

**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
Y DE RECURSOS NATURALES**

**CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

**ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR RADIACIÓN UV-B EN CONDICIONES  
DE LABORATORIO PARA EL “BAUNCO” *Girella laevifrons* (PISCES:  
KYPHOSIDAE)**

**TESIS**

**AMANDA LIBERTAD CARRASCO MALIO**

**2011**

**AMANDA LIBERTAD CARRASCO MALIO**

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos para obtener el título profesional de Biólogo Marino

**COMISIÓN DE TÍTULO:**

---

Dr (a): María Eliana Hidalgo Lillo.

*Director*

Universidad de Valparaíso

---

**Dr. Mauricio Landaeta Díaz.**

*Miembro de la comisión*

**Facultad de Ciencias del Mar y de  
Recursos Naturales**

---

**MSc. Georgina Sánchez Parra.**

*Miembro de la comisión*

**Facultad de Farmacia**

## 1. INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DR FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>¿Qué es la Atmósfera? ¿Cuáles son sus principales contaminantes?</i> .....	1
1.2. <i>¿Qué se entiende por radiación ultravioleta?</i> .....	4
1.2.1. <i>¿Qué factores afectan los niveles de radiación bajo el agua?</i> .....	7
1.2.2. <i>¿Qué efecto tendría la radiación ultravioleta en los organismos marinos?</i> .....	8
1.2.3. <i>¿Qué efecto tiene la RUV en los peces?</i> .....	10
1.3. <i>¿Qué es el estrés oxidativo?</i> .....	14
1.3.1. <i>¿Cuáles son las especies reactivas de oxígeno de interés biológico?</i> .....	16
1.3.2. <i>¿Cuales son los blancos principales de las Especies reactivas?</i> .....	17
1.3.3. <i>¿Cómo se protege el organismo del estrés oxidativo?</i> .....	20
1.4. <i>Potenciales implicancias de la RUV para la acuicultura y la pesca</i> .....	21
1.5. <i>Especie Biomonitora Girella laevifrons</i> .....	23
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>28</b>
4.1. <i>Obtención de las muestras.</i> .....	28
4.2. <i>Diseño experimental.</i> .....	29
4.3. <i>Medición de parámetros in-situ</i> .....	33
4.4. <i>Obtención de datos</i> .....	34
4.4.1. <i>Determinación del estrés oxidativo</i> .....	34
4.4.2. <i>Alimentación y condición</i> .....	39
4.5. <i>Análisis estadístico</i> .....	40

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1. <i>Espectros de absorción.....</i>	41
5.2. <i>Efecto de la RUV en la alimentación, medidas morfométricas, condición corporal y parámetros de estrés oxidativos.....</i>	42
5.2.1. <i>1 Hora de irradiación.....</i>	42
5.2.2. <i>2 Horas de irradiación.....</i>	44
5.2.3. <i>3 Horas de irradiación.....</i>	46
5.2.4. <i>4 Horas de irradiación.....</i>	48
5.2.5. <i>5 Horas de irradiación.....</i>	50
5.2.6. <i>Variación de Parámetros de estrés oxidativo durante el tiempo de experimentación..</i>	52
5.3. <i>Irradiación recibida por las pozas intermareales .....</i>	54
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>8. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>62</b>

## AGRADECIMIENTOS

Llegar al fin de este período tan importante en muchos sentidos en mi vida, se debe principalmente a un gran apoyo familiar, esencialmente de mi hermosa Mamá, por su gran apoyo y confianza ante cualquier decisión, por sus opiniones y por impulsar en mí un gran espíritu de superación, lo cual me ha servido mucho al momento de enfrentar la vida.

A Rodrigo por su incondicionalidad al compartir su vida conmigo, por su gran amistad y amor desde estos últimos años, a su familia que desde el primer día me ha entregado mucho apoyo y un gran cariño.

A mi profesora y amiga Dr. María Eliana Hidalgo, gracias por todo lo aprendido, por su paciencia junto con su gran disposición para ayudarme en mi trabajo, por sus consejos en todo aspecto y por su gran motivación a la hora de enseñar. A la profesora Georgina Sánchez por su colaboración con los instrumentos para realizar mi trabajo, ya que confió en mi responsabilidad a la hora de cuidarlos y por sus contribuciones en ideas y conocimiento para la elaboración de este trabajo.

Agradezco al Dr. Mauricio Landaeta, por la ayuda inmediata y el entusiasmo al momento de plantear mi tema de investigación, por su dedicación con los alumnos, su interés junto con su preocupación por mi trabajo. Gracias por llegar a la facultad. También al proyecto DID S-2009-38 “Metodologías de marcaje de estructuras duras de larvas y juveniles de robalo *Eleginops maclovinus* para reprobamiento e incremento de stocks”, cuya investigadora responsable Dra (c) Claudia A. Bustos, proporcionó la colaboración necesaria para equipar el laboratorio logrando así mantener en óptimas condiciones a juveniles de Baunco.

Y mis más profundos agradecimientos a todas las personas que me han acompañado todo este tiempo por mi paso en la universidad. A mis amigos y compañeros de tantas experiencias como: Cindy, Carolina, Wallace, Mariluz, Jorge, Brooks, Catalina, Marlenne, Cristian, Chuby, Jose... En fin... Los cuales con su amistad y cariño han contribuido a lograr finalizar esta etapa. Los quiero mucho

***LISTA DE TABLAS***

**Tabla 1.** Tiempo de irradiación y números de individuos para cada tratamiento de *G. laevifrons*.. **33**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotografía del Baunco <i>Girella laevisfrons</i> (Tschudi, 1845) .....	25
<b>Figura 2.</b> Mapa de las respectivas zonas de muestreo.....	28
<b>Figura 3. a)</b> Captura mediante red de mano, luego de la aplicación de Benzocaína, <b>b)</b> mantención de los individuos luego de la captura hasta su traslado al laboratorio.....	29
<b>Figura 4.</b> Estanque de aclimatación de 11 L de capacidad, con agua de mar filtrada (<1 µm). .....	30
<b>Figura 5. a, b)</b> Unidades experimentales irradiadas a una intensidad de 1 W/m <sup>2</sup> .....	31
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental para la mantención de juveniles de <i>G.laevisfrons</i> .....	31
<b>Figura 7. a,b).</b> Limpieza de cada unidad experimental. ....	32
<b>Figura 8 .a)</b> Medición in situ de la irradiación incidente en la poza, mediante un radiómetro. <b>b)</b> Medición de temperatura de la poza mediante un termómetro.....	34
<b>Figura 9. a)</b> Obtención de medidas morfométricas. <b>b)</b> Extracción de hígado y músculo de juveniles de baunco.....	35
<b>Figura 10.</b> Espectrogramas de absorción de radiación UV-B (290-320 nm). <b>a)</b> Agua de mar sin filtrar; <b>b)</b> Agua de mar filtrada. ....	41
<b>Figura 11.</b> Alimentación (g) Con una hora de irradiación diaria a una intensidad de 1 ( W/m <sup>2</sup> ). Respecto del tratamiento y los días de alimentación.....	43
<b>Figura 12.</b> Alimentación (g) con dos horas de irradiación diarias a una intensidad de 1 ( W/m <sup>2</sup> ). Respecto del tratamiento y los días de alimentación.....	45
<b>Figura 13.</b> Alimentación (g) con tres horas de irradiación diaria a una intensidad de 1 (W/m <sup>2</sup> ). Respecto del tratamiento y los días de alimentación.....	47
<b>Figura 14.</b> Alimentación (g) con cuatro horas de irradiación a una intensidad de 1 (W/m <sup>2</sup> ). Respecto del tratamiento y los días de alimentación.....	49
<b>Figura 15.</b> Alimentación (g) con cinco horas de irradiación a una intensidad de 1(W/m <sup>2</sup> ). Respecto del tratamiento y los días de alimentación.....	50
<b>Figura 16.</b> Parámetros de estrés oxidativos durante los cinco días de experimentación, con su respectivo tiempo de irradiación todos con una intensidad de 1(W/m <sup>2</sup> ). ....	53
<b>Figura 17.</b> Irradiación UV-A y UV-B incidente sobre pozas intermareales para los meses de Marzo, Mayo, Julio y Septiembre.....	54

## 1. RESUMEN

Los efectos en cuanto a las radiaciones UV-B y UV-A, son significativas sobre huevos de peces, sobrevivencia larval, talla de eclosión, daño al ADN, y niveles de estrés oxidativo. Los peces adultos podrían ser más resistentes al daño inducido por UV, comparado con juveniles o larvas, influyendo en esto las capacidades protectoras de pigmentos, capacidades de reparaciones moleculares y el espesor y naturaleza de la capa exterior del organismo, además de otras propiedades del medio. Por ello, los efectos de la radiación ultravioleta solar en los diversos seres vivos no es igual, y cada caso, tanto vegetal como animal, debe ser analizado en sus propio hábitat.

Se evaluó el efecto de la RUV sobre la especie *Girella laevifrons* (Baunco), caracterizado por su amplia representación en zonas intermareales y submareales someras de la costa centro norte de Chile, mediante parámetros de estrés oxidativo como: antioxidantes enzimáticos (Catalasa), no enzimáticos (TRAP), lipoperoxidación (T-BARS). Además de la variación de la alimentación por tratamiento. Se seleccionaron cinco tratamiento de irradiación (1, 2, 3, 4, 5 h) a una intensidad de  $1 \text{ W/m}^2$  durante 5 días, previo a una etapa de aclimatación. La alimentación fue con macerado de 0,75 g de chorito maico, *Perumytilus purpuratus*, fotoperiodo 12L:12O y temperatura del agua fue la ambiental (aproximadamente 17°C).

El quinto día de cada tiempo de exposición, se caracterizó por una disminución en la alimentación, lo que indicaría que este momento representa un tiempo crítico para

la sobrevivencia de los individuos. Sin embargo, se observó un aumento paulatino de la actividad antioxidante enzimática, no enzimática y la lipoperoxidación en juveniles irradiados en relación al aumento en los tiempos de exposición, manifestando que esta especie posee mecanismos de protección y reparación efectivos frente a la RUV.

La sobrevivencia de esta especie en este experimento fue del 100% de los individuos, junto con el resultado de mecanismos de reparación eficientes a corto plazo, pero hay que considerar que este experimento solo consideró 5 días de irradiación y 5 tiempos de exposición. Se sugiere que se debería estudiar posteriormente los efectos de la radiación a mediano y largo plazo.

**Palabras claves:** Radiación ultravioleta, mecanismos de protección, estrés oxidativo, *Girella laevifrons*.

## ABSTRACT

The effects of UV-B and UV-A, are significant on fish eggs, larval survival, length of hatching, DNA damage and oxidative stress. Adult fish may be more resistant to UV-induced damage, compared with juveniles or larvae, influencing this protective capabilities of pigments, molecular repair capacity and the thickness and nature of the outer layer of the body as well as other media properties. Therefore, the effects of solar ultraviolet radiation in the various living beings are not equal, and each case, both plant and animal, must be analyzed in its own habitat.

The effect of UVR on the species *Girella laevis* (Baunco), characterized by its wide representation in intertidal and shallow subtidal areas of the north central coast of Chile, through oxidative stress parameters such as antioxidant enzyme (catalase), non-enzymatic (TRAP), lipid peroxidation (T-BARS), as well as the variation of feeding treatment. We selected five treatments of radiation (1, 2, 3, 4 and 5 h) at an intensity of  $1 \text{ W/m}^2$  for 5 days prior to a period of acclimatization. The food was to macerate of 0.75 g *Perumytilus purpuratus*, photoperiod 12L: 12D and ambient water temperature (approximately  $17^\circ \text{C}$ ).

The fifth day of each exposure time, was characterized by a decrease in feeding, indicating that this time is a critical for survival of individuals. However, there was a gradual increase in the antioxidant enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation in irradiated juveniles in relation to increased exposure times, indicating

that this species has repair mechanisms and effective protection against UV.

The survival of this species in these experiments was 100% of individuals, with the result of efficient repair mechanisms in the short term, but consider that this experiment only considered 5 days of irradiation and 5 days of exposure. As further consideration should subsequently the effects of long-term UV radiation.

**Key words:** Ultraviolet radiation, protection mechanisms, oxidative stress, *Girella laevis*.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. *¿Qué es la atmósfera? ¿Cuáles son sus principales contaminantes?*

La atmósfera es un sistema complejo en constante interacción con el espacio exterior y con la superficie terrestre (Juárez, 1997), protege la vida de la radiación electromagnética de alta energía proveniente del sol. Tiene un espesor aproximadamente de 800 km, su temperatura varía con la altura, propiedad que permite diferenciar 5 capas, (Domínguez, 2004), las que tienen características relacionadas con la química de sus contaminantes. Estas capas son: Troposfera, Estratosfera, Mesosfera, Termosfera y Exosfera.

El hombre, mediante la realización de sus actividades económicas, emite continuamente hacia la atmósfera gases y partículas sólidas susceptibles de modificar su composición. Hasta el siglo XIX, con el desarrollo de la Revolución Industrial, estas emisiones presentaban unas tasas suficientemente reducidas como para ser amortiguadas y neutralizadas por el sistema (Cuadrat & Pita, 1997). Actualmente el uso de combustibles, fósiles como fuente de energía, constituye el principal medio por el cual el hombre contamina la atmósfera. Estos productos son casi todos hidrocarburos o materiales carbónicos y su óptimo exige la oxidación completa en el proceso de combustión (Bomboí, 2004).

Según Monks *et al.*(2009), la contaminación puede ser definida como: “Gases o partículas de aerosol emitidas por factores antropogénicos, que se acumulan en concentraciones suficientes como para causar daño directa o indirectamente sobre plantas,

animales, ecosistemas y estructuras arquitectónicas”. (Speeding, 2001; Ros, 1993; Lars, 2007; Monks *et al.*, 2009), señalan que la composición cualitativa y cuantitativa de la atmósfera terrestre ha sufrido cambios significativos, debido al aumento en la concentración de los gases de efecto invernadero, donde los principales son el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), el metano ( $\text{CH}_4$ ), el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), los Halocarbonos: Clorofluorocarbonos (CFCs), Bromofluorocarbonos, Clorocarbonos; y el vapor de agua, de los cuales los que realizan una mayor contribución al efecto invernadero son, el vapor de agua y el  $\text{CO}_2$ .

Las características de estos gases para generar este efecto invernadero, es que son semitransparentes a la radiación solar y al contrario absorben la radiación de onda larga emitida por la superficie y la reemiten hacia el espacio y hacia la superficie terrestre produciendo un calentamiento adicional, manteniéndose el equilibrio con la radiación solar incidente, como consecuencia la nueva temperatura superficial es sustancialmente más elevada que la temperatura de radiación efectiva (Ros, 1993). Los halocarbonos por otra parte, tienen la capacidad de reaccionar con el ozono en la estratósfera, contribuyendo a su destrucción. Esto ocurre cuando son liberados, ascienden hacia la atmósfera y se descomponen por acción de la luz solar, liberando átomos de cloro que reaccionan fuertemente con las moléculas de ozono (Dahms & Lee, 2010); el monóxido de cloro resultante puede, a su vez, reaccionar con un átomo de oxígeno, liberando otro átomo de cloro que puede iniciar de nuevo el ciclo (Juárez, 1997). Otros productos químicos, como los halocarbonos de bromo, y los óxidos de nitrógeno de los fertilizantes, también son nocivos para la capa de ozono.

Ros (1993) describe una zona de la atmósfera que comprende entre 20 y 40 km por encima de la superficie de la Tierra, en la cual se concentra casi todo el ozono atmosférico y es donde se producen concentraciones de ozono de hasta 10 partes por millón (ppm). El ozono se puede producir y destruir en la atmósfera; y su distribución vertical es de gran importancia para determinar sus efectos térmicos y químicos (Lars, 2007). Las moléculas de ozono tienen la capacidad de absorber radiación infrarroja y por lo tanto participar en el efecto invernadero, pero también absorben en las bandas del ultravioleta y del visible con lo que es doblemente activo en el balance energético general. El ozono es el único componente de la atmósfera que absorbe la radiación UV-B. Las observaciones de ozono estratosférico indican una disminución en los últimos años, esta tasa de decrecimiento es coherente con los cambios previstos debido a la presencia de los CFCs (Monks *et al.*, 2009).

La disminución de ozono ha provocado durante las últimas décadas un significativo aumento de la radiación ultravioleta B (UV-B) a nivel de la troposfera (Pinto *et al.*, 2000). Brown *et al.* (2004), señalan que la sensibilidad a la radiación ultravioleta varía enormemente entre los organismos y que hay varios tipos de moléculas en los que se puede generar daño. La absorción de esta radiación ultravioleta puede alterar la distribución de los electrones de las moléculas rompiendo los enlaces químicos entre sus átomos o arrancando un electrón de (Brown *et al.*, 2004).

## 1.2. *¿Qué se entiende por radiación ultravioleta?*

Se define como luz visible al intervalo de radiaciones electromagnéticas que van desde los 400 a 700 nm. Los que se encuentran fuera de este intervalo corresponden a radiación infrarroja (>700 nm) o radiación ultravioleta (<400 nm) (Cabrera *et al.*, 2005).

La radiación ultravioleta (RUV) se puede dividir en tres intervalos, de acuerdo al efecto que esta radiación produce desde un punto de vista biológico (Cabrera *et al.*, 2005).

- ✓ **Radiación UV-A (400-320 nm):** Corresponde a la que continuamente está cayendo sobre la superficie de nuestro planeta (Morales, 1992), con acción eritomatogénica y melanogénica, está asociada a las reacciones de fotosensibilidad, ya que penetra considerablemente la epidermis alcanzando 20% en la dermis (Moan, 1994). En aguas claras oceánicas puede penetrar entre los 40-60 metros de profundidad (Dahms & Lee, 2010). Produce un efecto nocivo en el proceso fotosintético. Sin embargo, se han observado beneficios de esta banda en la fisiología del alga, induciendo procesos fotobiológicos como la actividad fotoliasa para reparar el daño en el ADN o estimulando la actividad nitrato reductasa (Korbee *et al.*, 2006).
  
- ✓ **Radiación UV-B (320-280 nm):** Dependiente de la cantidad de ozono atmosférico existente (Morales, 1992), es responsable de las quemaduras solares y del eritema. El eritema es el primer reporte de alerta de la piel a una exagerada exposición, el pick máximo del eritema se alcanza a una longitud de onda de 307 nm. Esta radiación causa además pigmentación,

como una respuesta adaptativa de la piel a la exposición a la radiación generando pigmentos de melanina, protegiendo la piel de un posterior daño inducido por la UV-B (Fuenzalida, 1999). En aguas claras oceánicas puede penetrar entre los 20-30 metros de profundidad (Dahms & Lee, 2010). A escalas mayores de intensidad se pueden configurar cambios en la estructura de las comunidades de macroalgas en los sistemas acuáticos (Korbee *et al.*, 2006).

- ✓ **Radiación UV-C (200-280 nm):** Ampliamente retenida sobre la Tropósfera (Morales, 1992), prácticamente no alcanza la superficie terrestre, por lo tanto no es de importancia biológica.

La RUV es un factor natural de gran importancia debido a que modula el clima terrestre, teniendo una influencia significativa en el medio. La región ultravioleta (UV) del espectro solar juega un papel determinante en diversos procesos en la biosfera (Vallejos, 2003), varía estacionalmente, dependiendo de la variación del ángulo cenital del sol (cambia diariamente), de la variación del grosor de la cubierta de ozono y la cantidad de partículas de la atmósfera (Cabrera & López, 2005).

Bullock & Coutts desde 1985 insisten que la RUV debe ser reconocida como un factor de estrés ambiental en igualdad de importancia que la calidad del agua, El impulso dado por el descubrimiento del agujero de ozono ha permitido el desarrollo de nuevos instrumentos y técnicas que resultaron útiles para demostrar que son biológicamente significativos los niveles de RUV, la cual puede penetrar hasta decenas de metros, tanto en los lagos de agua dulce y en los sistemas marinos (Zagarese, 2001).

Estimaciones realizadas indican que una disminución del 1% en la concentración total de ozono, provoca un aumento promedio del 2% en la radiación UV-B incidente en la superficie terrestre. Este valor aunque pequeño respecto de la proporción de otras longitudes de ondas, podría no tener efecto en organismos de latitudes bajas o de grandes altitudes normalmente adaptados a altas intensidades de UV-B. Sin embargo, en organismos adaptados a intensidades moderadas o bajas, es posible que el efecto sea importante principalmente por la acción de esta radiación sobre los ácidos nucleicos, pigmentos y otras biomoléculas (Pinto *et al.*, 2000). El aumento de la RUV según Dahms & Lee (2010), podría alterar composición de comunidades, distribución de tamaños y disminuir la productividad de ensambles de organismos marinos.

A nivel mundial la necesidad de llegar al público con información fácilmente comprensible sobre la radiación UV y sus posibles efectos negativos ha llevado a los científicos a definir un parámetro que pueda ser usado como indicativo de las exposiciones UV. Este parámetro es el denominado Índice Ultravioleta o Índice UV (UVI) (Vallejos, 2003). Este índice, se define como la potencia de la energía solar UV por unidad de superficie (UV), se mide en ( $\text{w/m}^2$ ) que se recibe en un punto determinado de la Tierra (Rivas *et al.*, 2008). En Chile el Instituto Nacional de Meteorología (INM), realiza predicciones del UVI casi para todo el territorio nacional desde junio de 2001. También la CONAC en conjunto con la USACH, realizan mediciones del Índice UVI en algunas localidades del país al igual que la UTFSM para el caso de Valparaíso, donde se realizan mediciones y predicciones del UVI desde febrero del 2000.

### 1.2.1. ¿Qué factores afectan los niveles de radiación bajo el agua?

Los efectos de la RUV incidente serán muy diferentes dependiendo de cómo sea transmitida en la columna de agua. Esta transmisión está estrechamente relacionada con la concentración y propiedades ópticas de la materia orgánica disuelta (MOD) del ecosistema acuático. Generalmente la concentración de MOD se cuantifica analizando su contenido en carbono orgánico disuelto (COD). Los coeficientes de atenuación ( $K_d$ ) de las longitudes de ondas comprendidas en la banda UV dependen significativamente de la concentración de COD (Reche, 2003).

La atenuación de la radiación ultravioleta en ecosistemas acuáticos según Maloney *et al.* (2005), se representa como:  $\alpha(\lambda)$ , expresándose como:

$$\alpha(\lambda) = \alpha_{\text{fito}}(\lambda) + \alpha_{\text{CMOD}}(\lambda) + \alpha_{\text{det}}(\lambda) + \alpha_{\text{w}}(\lambda)$$

#### Donde:

- ✓  $\alpha_{\text{fito}}(\lambda)$  = Absorción por el fitoplancton.
- ✓  $\alpha_{\text{CMOD}}(\lambda)$  = Cromóforos de la materia orgánica disuelta, los cuales determinan las propiedades ópticas (Fotoreactividad y absorción).
- ✓  $\alpha_{\text{det}}(\lambda)$  = Detritus.
- ✓  $\alpha_{\text{w}}(\lambda)$  = Agua

La materia orgánica disuelta según Zagarese (2001), es el mayor controlador de la RUV en aguas naturales, así mismo, el carbono orgánico disuelto en concentraciones superiores a 1-2 gm<sup>3</sup> restringido a unos pocos centímetros de la superficie también limitaría

la RUV. Así, en la ausencia de una fuerte mezcla turbulenta, la mayoría de los peces podría fácilmente evitar la exposición de RUV a niveles perjudiciales, permaneciendo sólo unas pocas decenas de centímetros debajo de la superficie. Sin embargo, en concentraciones bajas de MOD, la RUV puede penetrar varios metros en el agua. Por otra parte, como la relación entre la penetración de la UV y el carbono orgánico disuelto es tan fuerte, grandes disminuciones en el COD se traducen en enormes aumentos de la RUV (Formicki *et al.*, 2009).

### ***1.2.2. ¿Qué efecto tendría la radiación ultravioleta en los organismos marinos?***

La radiación ultravioleta (UV) tiene varias propiedades que la convierten en un potente factor de estrés ambiental para los organismos que están expuestos a ella (Dahms & Lee 2010), provocando efectos perjudiciales en estos. Lars (1997) señala que en variados experimentos han revelado que la sensibilidad a los rayos ultravioleta varía enormemente entre los organismos, y que hay varios tipos de moléculas en los que se puede generar daño.

La transmisión de la RUV y sus efectos sobre la biota son muy variables en los cuerpos de agua. En los sistemas donde la penetración de la RUV se ve restringida a unos pocos centímetros de la columna de agua, la biota no ha necesitado desarrollar mecanismos de reparación o protección frente al daño, especialmente en el ADN (Reche, 2003). En estos sistemas el medio acuoso *per se* es un filtro protector para los organismos. Son sistemas considerados robustos frente a la RUV, aunque su biota es potencialmente vulnerable al no haber desarrollado mecanismos protectores o reparadores frente a ella

(Maloney *et al.*, 2005). Según Korbee *et al.* (2006) la sensibilidad frente a la radiación UV-B varía según las especies y según los estadios de vida afectados.

Las diferencias entre los organismos en su capacidad para hacer frente a la radiación ultravioleta se deben tanto a: (1) diferentes habilidades para protegerse y (2) capacidades de reparar el daño (Lars, 2007). Stephan *et al.* (2001) y Cooke *et al.* (2003) mencionan que en aguas transparentes, por ejemplo de lagos, las migraciones diarias verticales de zooplancton se producen a tal profundidad por la RUV que se podría comprometer la fisiología de los organismos, afectando óptimos de temperatura metabólicos y alterando reparaciones fotoenzimáticas. En cuanto a capacidades de protección Korbee *et al.* (2006) mencionan que pueden ser: la fotoreactivación de ADN (mediada por radiación PAR y UV-A), la reparación de la escisión nucleotídica, la recombinación del ADN, la acumulación de antioxidantes lipo- e hidrosolubles y la actividad de enzimas antioxidantes. Los tipos más frecuentes de daño en el ADN son la formación de dímeros de ciclobutanospirimidinas y de fotoproductos. En la mayoría de los organismos este tipo de daño puede ser reparado rápidamente por las enzimas llamadas fotoliasas. Prácticamente todos los organismos tienen alguna capacidad para reparar los daños. Por lo general, los organismos que viven en hábitats más expuestos tienen una mejor capacidad de reparación respecto de los que viven en hábitats más protegidos (Lars, 2007).

El tipo más importante de protección frente a la radiación ultravioleta, son sustancias absorbentes y su depositación cerca de la superficie corporal, por lo que la penetración de la radiación a capas inferiores (o al núcleo de la célula en los organismos unicelulares) se previene o se ve disminuido. Diferentes organismos producen diferentes tipos de protectores frente a la radiación ultravioleta (Lars, 2007). Estas sustancias son

derivados imino-carbonil del cromóforo de ciclohexenona de las micosporinas, y se denominan aminoácidos tipo micosporina (MAAs). Tanto las micosporinas como los MAAs tienen conjugado en el anillo sustituyentes nitrogenados (amino), aminoácidos o sus amino-alcoholes correspondientes: la glicina es el aminoácido más común presente en los MAAs (Kobee *et al.*, 2006). En organismos marinos hay descritos 23 MAAs, los que son producidos por muchas algas y también por algunas cianobacterias. De ellos los MMAAs se transfieren a los animales a través de la trama trófica y son utilizados por ellos para la protección UV (Lars, 2007).

### ***1.2.3. ¿Qué efecto tiene la RUV en los peces?***

En ambientes naturales, la concentración de la materia orgánica disuelta (MOD) y la profundidad del hábitat son los dos factores principales que controlan el grado de exposición a la RUV experimentada por los peces. Otros factores incluyen la cobertura de la vegetación, la características de las partículas en suspensión, pH y características hidrológicas, y la ubicación del sitio (latitud, altitud) (Zagarese, 2001).

Quemaduras en peces se informan desde 1930. Son lesiones dérmicas con necrosis o erosiones caracterizadas por coloraciones blancas o grises, especialmente detrás de la cabeza y la aleta dorsal (Zagarese, 2001). Así los organismos de los arrecifes de coral que se encuentran en la capa superficial en un día de verano normal, pueden experimentar más de 30 veces la dosis mínima de eritema que en el humano puede causar quemaduras de sol (Zamzow, 2004). Los efectos de daños biológicos de radiación ultravioleta sobre organismos marinos, puede ocurrir incluso a decenas de metros de profundidad (Zamzow, 2004). Estos efectos pueden ocurrir a niveles moleculares, de órganos, tejidos, celulares y

gametos, conduciendo a una mayor mortalidad, de gametos, embriones y larvas de peces (Dahms & Lee, 2010).

Un obstáculo adicional para analizar el efecto de la radiación ultravioleta en las poblaciones de peces, es que los efectos UV son fácilmente confundidos por otros agentes etiológicos. Por ejemplo: la depresión del sistema inmunológico puede ser causada por una variedad de factores, el síndrome de estrés producido por la RUV es similar al provocado por manipulación, las lesiones cutáneas son rápidamente colonizados por bacterias u hongos, por lo que la identificación del daño inicial es difícil y las malformaciones embrionarias son similares a los causados por una variedad de sustancias tóxicas (Zamzow, 2006). Zagarese (2001) señala que en el salmón del Atlántico en Irlanda, ocurren lesiones cutáneas, principalmente en épocas de verano, observándose erosiones en la piel y variaciones en la producción de mucus. Estos síntomas pueden ser confundidos con otras patologías, como infecciones por ectoparásitos o saprolegniasis. Esta pérdida de epidermis permite la entrada de patógenos y provoca perturbaciones osmóticas.

Otro tipo de lesión de la piel de los peces es causada por la exposición a la radiación UV si los peces han estado en contacto o han ingerido una sustancia fotoactiva, proceso denominado fotosensibilización, una condición en la cual las células que normalmente absorben poca RUV son inducidas a una mayor absorción de RUV por un compuesto fototóxico (O'Reilly & Mothersill, 1997). Un gran número de sustancias comunes pueden producir fotosensibilización. Algunas de éstas pueden llegar a los ambientes naturales como resultado de la contaminación antropogénica, mientras que otros se utilizan habitualmente en las pisciculturas donde los operarios no conocen su potencial para actuar como fotosensibilizadores (Zagarese, 2001).

Algunos de los tipos de daños se pueden clasificar en:

- ✓ **Daño a Gametos (espermios y ovocitos):** Los espermatozoides de los organismos marinos son más susceptibles que embriones, huevos y larvas a la RUV. Los espermatozoides no poseen MAAs y por su poco volumen citoplasmático poseen pocos antioxidantes (Zamzow, 2004). Además tienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas celulares volviéndolos susceptible a la lipoperoxidación. Esta vulnerabilidad podría ser la causa de porqué los animales de arrecife se reproducen de noche (Dahms & Lee, 2010).
- ✓ **Daño a embriones:** La RUV puede reducir la tasa de eclosión en peces y causar retraso en el desarrollo de larvas. Se estima que el 50% de los huevos de bacalao del Atlántico ubicadas en la superficie del océano (0-10 cm) va a morir después de 42 h de exposición en las condiciones actuales de la capa de ozono, y este tiempo se reducirá a 32 h si se produce una disminución mayor del 20% en el espesor de esta capa (Dahms & Lee, 2010). También se ha demostrado que se pueden generar malformaciones en el mesénquima de la blástula de erizo, un retraso o inhibición de la gastrulación y lo más grave afectar la esqueletogénesis como el desarrollo de espinas (Zagarese, 2001).
- ✓ **Visión:** El sistema visual de los peces puede ser protegido por pigmentos en la córnea, control de la pupilas y la acumulación de compuestos de bloqueo de la RUV en la córnea, los cuales ayudan a filtrar la energía de onda corta (Dahms & Lee, 2010). Los daños en la córnea pueden ser causados por múltiples mecanismos oxidativos, debido a que la RUV disminuye la capacidad de la córnea para desintoxicar  $H_2O_2$  por la reducción de la actividad de la catalasa en células epiteliales del cristalino. Las cataratas, que afectan a la opacidad de la lente del ojo, se cree que resulta de la presencia de peróxidos (Zagarese, 2001).

- ✓ **Daño al ADN:** Si la cromatina nuclear si se ve afectada puede ser muy perjudicial, ya que controla el desarrollo ontogénico y el daño puede ser transmitido a la siguiente generación. Cuando el ADN es dañado por RUV se producen dímeros cuclobutanopiridina (DCP) (Dahms & Lee, 2010). Experimentos en la Antártida mostraron que la formación de DCP en embriones de peces como *Chaenocephalus aceratus* fue significativamente correlacionado con la dosis diaria acumulada de los rayos UVB. La magnitud de los daños está directamente relacionada con la dosis de UV-B acumulada en el tiempo (O'Reilly & Mothersill, 1997). La exposición a la RUV creciente asociadas a los rayos UV-B y UV-A, presenta mayores tasas en los embriones de las regiones polares que de las regiones templadas. La mayor sensibilidad de los embriones de erizo de mar Antártico a los rayos UV se correlaciona con sus metabolismo lento, baja concentración sustancias protectoras solares, y la baja tasa de reparación del ADN en comparación con especies de zonas templadas y tropicales (Zamzow, 2006).

Varios autores señalan que la RUV se encuentra asociada a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), como oxígeno singlete, radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo actuando en forma sinérgica para generar por ejemplo daños en el ADN. (Zamzow, 2004). También la exposición de las aguas naturales a la RUV en presencia de MOD puede generar peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas del oxígeno (ROS).

La RUV y el estrés oxidativo tienen efectos independientes, pero interactúan sobre los organismos marinos. Dahms & Lee. (2010) señalan que tanto la radiación UV-A y UV-B causan una alta producción de ROS que posteriormente conducen a la peroxidación de lípidos en el esperma de erizo de mar, lo que resulta en una

disminución del potencial de membrana y, por lo tanto, una reducción de la motilidad de los espermatozoides y la capacidad de fertilización. La RUV puede dañar directamente las moléculas de ADN y proteínas reduciendo así la calidad del esperma. La lipoperoxidación causado por ROS podría resultar en la pérdida de la fluidez y la integridad de las membranas de los espermatozoides (Zagarese, 2001), lo que en última instancia, interfiere con el proceso de fusión durante la fecundación, como también se ha demostrado en los espermatozoides de mamíferos.

Una de las adaptaciones de los peces antárticos al permanente frío, es tener un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en la membrana plasmática, lo que asegura la fluidez de membrana a bajas temperaturas. Sin embargo, un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados puede generar en los peces antárticos un riesgo elevado de estrés oxidativo inducido por RUV, debido a que las PUFAs son el blanco principal de ROS (Dahms & Lee, 2010).

### **1.3. ¿Qué es el estrés oxidativo?**

Se denomina estrés oxidativo a aquella situación en la que las células están expuestas a un ambiente prooxidante y los mecanismos defensivos antioxidantes son sobrepasados de forma que se llega a afectar el estado redox celular. En los sistemas biológicos los elementos prooxidantes provienen en su mayoría del  $O_2$ , por lo que son denominados genéricamente ERO (especies reactivas de oxígeno) (Martínez, 2005; Kowaltowski *et al.*, 2009). Dentro del concepto de ERO se incluyen a los radicales libres (RL) de  $O_2$  y a otros compuestos de  $O_2$  que, si bien no pueden clasificarse químicamente

como RL, sí son altamente prooxidantes y capaces de generar RL durante su metabolismo (Kowaltowski *et al.*, 2009).

Un RL se puede definir como aquella especie química que posee un electrón ( $e^-$ ) desapareado. Esta situación le confiere una alta capacidad de reacción, prácticamente con cualquier molécula, lo que también condiciona su corta existencia (Yu, 1994). Los RL se pueden formar a partir de átomos o moléculas por 3 vías: 1) por la ruptura homolítica del enlace covalente de una molécula, con la retención de un electrón del par de electrones compartidos por cada fragmento; 2) por la pérdida de un  $e^-$ ; y 3) por la adición de un  $e^-$  (Martínez, 2005). La presencia de radicales libres en materiales biológicos fue descubierto hace menos de 50 años atrás (Drogue, 2001).

En los tejidos sanos, la principal fuente de radicales libres son las mitocondrias. Esto se debe a que estos orgánulos son los responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular. De los cuatro complejos responsables del transporte electrónico en la cadena respiratoria, se ha observado producción de radicales libres en mitocondrias aisladas en el Complejo I y en el complejo III (Barja, 1997; Kowaltowski *et al.*, 2009). En el caso del complejo I, los candidatos más probables como generadores de radicales libres parecen ser los centros hierro-sulfurados, mientras que en el caso del complejo III se ha debatido intensamente sobre si podría corresponder a la semiquinona o al citocromo b (Barja, 1997). La segunda fuente principal de radicales libres son los fagocitos del sistema inmune. Al encontrarse con un agente infeccioso, las células polimorfonucleares y los macrófagos experimentan un aumento muy acusado de su consumo de oxígeno, llamado “estallido respiratorio”. Dicho consumo ocurre

principalmente en la membrana plasmática donde un complejo enzimático, la NADPH oxidasa, se activa y produce radicales de oxígeno a partir de oxígeno basal y electrones derivados de la vía de las pentosas (Barja, 1997).

### ***1.3.1. ¿Cuáles son las especies reactivas de oxígeno de interés biológico?***

La primera especie reactiva de oxígeno generada en los sistemas biológicos es el anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), un radical libre formado por la reducción directa e incompleta del oxígeno, por un único electrón. El  $O_2^{\cdot-}$  tiene una vida media corta y es poco reactivo. Su inestabilidad se debe a que la reacción de dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es muy favorable. Esta dismutación puede ser espontánea o catalizada por el enzima superóxidodismutasa (Yu, 1994). Aunque la mayoría del peróxido de hidrógeno producido en células eucariotas proviene de la reacción de dismutación, éste también puede formarse a partir de la reducción directa del oxígeno con dos electrones, un mecanismo de reacción compartido por muchas oxidasas de flavoproteínas (Camaro, 2005).

Al contrario del  $O_2^{\cdot-}$ , el  $H_2O_2$  no es un radical libre, es una molécula mucho más estable. Así como las membranas biológicas resultan impermeables al  $O_2^{\cdot-}$ , el  $H_2O_2$  puede difundir a través de ellas, a pesar de que el  $H_2O_2$  es un agente con una capacidad oxidativa mucho menor que el  $O_2^{\cdot-}$ , en presencia de metales de transición puede dar lugar al radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) a través de la reacción de Fenton (Yu, 1994):



El radical hidroxilo es una molécula extremadamente reactiva y tóxica. Puede reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados produciendo los radicales alcoxil ( $RO^{\cdot}$ ) y peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ).

También existen las especies reactivas del nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^\cdot$ ) y el altamente reactivo peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ), constituyen otra familia de moléculas reactivas en los sistemas biológicos. Dentro de esta familia también se encuentran algunos radicales libres (Camaro, 2005).

La elevada reactividad y la relativa inestabilidad de los ROS y RNS, complica mucho su detección en los sistemas biológicos. Así, las determinaciones de la producción de estas moléculas se realizan a menudo de forma indirecta, valorando la generación de productos finales de la reacción de los ROS/RNS con componentes celulares, como los lípidos, proteínas o DNA (Camaro, 2005).

Los radicales libres generados por una reducción parcial de  $\text{O}_2$  representan un serio peligro para los tejidos y órganos vitales, especialmente los lípidos de la membrana, proteínas, tejido conectivo y para los ácidos nucleicos de las células. La toxicidad del oxígeno es amplificada bajo una variedad de condiciones: activación de neutrófilos, hiperoxia, activación redox de xenobióticos, exposición a radiación e isquemia reperfusión (Harris 1992).

### ***1.3.2. ¿Cuales son los blancos principales de las especies reactivas?***

Las alteraciones funcionales, mediadas por ERO, son una consecuencia directa de sus interacciones con macromoléculas esenciales. Las moléculas “blanco” del ataque de las ERO de mayor importancia son: ADN, proteínas y lípidos (Valenzuela & Videla, 1983).

- ✓ **ADN**: Los daños fundamentales son la hidroxilación de las bases de ADN, entrecruzamientos, escisión de hebras e inhibición de la síntesis de proteínas, nucleótidos y

ácidos grasos y estos daños son causados por OH<sup>·</sup> y oxígeno singlete (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) (Kowaltowski *et al.*, 2009); este último ataca fundamentalmente a la guanina. Los daños que se originan sobre el ADN pueden estar relacionados con alteraciones estructurales directas o causadas por la inactivación de las enzimas encargadas del reconocimiento de anomalías en el ADN (Camaro, 2005).

El daño al ADN in vivo puede generar (Fernández *et al.*, 2005):

1. Alteraciones estructurales del ADN (mutaciones, pérdida de bases, e inserción de bases.
2. Pérdida de la expresión o síntesis de una proteína por daño al gen específico o producir una proteína aberrada.
3. Contribuir al desarrollo de cáncer.

✓ **Proteínas:** Los radicales de oxígeno y muchos EROS pueden causar modificaciones en las proteínas. Las proteínas pueden variar fuertemente su susceptibilidad frente al daño oxidativo. Estas modificaciones oxidativas pueden conducir a cambios funcionales, una fragmentación química o una mayor susceptibilidad al ataque proteolítico (Droge, 2001). Muchas ERO son capaces de oxidar los grupos sulfidrílos (-SH) de las proteínas. Los aminoácidos más sensibles son el triptófano, tirosina, fenilalanina, metionina y cisteína (Martínez, 2005). Producto del ataque de las ERO se producen entrecruzamientos de cadenas polipeptídicas y fragmentación de las proteínas que conducen a la pérdida de su función biológica. Las consecuencias bioquímicas de las oxidaciones de las proteínas pueden ser (Fernández *et al.*, 2005):

1. Pérdida de la función de receptores, enzimas, proteínas de transporte.
2. Alteración de la función de las enzimas reparadoras del ADN.

3. Pérdida de la fidelidad de las ADN polimerasas para replicar el ADN.
4. Aumento o disminución a la susceptibilidad a la proteólisis.
5. Aumento de la inmunogenicidad (generación de nuevos antígenos que generan respuesta inmunitaria).
6. Agregaciones proteicas ( p.e.  $\alpha$ -sinucleína,  $\beta$ -amiloide).
7. Modificación de la transcripción génica.

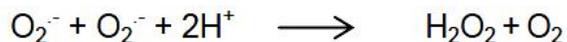
✓ **Lípidos (Peroxidación lipídica):** De todas las macromoléculas presentes en los tejidos animales, los ácidos grasos poliinsaturados y los fosfolípidos de membrana son los más sensibles al ataque por radicales libres debido a la posesión de dobles enlaces (Barja, 1997). En las membranas celulares cuando ocurre la lipoperoxidación se genera un aumento considerable de la permeabilidad, originando alteraciones irreversibles de las propiedades funcionales de la célula que pueden conducir a su lisis total (Yu, 1994). Los procesos de lipoperoxidación conducen a la formación de numerosos derivados tóxicos: los hidroperóxidos, los 4 hidroxialquenes, el malonaldehído y otros. Las consecuencias de la lipoperoxidación según Fernández *et al.*, (2005) pueden ser:

1. Disminuir la fluidez de las membranas biológicas
2. Inactivar enzimas y receptores asociados a la membrana celular.
3. Aumentar la permeabilidad del  $\text{Ca}^{2+}$ .

### *1.3.3. ¿Cómo se protege el organismo del estrés oxidativo?*

En la célula existen diferentes sistemas que contrarrestan la generación de ROS, ya sean los constituidos por moléculas capaces de eliminar directamente los ROS, como los basados en sistemas enzimáticos que actúan en cascada para eliminar rápidamente el  $O_2^-$  y sus metabolitos (Camaro, 2005). Los sistemas antioxidantes; según Yu (1994), se encuentran estratégicamente ubicados en organelos subcelulares para proporcionar la máxima protección y una interacción mas adecuada con el compartimento extracelular. Estas defensas han sido tradicionalmente denominadas: defensas no enzimáticas y defensas enzimáticas. Según Harris (1992) las defensas no enzimáticas, son todas aquellas fuentes de antioxidantes ingresadas al organismo por vía exógena, como la vitamina C, vitamina E, betacarotenos, flavonoides, etc., mientras que las defensas enzimáticas son aquellas propias del organismo como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa entre otras.

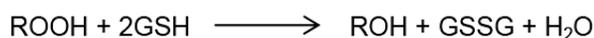
Existen cuatro formas de la superóxido dismutasa, Mn-SOD ( $SOD_2$ ), Cu,Zn-SOD ( $SOD_1$ ), Ni-SOD, y la SOD extracelular. Todas las superóxido dismutasas catalizan la reacción de conversión del  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  (Harris, 1992):



La  $SOD_1$  se localiza en el citoplasma celular, mientras que la  $SOD_2$  se encuentra en la matriz mitocondrial. La catalasa, que se localiza en el peroxisoma, es una de las enzimas conocidas más eficientes ya que no se satura a ninguna concentración de  $H_2O_2$ , y cataliza la reacción de conversión del peróxido de hidrógeno a agua (Harris, 1992):



El sistema GSH(glutati3n reducido) es probablemente el mecanismo de defensa celular m1s importante. El trip3ptido GSH ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), no solamente act1a como un *scavenger* de ROS, sino que regula el estado redox intracelular (Camaro, 2005). El sistema consiste en el GSH, la glutati3n peroxidasa y la glutati3n reductasa. La glutati3n peroxidasa cataliza la reducci3n del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros per3xidos convirtiendo el GSH a su forma oxidada (GSSG) (Harris, 1992):



#### ***1.4. Potenciales implicancias de la RUV para la acuicultura y la pesca***

En un estudio realizado por Zagarese. (2001), se menciona que varios autores han se1alado, desde el a1o 1970 que se recomienda cubrir los estanques de cultivo, debido a que la supervivencia de juveniles ha sido mayor en tratamientos cubiertos que los no cubiertos, debido al efecto de la RUV. Zamzow. (2004) se1ala que en los cultivos las erosiones en la piel la mayor1a de las veces se relaciona con pat3genos, virus, etc, pero no se atribuye que podr1a deberse por ejemplo a la fotosensibilizaci3n por medicamentos. Es por esto que el enriquecimiento de la dieta con antibi3ticos sustancias antioxidantes merece una mayor consideraci3n.

Dahms & Lee. (2010) mencionan que el fitoplancton y el zooplancton son altamente vulnerables a los cambios de radiaci3n ultravioleta y como los peces son a menudo el siguiente paso en la trama tr3fica, adem1s de los efectos directos de la RUV, ellos se ver1an afectados indirectamente al alimentarse de estos organismos afectados. Estos

efectos indirectos es probable que sean particularmente claves en el crecimiento y la supervivencia de las primeras etapas del ciclo vital de los peces, ya que son muy vulnerables a la inanición y a los efectos de la RUV.

Con los antecedentes mencionados anteriormente esta investigación pretende determinar, si el aumento en el tiempo de exposición a la radiación ultravioleta sobre los organismos marinos, en este caso en particular un organismo que habita las pozas del intermareal, generaría estrés oxidativo, de ser así se hace imprescindible investigar y comprender su efecto, y cómo estos organismos se protegen en su propio hábitat de la radiación que incide sobre ellos, identificando nuevas problemáticas ambientales relacionadas con el daño producido por la radiación UV.

Para evaluar los parámetros de estrés oxidativo generado por la radiación UV en peces, se seleccionó a la especie *Girella laevis* porque: (1) habita en las pozas o piletas litorales por lo que es relativamente fácil de capturar y disponer continuamente, (2) su número en dichas pozas es bastante apreciable, por ejemplo 20 individuos por sector (3) en condiciones de laboratorio es fácil de alimentar y mantener; y (4) las pozas intermareales donde se encuentra en su etapa juvenil es un ambiente extremo, con elevados niveles de RUV y grandes fluctuaciones en parámetros físico-químicos

### 1.5. Especie Biomonitora *Girella laevifrons*

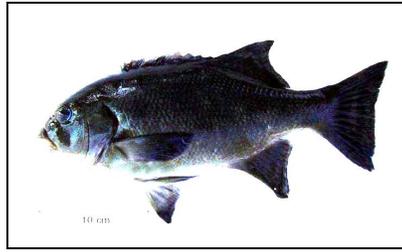
El baunco *Girella laevifrons*, es un pez de amplia representación en zonas intermareales y submareales someras de la costa centro norte de Chile (Fariña *et al.*, 2000). Su variabilidad termal geográfica amplia en las pozas intermareales son condiciones que la convierten en un modelo ideal de estudio (Pulgar *et al.*, 2006), debido a que los peces son particularmente vulnerables a la variabilidad climática porque sus procesos fisiológicos están directamente afectados por la temperatura del agua de su hábitat. A pesar de esto, los peces exhiben compensaciones fisiológicas y de comportamiento a las diferentes condiciones del medio (Pulgar *et al.*, 2003).

Existen ciertos hábitats muy especiales como grietas, cavernas y pozas de la zona intermareal de la costa, que por la renovación de agua, humedad que presentan o la iluminación y biota que sustentan, son ambientes ecológicos singularmente importantes (Alveal, 1970). En el intermareal existen especies denominadas como transitorias que lo habitan sólo durante sus estadios juveniles o estados de desarrollo temprano, hasta completar su ciclo de vida en hábitat submareales; estas también ocupan las pozas de rocas más distantes a la zona submareal que las residentes, por lo tanto pueden estar expuestas a mayor variabilidad en las condiciones físicas del hábitat, como también a la abundancia y calidad del alimento disponible (Pulgar *et al.*, 2003).

En las pozas intermareales de la zona de Montemar (32°57'22,34'' S; 71°33'01,13''O), durante verano se produce una casi nula renovación de agua por lo que la evaporación es muy grande y su nivel de exposición a la radiación es enorme (Collantes, 1971).

Garland (1985) señala que existe en el intermareal una distribución de tamaños para la especie *G. laevifrons*, en la que las pozas pequeñas, alejadas de la zona de rompiente y con renovación escasa, contienen individuos más pequeños. Mientras más cercana esté la zona de rompientes, se encuentran solo pozas grandes, con mayores tasas de renovaciones de agua e individuos de mayor tamaño. Este autor encontró 3 grupos de tamaño principales con la siguiente estructura de tamaño: Grupo 1) 2 cm ; 2) 5 cm; 3) 8,5 cm. El desove de las hembras ocurriría en primavera, las larvas invadirían las pozas y alcanzarían al final del año los 2 cm. La vida en pozas litorales comenzaría en los meses de noviembre-diciembre donde permanecerían por espacio de unos 2 años y la abandonarían al tercer año de vida con un tamaño de 8,5-11 cm.

Esta especie ha sido descrita como omnívora con una dieta compuesta principalmente por algas verdes, moluscos bivalvos y anfípodos (Fariña *et al.*, 2000). Pequeño & Sáez (2008) caracterizaron a esta especie con una serie de dientes planos en ambas mandíbulas, detrás de las cuales hay una banda de dientes similares, menos desarrollados reemplazando a los anteriores. No posee molares ni tampoco dientes en el paladar. Otras características de esta especie son sus mejillas escamadas y la presencia de opérculos desnudos, poseen aleta dorsal y anal escamadas en sus bases; doce espinas en la aleta dorsal; las porciones blandas elevadas, escamas de tamaño moderado y cinco branquiostegales (Fig.1).



**Figura 1.** Fotografía del baunco *Girella laevifrons* (Tschudi, 1845).

## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

H0: Dado que la radiación UV genera daño oxidativo, juveniles de *Girella laevis* mantenidos en acuarios y sometidos a diferentes tiempos de irradiación UV-B, presentarían estrés oxidativo expresado a través de un aumento en la lipoperoxidación, aumento en la actividad de la enzima antioxidante catalasa, aumento en la capacidad antioxidante no enzimática y una disminución en el índice de condición de Fulton.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto del tiempo de exposición a la radiación ultravioleta en juveniles de la especie *G. laevifrons* a nivel celular y del organismo, a través de parámetros de estrés oxidativo e indicadores de condición animal, respectivamente.

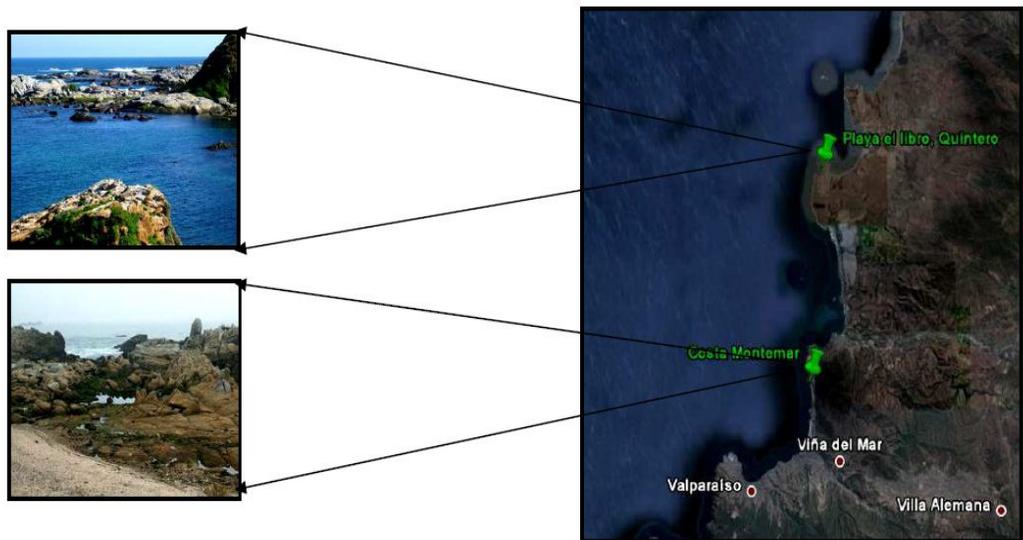
#### 3.2. Objetivos específicos:

- ✓ Determinar la dosis de irradiación UV estacional y la temperatura en pozas intermareales, y su variabilidad temporal en los meses de marzo, mayo, julio y septiembre.
- ✓ Determinar la actividad de la enzima catalasa en hígado de ejemplares expuestos a distintos tiempos de irradiación.
- ✓ Determinar el grado de lipoperoxidación a través del ensayo TBARS en células musculares en *G. laevifrons* sometida a distintos tiempos de irradiación.
- ✓ Determinar la capacidad antioxidante total no enzimática en músculo e hígado de juveniles de *G. laevifrons*.
- ✓ Correlacionar los parámetros de estrés oxidativo con los tiempos de exposición a radiación UV-B.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Obtención de las muestras.

Para la obtención de las muestras se realizaron muestreos periódicos durante los meses Abril, Mayo y Junio en pozas litorales ubicadas en el sector de Montemar ( $32^{\circ}57'22,34''$  S;  $71^{\circ}33'01,13''$  W) Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales de la Universidad de Valparaíso; y la playa el Libro en el sector de Quintero ( $32^{\circ}46'38,93''$  S;  $71^{\circ}32'07,25''$  W) (Fig. 2).



**Figura 2.** Mapa de las respectivas zonas de muestreo

Las pozas litorales para realizar el muestro se seleccionaron según Garland (1985), quien señaló que existe una distribución de tamaños de la especie *G. laevifrons* en

Montemar con relación al tamaño de la poza intermareal, a la ubicación con respecto a la zona de rompientes y al grado de renovación de agua.

Se realizaron capturas masivas de ejemplares en los lugares antes mencionados, Las muestras fueron obtenidas con una red de mano, previo a la aplicación de 15 mL de Benzocaína (BZ-20) en la poza, procurando que los ejemplares sean lo más similares posibles para reducir la formación de efectos de jerarquía según tamaño y para disminuir la varianza con respecto al peso, (Fig. 3). Posteriormente fueron trasladados al laboratorio húmedo de la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales de la Universidad de Valparaíso.



**Figura 3.** a) Captura mediante red de mano, luego de la aplicación de Benzocaína, b) mantención de los individuos luego de la captura hasta su traslado al laboratorio.

#### **4.2. Diseño experimental.**

Los individuos al llegar al laboratorio húmedo en la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales, fueron puestos en estanques cilíndricos negros de aproximadamente 11 L de capacidad, con agua de mar filtrada ( $<1 \mu\text{m}$ ) y a temperatura ambiente. Se estableció un periodo de aclimatación (Fig. 4) a las condiciones de

laboratorio, hasta el momento en que se observó que los ejemplares no presentaron conductas anormales (p.e., natación lateral, no aceptación del alimento, etc).



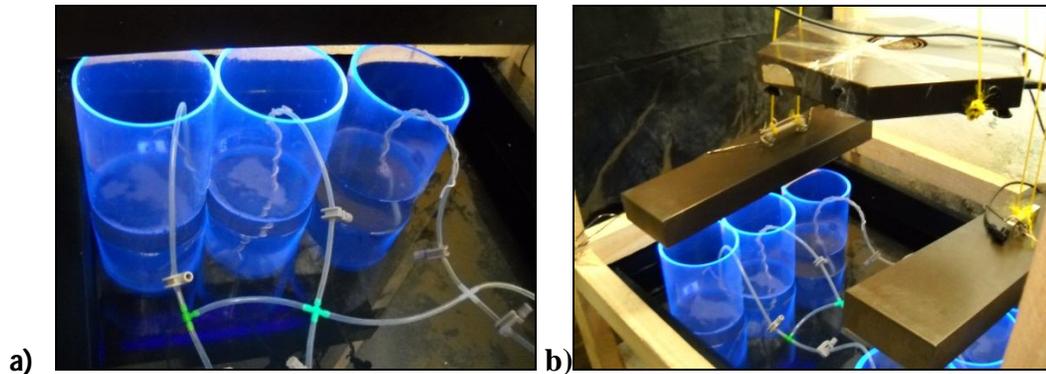
**Figura 4.** Estanque de aclimatación de 11 L de capacidad, con agua de mar filtrada ( $<1 \mu\text{m}$ ).

Luego de la aclimatación 2 juveniles de baunco fueron colocados en forma aleatoria en estanques cilíndricos de vidrio de 3,5 L de capacidad efectiva, a una densidad de  $0,57 \text{ individuos L}^{-1}$ , conformando una unidad experimental.

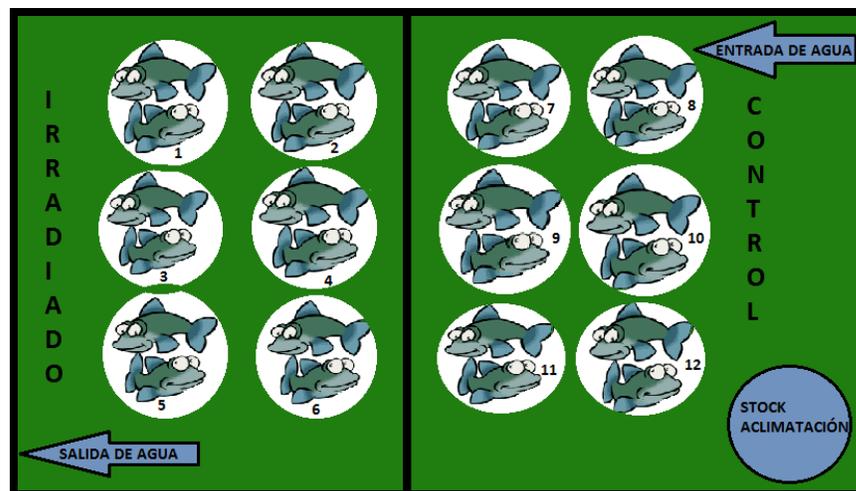
Se establecieron dos tipos de tratamientos (irradiados y control), los tratamientos con irradiación consistieron en distintos tiempos de irradiación UV-B: 1, 2, 3, 4 y 5 h respectivamente, con una intensidad de  $1 \text{ W/m}^2$  durante 5 días consecutivos, comenzando a las 12:00 h debido a que a esa hora en el medio natural es donde se registraron los mayores niveles de irradiación y la hora de término dependía de que tratamiento se estuviera realizando. (Fig. 5). Simultáneo a cada tratamiento de irradiación

con 6 réplicas cada uno, se disponía del tratamiento control también con seis réplicas (Fig.

6)



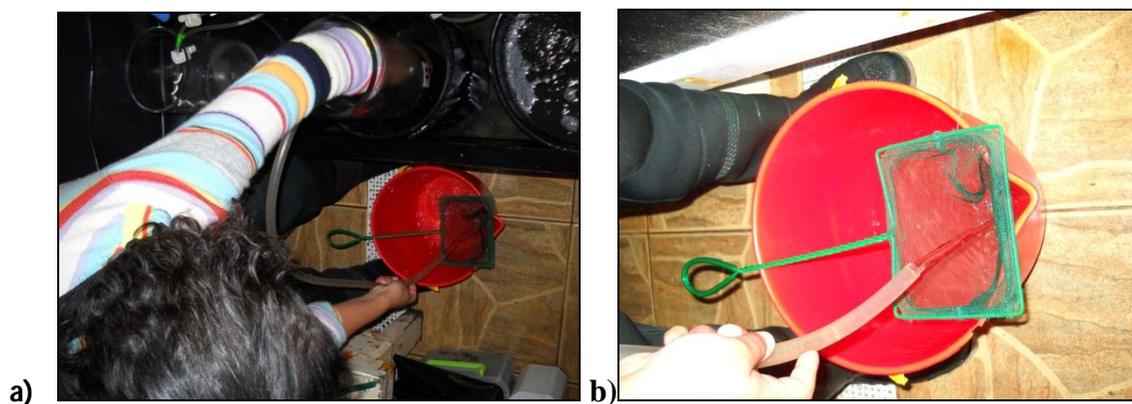
**Figura 5.**a, b) Unidades experimentales irradiadas a una intensidad de  $1 \text{ W/m}^2$



**Figura 6.**Diseño experimental para la mantención de juveniles de *G. laevis*

El fotoperíodo para todas las unidades experimentales (control e irradiado) fue 12L: 12O. La temperatura fue la ambiental y la alimentación diaria fue *ad libitum* para cada unidad experimental con un macerado de 0,75 g de chorito maico *Perumytilus purpuratus*, tanto para los controles como para los irradiados.

Diariamente se realizó una limpieza de cada unidad experimental (Fig. 7) entre las 08:00 – 09:00 y cuando finalizaba se proporcionaba la alimentación, junto con obtener un registro de mediciones de la concentración de oxígeno disuelto mediante un Oxímetro (YsiModel 57, Oxygen Meter).



**Figura 7. a,b).** Limpieza de cada unidad experimental. La extracción del agua se realiza mediante una manguera succionando el agua por la diferencia de presión.

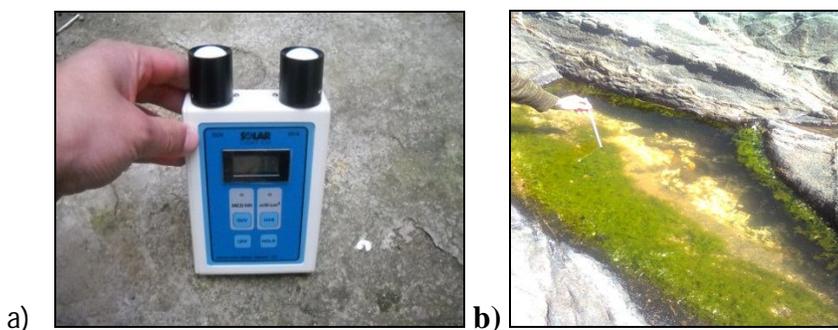
La forma de suministrar cada tratamiento en las unidades experimentales se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tiempo de irradiación y números de individuos para cada tratamiento de *G. laevifrons* que eran mantenidos en acuarios.

Tratamiento	I	II	III	IV	V
Individuos UV	12	12	12	12	12
Individuos control	12	12	12	12	12
Tiempo de exposición (h)	1	2	3	4	5
Radiación (W/m <sup>2</sup> )	1	1	1	1	1

#### 4.3. *Medición de parámetros in-situ*

Durante tres días en los meses marzo, mayo, julio y septiembre se midió la irradiación que llegaba a una poza seleccionada al azar (Fig. 8a). Para esto se utilizó un radiómetro (Biometer Solar Light, Model 3D) con el cual cada una hora se midió la radiación de tipo UV-B y UV-A, comenzando desde las 09:00 y finalizando en Marzo y Mayo a las 19:00 y en julio y septiembre a las 18:00 h. También se determinó la temperatura en la poza cada una hora mediante un termómetro de Vidrio -10°C A 110°C/0,2°C Mercurio (Fig. 8b).



**Figura 8 .a)** Medición in situ de la irradiación incidente en la poza, mediante un radiómetro. **b)** Medición de temperatura de la poza mediante un termómetro.

Para determinar que cantidad de la radiación era absorbida por el agua de mar en la poza, se tomaron muestras de agua, mediante recipientes previamente esterilizados que luego fueron medidas con un espectrofotómetro con la longitud de onda correspondiente a la radiación UV-B (290-320 nm). Este valor fue comparado con el mismo análisis pero tomando muestras de agua de mar filtradas a ( $<1 \mu\text{m}$ ) en la que se encontraban los individuos del experimento

#### ***4.4. Obtención de datos***

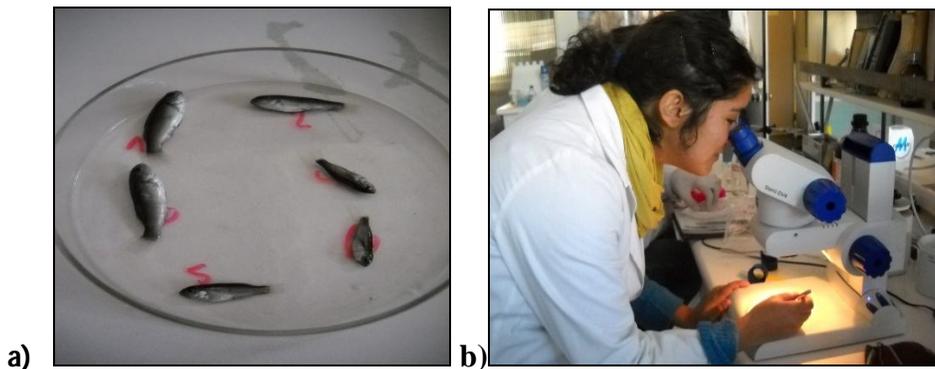
##### ***4.4.1. Determinación del estrés oxidativo***

##### ***Preparación de las muestras***

Finalizado el tiempo de irradiación del respectivo tratamiento y su control, los individuos inmediatamente fueron sacrificados mediante shock térmico e introducidos en recipientes de plástico (100 mL) previamente rotulados con el número correspondiente a

cada unidad experimental para su transporte inmediato al laboratorio de radicales libres de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.

En el laboratorio fueron pesados mediante una balanza analítica (0,0001 g) obteniendo su peso total y el peso del músculo e hígado luego de su disección. Se registraron medidas morfométricas como longitud total y estándar, obtenidas con un pie de metro, (Fig. 8a). La extracción de músculo e hígado fue realizado con una lupa (Zeiss, Stemi DV4) para las pruebas TBARS y Catalasa respectivamente, (Fig. 8b), mientras que la capacidad antioxidante total fue realizada por TRAP y en ambos órganos. Según Valenzuela & Videla (1983) la enzima Catalasa y la lipoperoxidación son especialmente activas en células hepáticas, renales y en el eritrocito.



**Figura 9.** a) Obtenci6n de medidas morfom6tricas, previ6 a la rotulaci6n; b) Extracci6n de h6gado y m6sculo de juveniles de baunco.

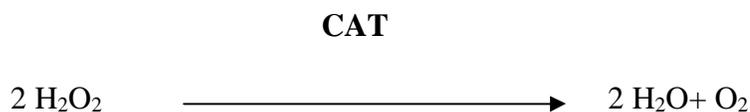
### ✓ ***Lipoperoxidaci6n***

Para determinar el grado de lipoperoxidaci6n, se realiz6 la prueba TBARS, bas6ndose en el m6todo propuesto por Esterbauer *et al.*(1982), el cual consiste en hacer reaccionar la muestra con Acido Tiobarbit6rico. Para realizar el ensayo, el m6sculo fue

macerado por separado en 3 ml de buffer PBS a pH = 7,4, se hizo reaccionar con ácido tricloroacético (30% p/v) y se centrifugó 10 min. a 4000 r.p.m. (eliminación de proteínas) y el sobrenadante se hizo reaccionar con ácido tiobarbitúrico (0,67% p/v), se mantuvo en baño de agua a ebullición (baño María) 20 min y posteriormente, una vez frío, se realizó un barrido entre las longitudes de onda de 400 a 600 nm. El resultado se interpoló en una curva de calibración de malondialdehído (MDA). Este método se utilizó para cuantificar la magnitud de la peroxidación lipídica, producidas por diversas causas, midiendo el producto formado entre los aldehídos generados y el ácido tiobarbitúrico (TBA).

✓ ***Determinación de la actividad enzimática de catalasa***

Se determina en base a la cinética de degradación del peróxido de Hidrógeno:



La cinética se siguió espectrofotométricamente por lecturas de Absorbancia a 240 nm. Los datos se interpolaron en una curva de Calibración para obtener la actividad enzimática y luego se normalizaron de acuerdo a la cantidad de proteínas de cada muestra.

Los valores de actividad de catalasa se informaron como unidades de enzima/mg de proteínas totales.

**Procedimiento de análisis**

1. Se preparó un blanco con 3 ml de buffer fosfato pH 7.0 en una celda de cuarzo.
2. La celda para medir la muestra contenía:
  - 2,9 ml de buffer fosfato pH 7,0.

- 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 M.

- 5  $\mu$ L de macerado.

La muestra se leyó cada 15 segundos por un periodo de 1 min. (Aebi, 1984).

✓ ***Determinación de la concentración de proteínas totales***

El método utilizado fue el de Lowry modificado (1997), es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añadió un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

En este método la muestra se trató con el reactivo de folin-ciocalteau modificado. Si hay proteínas presentes se produce una coloración azul debido a la presencia de residuos de tirosina en las proteínas. Se midió la absorbancia a 580 nm y se comparó con las medidas obtenidas de soluciones de proteínas de concentraciones conocidas (patrón) tratadas de forma idéntica.

**Preparación de los reactivos:**

1.- Reactivo A. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% NaOH 0,1 M.

2.- Reactivo B1: CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O al 1%.

3.- Reactivo B2: Tartrato sódico-potásico al 2%.

4.- Reactivo C: Se preparó en el momento de iniciar el ensayo, mezclando A, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en proporciones 50:0,5:0,5 (en volumen).

5.- Reactivo Folin-Ciocalteu.

6.- Solución patrón de albumina de suero bovino (BSA) de concentración 2mg/mL.

7.- Muestra problema.

Para determinar la concentración de proteínas de la muestra problema se construyó una curva patrón o de calibrado a partir de una solución patrón (BSA) (smg/mL).

La concentración que tienen las muestras problema se determinó por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. El tubo 0, que solo contenía agua destilada y los reactivos, constituye el blanco para el ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia.

✓ **Capacidad antioxidante**

Se determinó la capacidad antioxidante total (TRAP) que consiste en las defensas antioxidantes no enzimáticas, que actúan atrapando radicales catiónicos generados a partir de ABTS (2,2'-azinobi(3- etilbenzotiazolina-6-acido sulfónico)) por incubación con (ABAP:2,2'-azobis(2-amidinopropano)). Se utilizó el método de Romay *et al.* (1996), donde los órganos extraídos son tratados por separado. Se maceró cada uno de ellos con 3 mL de buffer PBS pH=7,4, se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 10 min. Del sobrenadante obtenido de la centrifugación se extrajo 10 µL (diluido 1:50 con PBS pH=7,4) que se depositó directamente en una celda de vidrio para espectrofotometría de 1 mL de capacidad; a esta se le agregó 1 mL de solución de los reactivos ABTS  $150 \times 10^{-6} \text{M}$  y ABAP 10 mM (1:1) que previamente ha sido incubada por 30 min. a 45°C (absorbancia: 0,55, longitud de onda 734 nm). Se sigue la cinética de decaimiento de absorbancia producida por la inactivación (“trapping”) de los radicales libres catiónicos generados en la reacción

entre ambos, que le otorgaba un tono azulado a la solución; se registraron los valores de absorbancia a 0, 10, 30 y 50 segundos. Se usó como blanco ABAP (10 mM) a una longitud de onda de  $\lambda = 734$  nm. Los datos fueron estandarizados siguiendo el siguiente algoritmo:

$$\frac{(\text{absorbancia } t \text{ 50} - \text{absorbancia } t \text{ 10})}{\text{absorbancia } t \text{ 30}}$$

El valor obtenido fue interpolado en una curva de calibración utilizando como patrón el antioxidante Trolox, con lo que se expresó la capacidad antioxidante total en  $\mu\text{moles/L}$ .

#### **4.4.2. Alimentación y condición**

Para la determinación de la ingesta diaria de alimento, de cada unidad experimental por un periodo de 5 días se recogió diariamente entre las 8:00 y 9:00 el alimento no ingerido, el cual fue depositado en tubos eppendorf de 0,74 mL de capacidad.

Estos tubos fueron trasladados al laboratorio de radicales libres de la Facultad de Ciencias para extraer de su interior el alimento no ingerido, el cual fue pesado (peso húmedo) y finalmente introducido a una estufa eléctrica para su secado ( $37^{\circ}\text{C}$ ) durante 48 h., obteniendo el peso seco de la muestra.

Para obtener un estado de la condición en la que se encuentren los individuos, se obtuvo el índice de condición de Fulton  $K = (P/L^3) \times 100$ , donde P, es el peso del pez, y L la longitud. Este índice se registró para cada pez con las medidas morfométricas obtenidas posterior a su sacrificio.

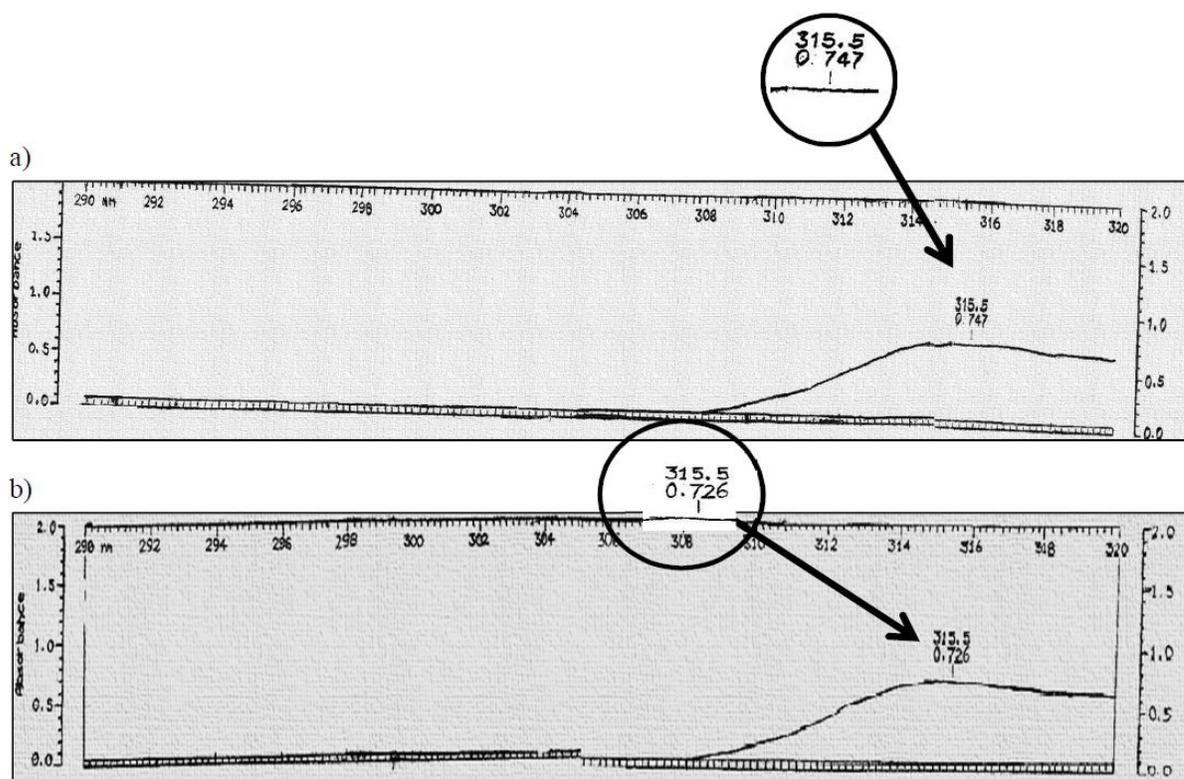
#### **4.5. Análisis estadístico**

Para comparar las medidas morfológicas, como los indicadores de estrés oxidativo entre la condición de irradiado y control se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, previa confirmación de supuestos de homogeneidad de varianza (test de Cochran) y normalidad (test de Shapiro & Wilk). Para los análisis sobre la variación en la alimentación se realizó análisis de varianza (ANOVA) y cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba múltiple de comparación de medias de Tukey ( $P=0,05$ ). Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con el programa estadístico Statistica 6.1 (Statistica, 2001).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Espectros de absorción

Los espectros de absorción del agua de mar filtrada y sin filtrar, presentaron máximos de absorción distintos (0,726 y 0,747 nm) respectivamente (Fig. 9). Al comparar estos máximos de absorción se observó que la absorbancia del agua de mar sin filtrar fue mayor que el agua de mar filtrada.



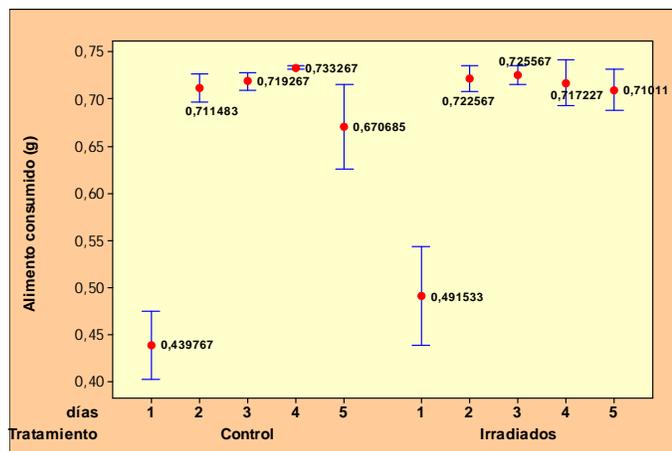
**Figura 10.** Espectrogramas de absorción de radiación UV-B (290-320 nm). **a)** Agua de mar sin filtrar; **b)** Agua de mar filtrada.

## **5.2. Efecto de la RUV en la alimentación, medidas morfométricas, condición corporal y parámetros de estrés oxidativos**

### **5.2.1. 1 Hora de irradiación**

Las variables morfológicas longitud total y peso total de los individuos no presentaron diferencias significativas entre ambos tratamientos (control e irradiados) (control:  $U=156,5$ ,  $p=0,7288$ ; irradiados:  $U=136,0$ ,  $p=0,4357$ ). Sin embargo el índice de condición de Fulton sí exhibió diferencias significativas entre tratamientos ( $U= 87,0$ ,  $p=0,0003$ ), donde la condición fue mayor en el tratamiento control comparado con los juveniles irradiados.

El alimento consumido mostró variaciones según el tipo de tratamiento aplicado sobre los individuos y los días de irradiación ( $U=6,38$   $p=0,015$ ;  $U=186,34$ ,  $p=0,000$  respectivamente). La interacción entre ambos factores también resultó positiva ( $U=4,03$ ,  $p=0,004$ ). En el tratamiento control se presentó significativamente un aumento paulatino de la alimentación desde el primer día (Fig. 11), disminuyendo hacia el quinto día. El tratamiento irradiado exhibió una variación similar aumentando significativamente desde el primer día, manteniéndose relativamente constante los días siguientes.



**Figura 11.** Alimentación (g) Con una hora de irradiación diaria a una intensidad de  $1(\text{W}/\text{m}^2)$ , respecto del tratamiento y los días de alimentación. Los puntos señalan la media del alimento consumido (g) y las barras la desviación estándar.

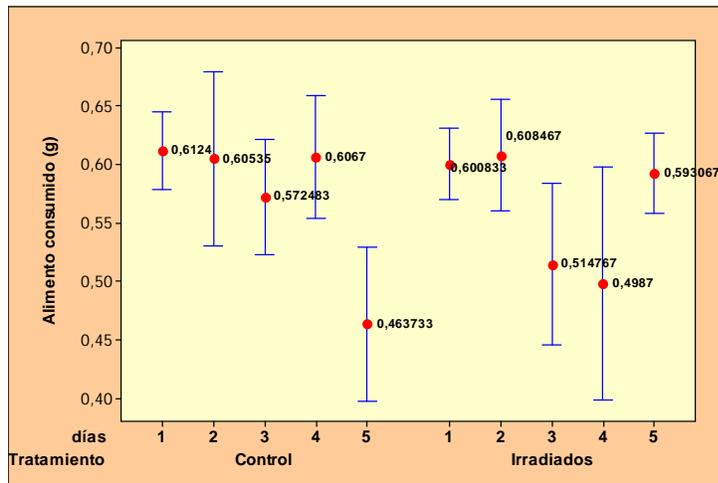
Los parámetros de estrés oxidativo como la lipoperoxidación y la actividad de la enzima Catalasa no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $U=145,5$ ,  $p=0,8150$ ;  $U=128,0$ ,  $p=0,8294$  respectivamente). La actividad antioxidante no enzimática si exhibió diferencias significativas en el hígado de los individuos ( $U=214,0$ ,  $p=0,0002$ ), presentando una mediana mayor los individuos irradiados. Sin embargo en el tejido muscular no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $U=171,0$ ,  $p=0,2364$ ).

### 5.2.2. 2 Horas de irradiación

Las variables morfométricas como peso total del individuo y longitud total no presentaron diferencias significativas entre el tratamiento control e irradiados ( $U=140,0$ ,  $p=0,5834$ ;  $U=155,5$ ,  $p=0,7728$  respectivamente). El índice de condición de Fulton tampoco presentó diferencias significativas ( $U=124,0$ ,  $p=0,1410$ ) entre tratamientos.

El factor tratamiento del animal (irradiado o control) y los días de irradiación generaron diferencias significativas ( $F=5,03$ ;  $p=0,002$ ;  $F=5,93$ ;  $p=0,000$  respectivamente), en la alimentación diaria consumida. La interacción de estos factores generó variaciones en la cantidad de alimento ingerido durante los cinco días del experimento ( $F=7,33$ ;  $p=0,000$ ), observándose una significativa diferencia en la ingesta de alimento en ambos tratamientos luego del segundo día de experimentación (Fig. 12).

La variación diaria en la alimentación indicó que el quinto día del tratamiento control exhibió diferencias significativas con el resto de los días del mismo tratamiento y con el primer día del tratamiento irradiado. En el tratamiento irradiado el cuarto día mostró diferencias significativas con el segundo día del mismo tratamiento y con el quinto y primer día del tratamiento control. Se presentaron diferencias significativas en el quinto día entre ambos tratamientos.



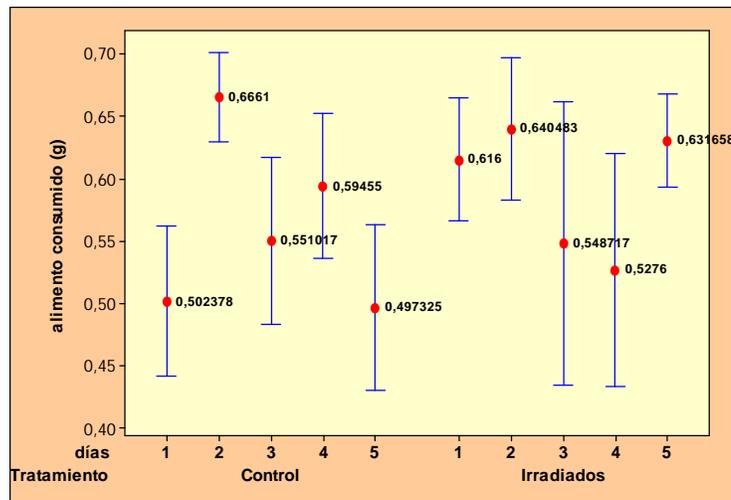
**Figura 12.** Alimentación (g) con dos horas de irradiación diarias a una intensidad de 1 ( $\text{W}/\text{m}^2$ ), respecto del tratamiento y los días de alimentación. Los puntos señalan la media del alimento consumido (g) y las barras la desviación estándar.

Los parámetros de estrés oxidativo como la lipoperoxidación de lípidos en el tejido muscular y la actividad de la enzima catalasa en el hígado no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos control e irradiados ( $U=173,0$ ,  $p=0,1939$ ,  $U=151,5$ ,  $p=0,9540$  respectivamente). En la capacidad antioxidante no enzimática si se observaron diferencias significativas, pero ésta varió según el tejido, para el caso del tejido muscular no se observaron diferencias significativas ( $U=162,0$ ,  $p=0,5067$ ). Sin embargo en el hígado si se presentaron diferencias significativas ( $U=201,0$ ,  $p=0,0035$ ), con una mediana mayor el tratamiento irradiado.

### 5.2.3. 3 Horas de irradiación

No se presentaron diferencias significativas en el peso total de los individuos ( $U=173,0$ ;  $p=0,193$ ) entre tratamientos, pero si en su longitud total ( $U=188,0$ ;  $p=0,0304$ ), encontrándose una mediana mayor en los individuos irradiados. Sin embargo no se generaron diferencias significativas en el índice de condición de Fulton ( $U=171,0$ ;  $p=0,2366$ ) entre ambos tratamientos.

Los días de irradiación generaron variaciones significativas en la cantidad de alimento ingerido ( $F=5,23$ ;  $p=0,001$ ), produciéndose una relación significativa en cuanto a efecto sobre la alimentación entre el tipo de tratamiento (control e irradiado) y los días de experimentación ( $F=5,19$ ;  $p=0,001$ ). Se exhibieron diferencias significativas en cuanto a un aumento de la ingesta del alimento entre el primer y segundo día del tratamiento control y una disminución significativa en el quinto día (Fig. 13). En el tratamiento irradiado se observó un significativo gran aumento en la alimentación en el segundo día, declinando significativamente hacia el cuarto día. El quinto día fue donde se presentó la máxima de alimentación.



**Figura 13.** Alimentación (g) con tres horas de irradiación diaria a una intensidad de 1 ( $\text{W}/\text{m}^2$ ), respecto del tratamiento y los días de alimentación. Los puntos señalan la media del alimento consumido (g) y las barras la desviación estándar.

Los parámetros de estrés oxidativo como la lipoperoxidación de lípidos en el tejido muscular, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $U=103,0$ ;  $p=0,1310$ ). La actividad enzimática Catalasa en el hígado si mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $U=211,0$ ;  $p=0,005$ ), resultando mayor la actividad en los organismos irradiados

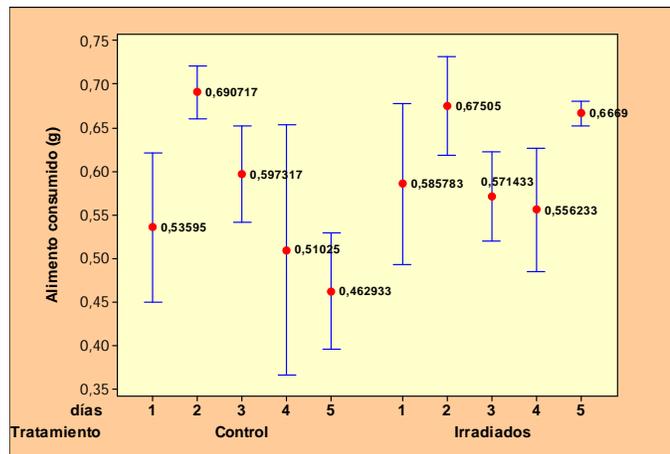
En la capacidad antioxidante no enzimática no se encontraron diferencias significativas en el músculo irradiado como control ( $U=147,0$ ;  $p=0,8852$ ). En hígado si se observaron diferencias significativas ( $U=95,4$ ;  $p=0,0377$ ), resultando la mediana de los irradiados mayor a los controles.

#### **5.2.4. 4 Horas de irradiación**

En las variables morfológicas como peso total y longitud total de cada individuo no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos control e irradiados ( $U=163,0$ ,  $p=0,4705$ ;  $U=131,5$ ,  $p=0,2987$  respectivamente). Sin embargo el índice de condición de Fulton si presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $U=195,0$ ,  $p=0,0102$ ).

La alimentación de cada unidad experimental varió significativamente según el factor días como el tipo de tratamiento a que fueron expuestos ( $F=7,89$ ,  $p=0,000$  ;  $7,84$ ,  $p=0,000$  respectivamente). La interacción entre ambos factores también resultó significativa ( $F=5,58$ ;  $p=0,000$ ).

La alimentación en el tratamiento control manifestó un aumento significativo hacia el segundo día (Fig. 14), decreciendo significativamente hacia el quinto día. En el tratamiento irradiado también se presentó un aumento significativo de la alimentación hacia el segundo día, decreciendo significativamente hacia el cuarto día, pero observándose un aumento considerablemente significativo hacia el quinto día.



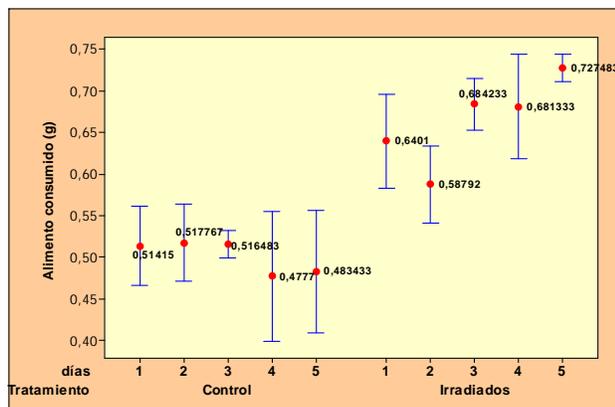
**Figura 14.** Alimentación (g) con cuatro horas de irradiación a una intensidad de 1 ( $\text{W}/\text{m}^2$ , respecto del tratamiento y los días de alimentación. Los puntos señalan la media del alimento consumido (g) y las barras la desviación estándar.

Los parámetros de estrés oxidativo como la lipoperoxidación no presentaron diferencias significativas ( $U=131,0$ ;  $p=0,2855$ ). Sin embargo, la actividad de la enzima catalasa si mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $U=211,0$ ,  $p=0,0005$ ), resultando los individuos irradiados con una mediana mayor. La capacidad antioxidante no enzimática presentó diferencias significativas en el hígado entre tratamientos ( $U=219,0$ ,  $p=0,0001$ ), exhibiendo una mediana mayor los individuos irradiados. En cuanto al tejido muscular no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $U=162,0$ ,  $p=0,5067$ ).

### 5.2.5. 5 Horas de irradiación

En las variables morfológicas como peso total y longitud total de los individuos no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos control e irradiados ( $U=123,0$ ,  $p=0,1260$ ;  $U=116,0$ ,  $p=0,0531$  respectivamente). El índice de Fulton una vez finalizado el experimento no presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $U=181,0$ ;  $p=0,0783$ ).

La alimentación presentó variaciones debido al factor tratamiento y días en el que se encontraban expuestos los individuos ( $F=163,13$ ,  $p=0,000$ ;  $F=5,89$ ,  $p=0,021$  respectivamente). En la interacción de ambos factores también se generaron significativas en el alimento consumido ( $F=5,65$ ,  $p=0,001$ ). La alimentación no presentó diferencias significativas en los tres primeros días en el tratamiento control (Fig. 15), disminuyendo significativamente hacia el cuarto día. En el tratamiento irradiado la alimentación exhibió variaciones significativas diariamente, observándose una tendencia al aumento, volviéndose máximo hacia el quinto día.



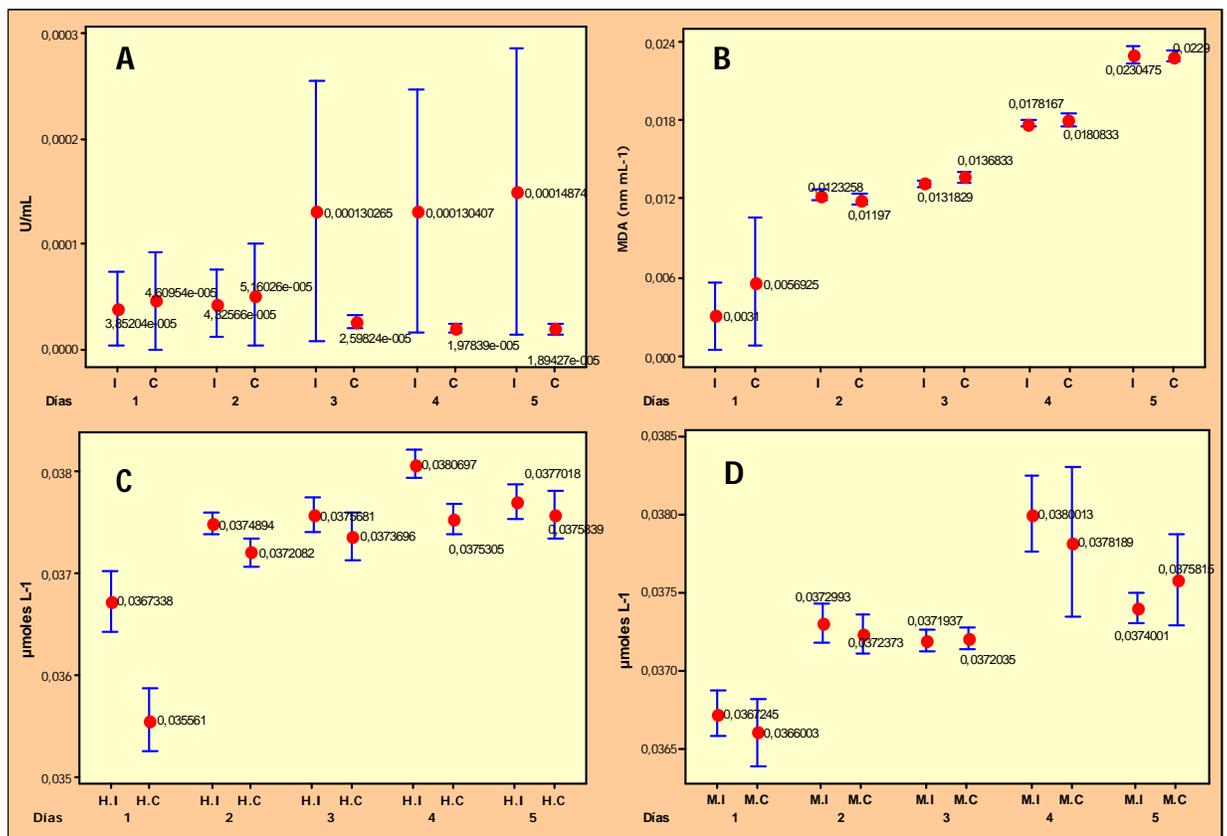
**Figura 15.** Alimentación (g) con cinco horas de irradiación a una intensidad de  $1(W/m^2)$ , respecto del tratamiento y los días de alimentación. Los puntos señalan la media del alimento consumido (g) y las barras la desviación estándar.

La lipoperoxidación en el tejido muscular no mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $U=122$ ,  $p=0,7928$ ). Sin embargo en la actividad de la enzima catalasa si se presentaron diferencias significativas entre controles e irradiados ( $U=211,0$ ,  $p=0,0005$ ). La capacidad antioxidante no enzimática no exhibió diferencias significativas en el hígado ( $U=150,0$ ,  $p=1.000$ ), resultando con medianas iguales. En cuanto al músculo no se observaron diferencias significativas ( $U=131,0$ ,  $p=0.2855$ ) con medianas muy similares.

**5.2.6. Variación de Parámetros de estrés oxidativo durante el tiempo de experimentación.**

La actividad antioxidante de la enzima Catalasa, la lipoperoxidación y la actividad antioxidante no enzimática en el hígado presentaron una variación en aumento en los individuos irradiados en relación con el aumento del tiempo de exposición de RUV, en comparación con el tratamiento control (Fig. 16).

La capacidad antioxidante no enzimática en el tejido muscular no presentó un patrón regular de variación en relación con los tiempos de irradiación, observándose un leve aumento hacia el primer tratamiento, pero disminuyendo hacia el quinto.



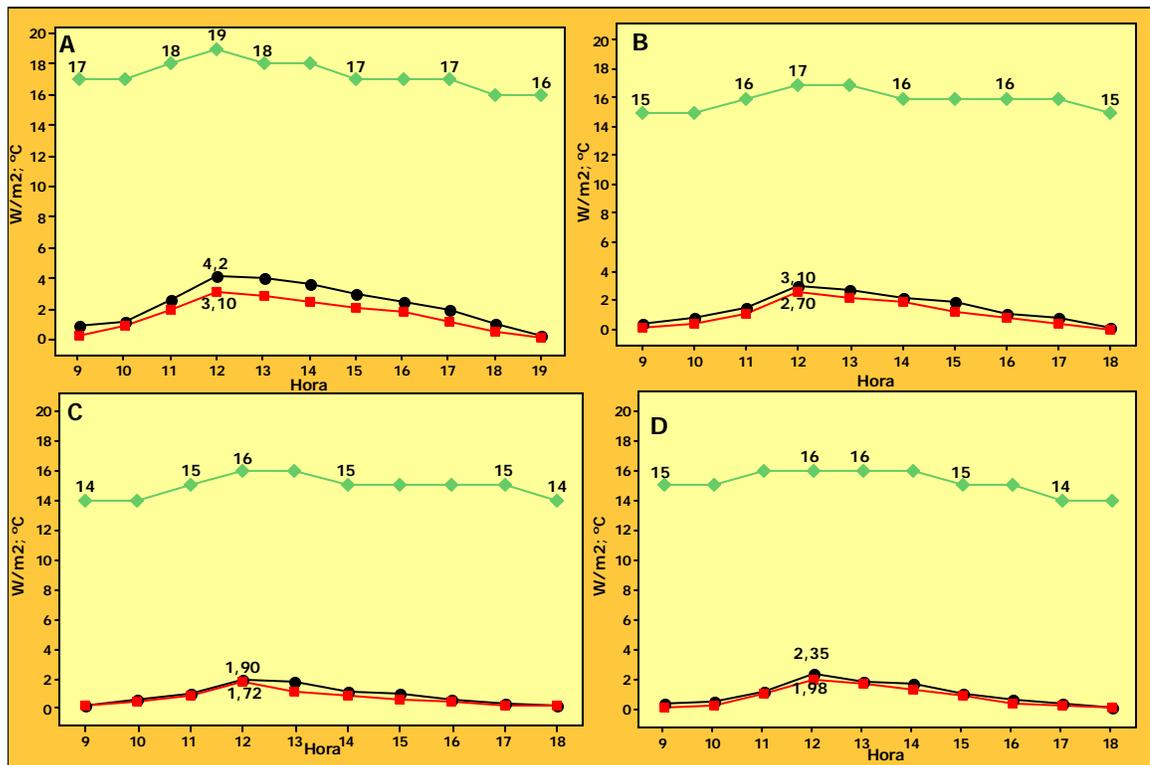
**Figura 16.** Parámetros de estrés oxidativos durante los cinco días de experimentación, con su respectivo tiempo de irradiación todos con una intensidad de  $1(\text{W}/\text{m}^2)$ . Los puntos señalan la media del alimento consumido (g) y las barras la desviación estándar.

**Donde:**

- Variación de la actividad de la enzima Catalasa ( $\text{U}/\text{mL}$ ), durante cinco días, entre tratamientos.
- Variación de la oxidación de lípidos MDA ( $\text{nm} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) durante los cinco días entre tratamientos.
- Variación de la actividad antioxidante ( $\mu\text{moles L}^{-1}$ ) no enzimática en hígado entre tratamientos y durante los cinco días de experimentación.
- Variación de la actividad antioxidante ( $\mu\text{moles L}^{-1}$ ) no enzimática en músculo entre tratamientos y durante los cinco días de experimentación.

### 5.3. Irradiación recibida por las pozas intermareales

La radiación ultravioleta presentó sus máximos de irradianza al medio día junto con los máximos de temperatura en la poza, variando estos parámetros en relación a la nubosidad y estacionalidad. Según los meses estudiados, el mes que registró el máximo valor de RUV fue Marzo, disminuyendo hacia Julio.



**Figura 17.** Irradiación UV-A, UV-B y temperatura del agua en pozas intermareales para los meses de Marzo (A), Mayo (B), Julio (C) y Septiembre (D). Las línea roja y negra señalan la irradiación UV-B y UV-A, respectivamente. La línea verde indica la temperatura.

## 6. DISCUSIÓN

Según observaciones realizadas en pozas intermareales donde se encontraban juveniles de *Girella laevifrons*, se registraron conductas como: desplazamientos rápidos, refugiarse bajo rocas y desplazamientos en grupos. Esto coincide por lo señalado por Zamzow. (2004), quien indica que los organismos marinos tendrían dos tipos de estrategia para evitar su exposición a la RUV como vivir bajo rocas, en cuevas, dentro de conchas, o a grandes profundidades y la segunda sería sintetizando o secuestrando sustancias protectoras solares.

Fariña *et al.* (2000), describe al baunco como una especie con una alimentación de tipo omnívora, compuesta principalmente por algas verdes, moluscos bivalvos y anfípodos, aludiendo a la utilización de la segunda estrategia señalada por Zamzow (2004) en cuanto a protección frente a la RUV “las sustancias protectoras solares”. Entre estas sustancias según (Korbee *et al.*, 2006), se encuentran los carotenoides, las ficobiliproteínas, los fenoles, las cumarinas y los aminoácidos tipo micosporina (MAAs). Estos MAAs al no poder ser producidos aparentemente por animales, son acumulados vía transferencia trófica en invertebrados marinos como en peces (Zamzow, 2006).

Según un estudio en peces de arrecifes de coral realizado por Zamzow (2004), estos secuestrarían MAAs en sus mucus y estructuras oculares, modificando su capacidad de absorbanza UV, según incrementos de profundidad y distancias geográficas desde el ecuador. En *Talassoma duperrey* el mismo autor encontró que el mucus de las hembras de estos peces absorbía significativamente menos UV, que el mucus de los

machos. Esto tendría relación con lo señalado por Korbee *et al.* (2006) y Chiaki *et al.* (2007) que en invertebrados marinos los MAAs estarían involucrados en procesos reproductivos, debido a que en algunos huevos de éstos, se han encontrado gran cantidad de MAAs, cercano al período de desove.

Los individuos en *G. laevifrons* muestran cambios estacionales en su dieta, un aumento en el tamaño, masa y capacidad de los órganos del tracto digestivo, un aumento en el tiempo de retención de la dieta y un elevado transporte activo de nutrientes por el intestino delgado durante los meses de invierno (Bozinovic, 1993). Esta plasticidad estructural y funcional se podría haber provocado en el caso de los individuos irradiados, principalmente con las cinco horas de irradiación en cada tratamiento, donde se observó un aumento paulatino de la alimentación, posiblemente debido a una respuesta compensatoria por los costos metabólicos que se estaban produciendo.

Los parámetros de estrés oxidativo como la actividad antioxidante enzimática y la lipoperoxidación expresaron un aumento en los individuos irradiados hacia las 5 horas de exposición, sugiriendo la gran resistencia antioxidante de la especie para disminuir los efectos según lo señalado por Sánchez (2005) de las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno en la lipoperoxidación. Se comprueba así la eficacia de este sistema antioxidante en cuanto a la reparación o eliminación de estructuras biológicas dañadas, debido a que en todos los tiempos de exposición nunca se presentaron diferencias significativas en la lipoperoxidación entre los individuos irradiados y los controles.

Según Yu (1994), los sistemas antioxidantes se encuentran estratégicamente ubicados para proporcionar una máxima protección e interacción con las especies reactivas.

Juveniles de *Girella laevifrons* al encontrarse en un hábitat de grandes fluctuaciones en cuanto a niveles de RUV (Fig. 17), han debido desarrollar mecanismos de protección y la alta actividad antioxidante de la enzima Catalasa podría ser una estrategia de sobrevivencia, como las mencionadas por Zagarese (2001).

La actividad antioxidante no enzimática, principalmente adquirida por la dieta como por lo serían la vitamina C, el betacaroteno, el licopeno, entre otros, actuarían en el medio liposoluble de la célula considerándose importantes protectores de las moléculas lipídicas frente a la oxidación (Yu 1994; Camaro, 2005; Sánchez, 2005;). El hígado de juveniles de *Girella laevifrons* mostró un aumento paulatino de la actividad antioxidante no enzimática en relación con el tipo de tratamiento y los tiempos de exposición, sugiriendo nuevamente la gran capacidad de protección pero ahora en cuanto a la acción directa frente a los radicales libres generados desde el  $O_2^-$ .

La capacidad antioxidante obtenida mediante la dieta en el hígado se puede comprobar porque no se observaron variaciones en la actividad antioxidante no enzimática en el músculo entre juveniles irradiados y controles. Sin embargo la protección antioxidante en el músculo no se relacionó con los tiempos de exposición porque según Zamzow (2004) la piel representa la primera defensa frente a la RUV, entonces el tejido muscular que se encuentra inmediatamente bajo la piel su nivel de lipoperoxidación debiera ser alto, contrarrestando estos efectos los sistemas antioxidantes, por lo que en el experimento al suministrar siempre el mismo tipo y cantidad de alimento se inhabilita la posibilidad de aumentar estos niveles de antioxidantes por la dieta, resultando como único método la reconversión de antioxidantes de otros ya existentes.

Esta situación adversa para la especie en cuanto a variedad y cantidad de alimento, en el medio natural podría verse modificada porque según Bozinovic. (1993) en peces herbívoros y carnívoros existirían adaptaciones genéticas, evolutivamente rígidas en cuanto a la fisiología digestiva, pero en el caso *Girella laevifrons* como es una especie omnívora sería capaz de producir una regulación fenotípica de la fisiología digestiva en cuanto a composición química del alimento (Arts, 2010). De esta forma puede beneficiarse de una cierta plasticidad en cuanto a qué tipo de alimentación seleccionar, según condiciones ambientales, oportunidades y estados de desarrollo.

En experimentos realizados en chorito *Mytilus edulis*, en cuanto a síntesis de ácidos grasos, se determinó gran cantidad de ésta en el manto de la especie, debido a la alta actividad acetil-Coa carboxilasa (transforma acetil-coa en malonil-coa) y actividad FAS (complejo multienzimático ácido graso sintetasa) (Guillaume *et al.*, 2004), sugiriendo entonces que durante el proceso de experimentación juveniles de banco fueron alimentados por una gran cantidad de ácidos grasos, los cuales según Valenzuela & Videla. (1983) sufren procesos de oxidación que conducen a la formación, de peróxidos e hidropéroxidos orgánicos a través de la lipoperoxidación. Estos ácidos grasos pudieron también contribuir a la lipoperoxidación, pero por las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas de la especie no se observaron diferencias en la lipoperoxidación entre tratamiento. Según Arts. (2010) se han reportado numerosos signos anatómicos patológicos en peces, alimentados con raciones conteniendo aceites de peces/vegetales en exceso, carentes de la protección de algún antioxidante (Vitamina E).

En las muestras de agua analizadas mediante espectrofotometría, la alta absorción de ambas muestras se puede deber a la concentración de materia orgánica

disuelta (MOD) presente en el agua de mar, la cual según Maloney *et al.* (2005), es un factor controlador de la intensidad de la luz UV. La cantidad de MOD de un sistema y su capacidad específica de absorción, según Reche. (2003) resulta del balance entre los aportes externos, las pérdidas *in situ* (degradación bacteriana, fotodegradación, fotomineralización y degradación), la producción *in situ* (fotosíntesis) y la dilución por precipitación o la concentración por evaporación.

Según Korbee *et al.* (2006) en dinoflagelados, la radiación UV provoca un descenso de la concentración de MAAs dentro de la célula y por lo tanto un incremento en la absorción de UV en el medio circundante, lo que explicaría que en el agua de mar filtrada (<1  $\mu\text{m}$ ), quedarían partículas retenidas, disminuyendo la capacidad de absorción de UV por parte del agua, demostrándose que los MAAs son un componente de la MOD (materia orgánica disuelta) que aun estando presente en bajas concentraciones, contribuyen a la absorción de la radiación UV.

Estimaciones cuantitativas de los efectos de la RUV en poblaciones naturales de peces son escasos. Uno de los principales desafíos sería evaluar y experimentar reproducir las condiciones naturales que se producen por irradiación en los peces silvestres, para lograr evaluar realmente el efecto sobre los organismos acuáticos, implementando medidas para aminorar su efectos, como por ejemplos disminuyendo niveles de contaminantes en las aguas y la atmósfera.

Un objetivo importante de los biólogos, sería ser capaz de poder predecir los efectos de los cambios en la exposición UV en una gran cantidad de organismos acuáticos, preferentemente de las especies recurso, determinar realmente que efecto tiene la RUV sobre estos organismos, porque los rayos ultravioleta pueden tener un efecto positivo

o negativo, dependiendo de longitud de onda e intensidad. Además los índices UV-A y UV-B pueden variar en varios órdenes de magnitud entre los hábitats.

En Chile los efectos de la radiación ultravioleta en organismos acuáticos aún son desconocidos, considerando solamente que desde el año 2000 se comenzó con el registro de la irradianza diaria. Para nuestro país sería de gran importancia realmente conocer sus efectos debido a que un desconocimiento de estos por ejemplo en centros de cultivos o en el manejo de pesquerías, puede provocar tomar decisiones erradas en cuanto a posibles causas de disminución de poblaciones, migraciones, aparición de erosiones en la piel y enfermedades.

## 7. CONCLUSIONES

- ✓ Los efectos nocivos que induce la radiación UV en organismos acuáticos pueden ser aminorados a través de varios mecanismos de fotoprotección entre los que se encuentran la acumulación de sustancias que absorben radiación UV (fotoprotectores), activación de sistemas antioxidantes y evadir la exposición a la RUV.
  
- ✓ Juveniles de *G. laevifrons* presentaron diferencias significativas en cuanto a la variación en la alimentación según tiempo de exposición, resultando las cinco horas como tiempo crítico para esta especie.
  
- ✓ La relación de la enzima Catalasa, lipoperoxidación y actividad antioxidante no enzimática en relación a los tiempos de exposición, en individuos irradiados, señala una gran capacidad de mecanismos de protección y reparación frente a la RUV.

## 8. LITERATURA CITADA

**Aebi H. 1984.** Catalase in vitro. *Methods Enzimol* 105: 121-126.

**Alveal K. 1990.** Estudios ficoecológicos en la región costera de la bahía de Valparaíso. *Revista de Biología Marina* 14 (1):7-88.

**Arts M, H. Browman, I. Kokinen & A. Skiftesvik . 2010.** Effects of UV radiation and diet on Polynsaturated Fatty Acids in the Skin, Ocular Tissue and Dorsal Muscle of Atlantic Salmon (*Salmosalar*) Held in Outdoor Rearing Tanks. *Photochemistry and Photobiology* 86:909-919.

**Barja de Quiroga. 1993.** Radicales libres y antioxidantes. Universidad de Complutense de Madrid. Ediciones Akal. 136pp.

**Bomboí T. 2004.** Contaminación atmosférica. Ediciones de la Universidad de Castilla. Capítulo 3: 71-87.

**Brown T, B. Bursten & J. Burdge. 2004.** Química la ciencia central. Novena Edición, 1046p.

**Bozinovic F. 1993.** Fisiología ecológica de la alimentación y digestión en vertebrados: modelos y teorías. *Revista Chilena de Historia Natural* 66:375-382.

**Cabrera S, E. Lissi, & J. Honeyman. 2005.** Radiación ultravioleta y salud. Editorial universitaria. Capítulo III, 293p.

**Cabrera M & A López . 2006.** Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología* 29 (7): 36-39.

**Cáceres C & P Ojeda. 2000.** Patrones de forrajeo en dos especies de peces intermareales herbívoros de las costas de Chile: efecto de la abundancia y composición química del alimento. *Revista Chilena de Historia Natural* 73: 253-260.

**Camaro Y. 2005.** "Estudio funcional de la proteína desacopladora mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y las especies reactivas de oxígeno". Tesis para optar al título de doctor en biología. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de Barcelona. 97 p.

**Collantes G. 1971.** Bioecología de cubetas litorales. Memoria de Biólogo marino Universidad de Chile, sede Valparaiso. 40pp.

**Cooke S, C. Williamson, D. Leech, W. Boeing & L. Torres. 2008.** Effects of temperature and ultraviolet radiation on diel vertical migration of freshwater crustacean zooplankton. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 65:1144-1152.

**Cuadrat M<sup>a</sup> José & M<sup>a</sup> Fernanda Pita. 1997.** Climatología. Ediciones Cátedra. 504 pp

**Dahms H & J Lee. 2010.** UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. Aquatic Toxicology 97: 3-14.

**Domínguez H. 2004.** Nuestra atmosfera: Como comprender los cambios climaticos, 80 pp, LD Books.

**Droge W. 2001.** Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Article Review 82:47-95.

**Esterbauer K, M. Cheeseman, G. Dianzani & T F Slater Biochem. 1982.** Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes 208(1): 129-140.

**Fariña J, M Aldana, F Ogalde & P. Ojeda. 2000.** Trophic ecology of *Girella laevis* (Pisces: Kyphosidae) in rocky intertidal zones of northern Chile affected and non-affected by copper mine tailings. Revista Chilena de Historia Natural 73: 139-149.

**Formicki G, R. Stawarz, P. Massanyi, M. Guzik, T. Laciak, Z. Goc & K. Kilian. 2009.** Cadmium availability to freshwater mussel (*Unio tumidus*) in the presence of organic matter and UV radiation. Journal of Environmental Science and Health Part A 44:808-819.

**Fuenzalida M. 1999.** Estudio fotoquímico y fotofísico de lomefloxacin y aporte de evidencias acerca de su mecanismo de fotodegradación. Tesis para optar al título de Químico farmacéutico. Universidad de Valparaiso. 41p.

**Garland D. 1985.** Alimentación, crecimiento diario y edad en *Doydixodon laevis* (Tschudi, 1845) (Pisces: Kyphosidae). Tesis para optar al grado de licenciado de Biología, 291pp.

**Hernández E & M. Cormack. 1997.** Cambios en la viabilidad de dos bacterias marinas antárticas expuestas a la radiación solar en la columna de agua: influencia de la mezcla vertical. *Revista Argentina de Microbiología* 39 (3):56-59.

**Harris E. 1992.** Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal* 19: 2675-2683.

**Juárez A. 1997.** Ozono ¿Qué, para qué y por qué?. *Elementos* 25(4): 31-38.

**Kowaltowski A, N. Souza-Pinto, R. Castilho & A. Vercesi. 2009.** Mitochondria and Reactive oxygen species. *Free Radicals Biology & Medicine* 47:333-343.

**Korbee N, F. Figueroa & J. Aguilera. 2006.** Acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Revista Chilena de Historia Natural* 79:119-132.

**Lars O. 2007.** Photobiology. The Science of Life and Light. Second Edition. Editorial Springer. 652p

**Linetsky M & J. Ortwerth. 1995.** The generation of hydrogen peroxide by the UV-A irradiation of human lens proteins. *Photochemistry and Photobiology* 62 (1): 87-93.

**Lissi E & E Sanhueza. 1996.** Radiación solar y fotoprocesos atmosféricos. Editorial Universidad de Santiago. 24 pp

**Martínez G. 2005.** Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales de especies reactivas del oxígeno. *Revista cubana de farmacia* 39(3).10-13.

**Maloney K, D. Morris, C. Moses & C. Osburn. 2005.** The role of iron and dissolved organic carbon in the absorption of ultraviolet radiation in humic lake water. *Biochemistry* 75:393-407.

**Moan J. 1994.** UV-A radiation melanoma induction. *Journal Photochemical and Photobiology* 24:201-203.

**Morales R. 1992.** Efectos desconocidos de un problema ya identificado. *Creces* 13(4): 54-57.

**Monks P, C. Granier & S. Fuzzi. 2009.** Atmospheric composition change – global and regional air quality. *Atmospheric Environment* 43: 5268–5350.

**O'Reilly J & C. Mothersill. 1997.** Comparative effects of UV-A and UV-B on clonogenic survival and delayed cell death in skin cell lines from humans and fish. *International Journal of Radiation Biology* 54:525-530.

**Yu P. 1994.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74(1):139-156.

**Pequeño G & S. Sáez. 2008.** El estatus taxonómico de *Doydixodon laevifrons* (Tschudi, 1846) (Osteichthyes: Kyphosidae). *Revista Peruana de Biología* 15(1):101-104.

**Peterson GL 1997.** simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemical* 83 (2): 346-356.

**Pinto M, C. Lizana, C. Pastenes, A. Riquelme & M. Berti. 2000.** Efecto de la radiación ultravioleta-B sobre el crecimiento y la fotosíntesis de siete variedades de trigo (*Triticumaestivum L.*) *Revista chilena de Historia Natural* 73(1):55-59.

**Pulgar J, M. Aldana, F. Bozinovic & P. Ojeda. 2003.** Does food quality influence thermoregulatory behavior in the intertidal fish *Girella laevifrons*?. *Journal of Thermal Biology* 28: 539-544.

**Pulgar J, F. Ojeda & F. Bozinovic. 2006.** Intraespecific geographic and seasonal physiological variability in an intertidal fish, *Girellalaevifrons*, along a climatic gradient. *Journal of Fish Biology* 68: 975-981.

**Reche I. 2003.** Sensibilidad de los ecosistemas acuáticos a la radiación ultravioleta: el papel de la materia orgánica disuelta. *Ecosistemas* 1:1-11.

**Rivas M, Rojas E & S. Madronich. 2008.** Solar ultraviolet index increase with altitude. *Revista chilena de ingeniería* 16(2): 383-388.

**Rodríguez P, J. Menéndez & J. Trujillo. 2001.** Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina* 30(1): 15-20.

**Romay C, Pascual C & E Lissi. 1996.** The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Brazil Journal Medical Biological* 29:175-183.

**Ros J. 1993.** El cambio climático y la subida del nivel del mar. Centro de estudios y experimentación de obras públicas. 73p.

**Ruiz F, N. Vargas, A. Trier& C. Silva. 1987.** Estrés oxidativo asociado a la contaminación atmosférica. *Creces* 6: 34-37.

**Stephan C, M. Pawlowski& R. Tollrian. 2001.** The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature* 412: 60-68.

**Speeding D.2001.** Air Pollution.Editorial Reverté S.A. Barcelona.Capítulo I.10-25.

**Vallejos L.2003.** Índice ultravioleta. Boletín departamentos de Física. Universidad de Antofagasta.75 pp-

**Valenzuela A &L.Videla. 1983.** Citotoxicidad del oxígeno: aspectos biológicos y médicos. *Revista de Medicina Chile* 111:825-836.

**Zagarese H & C. Williamson. 2001.** The implications of solar UV radiation exposure for fish and fisheries. *Fish and Fisheries* 2: 250-260.

**Zamzow J. 2004.**Effects of diet, ultraviolet exposure, and gender on the ultraviolet absorbance of fish mucus and ocular structures. *Marine Biology* 144:1057-1064.

**Zamzow J & U. Siebeck. 2006.** Ultraviolet absorbance of the mucus of a tropical damselfish: effects of ontogeny, captivity and disease. *Journal of Fish Biology* 69:1583-1594.

