también debido a su gran variedad de funciones (Castro *et al.*, 2012). McDonagh y colaboradores (2005) encontraron niveles elevados de actina carbonilada en tejidos de mejillones (*Mytilus edulis*) colectados en zonas contaminadas, siendo hasta el momento el único antecedente de carbonilación de actina en un contexto medioambiental. El rol clave de la actina en muchas funciones celulares que va desde la motilidad y mantenimiento de la forma celular, a la polaridad de la regulación de la transcripción (Domínguez & Holmes, 2011), resalta la importancia de los resultados encontrados en la presente investigación, debido a las posibles consecuencias funcionales que el daño a esta proteína pueda generar en los organismos. Se ha demostrado que altos niveles de carbonilación en la actina pueden estar asociados a diversas modificaciones oxidativas severas generando drásticas pérdidas en funcionalidad. Un ejemplo es la oxidación de los residuos de metionina la cual puede conducir a una fuerte inhibición de la polimerización de la actina o incluso a la degradación completa de los filamentos (Dalle-Donne *et al.*, 2001).

Las condición de salinidad variable evaluada mediante el Experimento 2 también significó una fuente de estrés oxidativo para *A. tonsa*. Las hembras sometidas al tratamiento de salinidad

variable Sv presentaron mayores niveles de proteínas carboniladas respecto al control. Estas diferencias estuvieron dadas principalmente por una banda protéica ca. 55 kDa. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en machos, los cuales presentaron niveles de proteínas carboniladas y número de bandas significativamente mayores que las hembras. Este último resultado apoya el patrón observado para esta especie en estudios previos, en los cuales los machos presentaron mayores niveles de carbonilación de proteínas y nitración de tirosinas (y mayor número de bandas protéicas modificadas en ambos casos) que las hembras (Rodríguez-Graña *et al.*, 2010; Rodríguez-Graña, proyecto ANII FCE_2011_1_6872, 2015). Es posible que los altos niveles de carbonilación de proteínas encontrados en machos tanto en el tratamiento Sv como en el control en comparación a las hembras, puedan haber enmascarado potenciales diferencias entre tratamientos. A diferencia de lo encontrado en el experimento 1, no pudo ser detectada una señal cuantificable de actina carbonilada en hembras del experimento 2. Sin embargo, en los machos de ambos tratamientos la banda correspondiente a la actina fue la que presentó mayores niveles de carbonilación. Es necesario aclarar que no es posible realizar comparaciones entre los resultados de los Western blots de ambos experimentos debido a que estos fueron realizados a partir de diferentes geles, y la transferencia de proteínas, incubación con anticuerpos y revelado realizados de forma separada.

Contrario a lo esperado, las tasas vitales fueron similares entre tratamientos en ambos experimentos, o incluso mayores (TPH) en el tratamiento de baja calidad de agua BM en el experimento 1. Las respuestas medidas se encuentran entre las funciones biológicas más relevantes a nivel del individuo, i.e., ingesta de alimentos, crecimiento y fecundidad. Si bien existen numerosos ejemplos de variables que modulan las tasas biológicas en esta especie (e.g. temperatura, concentración y calidad de alimento, exposición a concentraciones elevadas de contaminantes, entre otros), generalmente las condiciones simuladas son extremas y las respuestas evaluadas en el orden de horas. Es posible que la ausencia de diferencias en las tasas vitales en este trabajo se deba a que los efectos sobre las mismas no sean de carácter acumulativo, por lo que la exposición a niveles de estrés moderados por períodos prolongados de tiempo hagan poco probable su detección. Por el contrario, la carbonilación de proteínas es un proceso irreversible y acumulativo, lo cual hace más factible la visualización de un efecto en experimentos de larga duración.

El desacople entre las respuestas moleculares y fisiológicas y lo discutido anteriormente no implican necesariamente que el daño a nivel molecular no tenga consecuencias sobre el rendimiento fisiológico. *A. tonsa* es una especie bien conocida por su capacidad de soportar condiciones ambientales adversas y fuertemente variables (Cervetto *et al.*, 1999; Calliari *et al.*, 2006). Es posible que los niveles de daño oxidativo inducidos no hayan sido suficientemente altos para desencadenar efectos medibles sobre las respuestas fisiológicas en esta especie. La idea implícita en esta suposición, es que puede haber un umbral crítico de daño de proteínas por encima del cual el desempeño de las tasas biológicas se vea afectado, mientras que por debajo del mismo las funciones sean resilientes al daño oxidativo. Estas son ideas especulativas que necesitan ser evaluadas en futuras investigaciones.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo permitió poner a punto un método de detección de proteínas carboniladas en organismos complejos. Mediante el mismo fue posible visualizar bandas correspondientes a proteínas modificadas de pesos moleculares específicos, e incluso identificarlas mediante comparaciones con estudios relacionados. La importancia de la actina, y la evidencia de mayores niveles de carbonilación mediada por estresores externos incentiva el desarrollo de investigaciones futuras. Este tipo de resultados, junto a los encontrados por Rodríguez-Graña y colaboradores (Rodríguez-Graña, proyecto ANII FCE_2011_1_6872, 2015), son los primeros reportados en copépodos, grupo ampliamente dominante y de gran importancia funcional en los ecosistemas acuáticos. Este trabajo provee además evidencia consistente con la hipótesis que predice un incremento en los niveles de estrés oxidativo bajo condiciones de estrés ambiental. Si bien cada vez son más los trabajos que ratifican dicha hipótesis, es necesario continuar trabajando y ampliar el espectro de organismos estudiados para hacer de la misma una hipótesis más robusta y generalizada. Por otra parte, el desacople entre las respuestas moleculares y fisiológicas observado en *A. tonsa* reafirma la condición de esta especie como altamente tolerante y exitosa. El patrón de respuestas encontrado aquí, representa un desafío para investigaciones futuras y enfatiza la importancia de aproximaciones integrales en evaluaciones de calidad ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- Abele, D., Burlango, B., Viarengo, A., Pörtner, H. O., (1998) Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comp. Biochem. Physiol.* **120**, 425-435
- Abele, D., Heise, K., Poertner, H. O., Puntarulo, S., (2002) Temperature dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* **205**, 1831-1841
- Abele, D., Vazquez-Medina, J., Zenteno-Savin, T., (eds) (2012) *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. First Edition. Blackwell Publishing.
- ANCAP 2015. <http://www.ancap.com.uy/> last visited on 20th april 2015.
- Almroth, B., Sturve, J., Berglund, A., Forlin, L., (2005) Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat. Toxicol.*, **7**, 171–180.
- Amado, L. L. and Monserrat, J. M., (2010) Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. *Environ. Int.*, **36**, 226–235.
- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Yunes, J. S., Monserrat, J. M., (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.*, **407**, 2115–2123.
- Beckman, K., B., Ames, B. N., (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, **78**, 547–581.
- Braconi, D., Bernardini, G., Santucci, A., (2011) Linking protein oxidation to environmental pollutants: Redox proteomic approaches. *J. Proteomics*, **74**, 2324–2337.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramme quantities of protein using the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Calbet, A., Landry, M. R. and Scheinberg, R. D., (2000) Copepod grazing in a subtropical bay: species-specific responses to a midsummer increase in nanoplankton standing stock. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **193**, 15–84.
- Calliari, D., Andersen Borg, M. C., Thor, P., Gorokhova, E., Tiselius, P., (2008) Instantaneous salinity reductions affect the survival and feeding rates of the co-occurring copepods *Acartia tonsa* Dana and *A. clausi* Giesbrecht differently. *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.*, **87**, 501–506.
- Calliari, D., Andersen, C., Thor, P., Gorokhova, E., Tiselius, P., (2006) Salinity modulates the energy balance and reproductive success of co-occurring copepods *Acartia tonsa* and *A. clausi* in different ways. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **312**, 177–188.

- Calliari, D., Britos, A., Conde, D., (2009) Testing the relationship between primary production and *Acartia tonsa* grazing pressure in an estuarine lagoon. *J. Plankton Res.*, **31**, 1045–1058.
- Castro, J. P., Christiane, O., Jung, T., Grune, T., Almeida, H., (2012) Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. *Free Radical Biol. Med.*, **53**, 916–925.
- Cervetto, G., Gaudy, R. and Pagano, M., (1999) Influence of salinity on the distribution of *Acartia tonsa* (Copepoda, Calanoida). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **239**, 33–45.
- Cohen, J., Samall, C., Mellinger, A., Galup, J., Sachs, J., (1997) Estimates of coastal populations. *Science*, **278**, 1211–1212.
- Conde, D., Bonilla, S., Aubriot, L., De León, R., Pintos, W., (1999) Comparison of the areal amount of chlorophyll a of planktonic and attached microalgae in a shallow coastal lagoon. *Hydrobiologia*, **408/409**, 285–291.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R. Giustarini, D. et al. (2001) Actin carbonylation: from a simple marker of protein oxidation to relevant signs of severe functional impairment. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1075-1083.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M. et al. (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.*, **10**, 389-406.
- Danulat, E., Muniz, P., Garcia-Alonso, J., Yannicelli, B., (2002) First assessment of the highly contaminated harbour of Montevideo, Uruguay. *Marine Pollution Bulletin*, **44**, 551 – 576
- Denicola, A., Alvarez, B., Thomson, L., (2008) 3-Nitrotyrosine, a posttranslational modification associated with nitroxidative stress. *Free Radical Pathophysiology*. Alvarez, S. and Evelson, P., (ed.) ISBN: 978-81-7895-311-3.
- Diersing, (2009) Water Quality: Frequently Asked Questions. *PDA*. NOAA
- Dominguez, R. and Holmes, K. C., (2011) Actin Structure and Function. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 169–186.
- Dressel, D. M., Heinle, D. R. and Grote, M. C., (1972) Vital staining to sort dead and live copepods. *Chesapeake Sci.*, **13**, 156–159.
- Dröge, W., (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, **82**, 47–95.
- Elliott, D. T. and Tang, K. W., (2009) Simple staining method for differentiating live and dead marine zooplankton in field samples. *Limnol. Oceanogr.: Methods*, **7**, 585–594.
- Elliott, D. T. and Tang, K.W., (2011) Spatial and Temporal Distributions of Live and Dead Copepods in the Lower Chesapeake Bay (Virginia, USA). *Estuar. Coast.*, **34**, 1039–1048.
- Engström-Öst, J., Brutemark, A., Vehmaa, A., Motwani, N. H., Katajisto, T., (2015) Consequences of a cyanobacteria bloom for copepod reproduction, mortality and sex ratio. *J. Plankton Res.*, **0**, 1–11
- Finkel, T., Nikki, J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239-47.

- Frost, B. W., (1972) Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod. *Calanus pacificus*. *Limnol. Oceanogr.*, **17**, 805–815.
- Intendencia de Montevideo. Estudio de la calidad de agua, sedimento y biota del Río de la Plata. Período 2007 - 2009. <http://www.montevideo.gub.uy>
- Johnson, D. L., Ambrose, S. H., Bassett, T., Bowen, M., Crummey, D., Isaacson, J., Johnson, D., Lamb, P., Saul, M., Winter-Nelson, A., (1997). Meanings of environmental terms. *Journal of Environmental Quality*, **26**, 581-589
- Kirchin, M. A., Moore, M. N., Dean, R. T., Winston, G. W., (1992) The role of oxyradicals in intracellular proteolysis and toxicity in mussels. *Mar. Environ. Res.*, **34**, 315–320.
- Kohen, R., Nyska, A., (2002) Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, **30**, 620-650
- Koolhaas, J., Bartolomucci, A., Buwalda, B., De Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., Fuchs, E., (2011) Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **35**, 1291–1301.
- Koroleff, F., (1970) Direct determination of ammonia in natural water as indophenol-blue. International Conference in the Exploration of the Sea (ICES), **3**, 19–22.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B. W., Shaltiel, S., Stadtman, E. R., (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, **186**, 464–78.
- Li, H. C., Zhou, Q., Wu, Y., Fu, J., Wang, T., Jiang, G., (2009). Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 3684–3692.
- Mackereth, F. J. H., Heron, J., Talling, J. F., (1978) Water analysis: some revised methods for limnologists. The Freshwater Biological Association, Ambleside, UK. 120 pp.
- Mann, K. H., Lazier, J. R. N., (2006) Dynamics of Marine Ecosystems: Biological-Physical Interactions in the Oceans. Third Edition. Blackwell Publishing.
- Marcus, N., (2004) An Overview of the Impacts of Eutrophication and Chemical Pollutants on Copepods of the Coastal Zone. *Zool. Stud.*, **43**, 211–217.
- Martínez, M., Espinosa, N., Calliari, D., (2013) Incidence of dead copepods and factors associated with non-predatory mortality in the Río de la Plata estuary. *J. Plankton Res.*, **36**, 265–270.
- Mauchline, J., (1998) The biology of calanoid copepods. *Adv. Mar. Biol.*, **33**, 1–701.

- McDonagh, B., Tyther, R., Sheehan, D., (2005) Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: actin as a target for oxidative stress. *Aquat. Toxicol.*, **73**, 315–326.
- Mullin, M. M., Sloan, P. R., Eppley, R. W., (1966) Relationship between carbon content, cell volume and area in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **11**, 307–311.
- Muniz, P., Venturini, N., Martinez, A., (2002) Physico-chemical characteristics and pollutants of the benthic environment in the Montevideo coastal zone, Uruguay. *Mar. Poll. Bull.*, **44**, 956–976.
- Murphy, J., Riley, J. P., (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim.*, **27**, 31–36.
- Nardo, D., (2011) Estudio del impacto de plaguicidas utilizados en el cultivo de soja y en otras actividades agrícolas sobre las especies acuáticas de consumo humano en el área protegida Laguna de Rocha. Maestría en Nutrición. Universidad católica del Uruguay.
- Nystrom, T., (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.*, **24**, 1311–1317.
- Parsons, T. R., Mata, Y., Lalli, C. M., (1984) A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon, Oxford, UK
- Pytharopoulou, S., Grintzalis, K., Sazaklic, E., Leotsinidis, M., Georgioub, C., Dimitrios, L., Kalpaxisa, D., (2011) Translational responses and oxidative stress of mussels experimentally exposed to Hg, Cu and Cd: One pattern does not fit at all. *Aquatic Toxicology*, **105**, 157-165
- R Development Core Team, (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Radi, R., (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4003 – 4008.
- Rodríguez-Gallego, L., Meerhoff, E., Clemente, J. M., Conde, D., (2010) Can ephemeral proliferations of submerged macrophytes influence zoobenthos and water quality in coastal lagoons? *Hydrobiologia*, **646**, 253–269.
- Rodríguez-Graña, L., Calliari, C., Conde, D., Sellanes, J., Urrutia, R., (2008) Food web of a SW Atlantic shallow coastal lagoon: spatial environmental variability does not impose substantial changes in the trophic structure. *Mar. Ecol Prog. Ser.*, **362**, 69–83.
- Rodríguez-Graña, L., Calliari, D., Tiselius, P., Hansen, B. W., Skold, H. N., (2010) Gender-specific ageing and non-Mendelian inheritance of oxidative damage in marine copepods. *Mar. Ecol Prog. Ser.*, **401**, 1–13.

- Rodríguez-Graña, L., Proyecto ANII FCE_2011_1_6872 “Implicancias de la senescencia sobre la biología reproductiva y eco-fisiología de copépodos marinos”
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W., (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 671–675.
- Seo, J. S., Lee, K-W., Rhee, J-S., Hwang, D-S., Lee, Y-M., Park, H. G., Ahn, I-Y., Lee, J-S., (2006) Environmental stressors (salinity, heavy metals, H₂O₂) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat. Toxicol.*, **80**, 281–28.
- Sevcikova, M., Modra H., Slaninova, A., Svobodova, Z., (2011) Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Veterinarni Medicina*, **56**, 537–546
- Sies, H., (2000) What is oxidative stress? In Keaney, J. F. Jr., (ed.), *Oxidative stress and vascular disease*. Kluwer Academic Publishers, Boston. 1–8.
- Stadtman, E., Levine, R., (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, **25**, 207–218
- Strickland, J. D. H., Parsons, T. R., (1972) A practical handbook of sea water analysis. *Fish. Res. Board Can. Bull.*, **167**, 207–211.
- Tang, K. W., Freund, C. S. and Schweitzer, C. L., (2006) Occurrence of copepod carcasses in the lower Chesapeake Bay and their decomposition by ambient microbes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **68**, 499–508.
- Venturini, N., Muniz, P., Rodríguez, M., (2004) Macrobenthic subtidal communities in relation to sediment pollution: the phylum-level meta-analysis approach in a south-eastern coastal region of South America. *Mar. Biol.*, **144**, 119–126.
- Walker, S. T., Mantle, D., Bythell, J. C., Thomason, J. C., (2000) Oxidative-stress: comparison of species specific and tissue specific effects in the marine bivalves *Mytilus edulis* (L.) and *Dosinia lupinus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **127B**, 347–355.
- Wilhm, J., Dorris, T., (1968) Biological parameters for Water Quality Criteria. *BioScience*, **18**, 477–481.
- Won, E-J. and Lee, J-S., (2014) Gamma radiation induces growth retardation, impaired eggproduction, and oxidative stress in the marine copepod *Paracyclopsina nana*. *Aquat. Toxicol.*, **150**, 17–26.
- Won, E. J., Lee, Y., Han, J., Hwang, U-K., Shin, K-H., Park, H. G., Lee, J-S., (2014) Effects of UV radiation on hatching, lipid peroxidation, and fatty acid composition in the copepod *Paracyclopsina nana*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **165**, 60–66.
- Zaccaron da Silva A., Zanette, J., Ferreira, J., Guzensky, J., Marques, M., Bainy, A., (2005) Effect of salinity on biomarker responses in *Crassostera rhizophorae* (Mollusca Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **62**, 376-382