

BIOMARCADORES EN *Cichlasoma facetum* (JENYNS, 1842) EXPUESTOS A AFLUENTES DE PAPELERAS DE ARROYOS PERIURBANOS

S.I. PERÍ, L. PEREIRA Y S. QUINTERO BLANCO

Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, siperi@museo.fcnym.unlp.edu.ar

RESUMEN

Los efluentes de papeleras contienen una miríada de productos químicos que causan efectos deletéreos sobre la biota acuática. La exposición a efluentes de papel afectan las funciones bioquímicas y fisiológicas que preceden efectos de mayor impacto en los niveles de población y comunidad. En este estudio se utilizaron un conjunto de biomarcadores para evaluar el impacto de los vertidos de una papelería en el arroyo El Gato sobre parámetros bioquímicos, fisiológicos y morfológicos en *Cichlasoma facetatum*. Los biomarcadores ensayados fueron indicadores de estrés metabólico (glucosa plasmática), estrés hemodinámico (hematocrito, hemoglobina), enzimas de daño hepático (Fosfatasa ácida y alcalina). Se midieron además el factor de condición e índices organosomáticos. Los peces obtenidos de sitios no contaminados fueron aclimatados 120 hs a temperatura y fotoperíodo natural y expuestos durante 1 semana a aguas de vertido de la papelería (controles n=12, expuestos n=12). Los animales no recibieron alimento durante el desarrollo del experimento. Las determinaciones se realizaron en pools de sangre e hígado de tres animales. La glucosa plasmática y los ensayos enzimáticos se midieron por espectrofotometría. Los resultados fueron comparables a los obtenidos en otras especies expuestas a efluentes de pulpa de papel. Se discute la validez de estos parámetros como biomarcadores de alerta temprano.

Palabras clave: efluentes de papeleras, biomarcadores, peces, estrés hemodinámico, estrés metabólico.

INTRODUCCIÓN

Los efluentes de papeleras contienen una miríada de productos químicos que causan efectos deletéreos sobre la biota acuática. En los peces, la exposición a efluentes de pulpa de papel conducen a un estado de estrés con alteraciones directas en su salud (Adams *et al.*, 1992, Burnison *et al.*, 1996). Los cambios relacionados con el estrés en las funciones bioquímicas y fisiológicas preceden, generalmente, efectos de mayor impacto en los niveles de población y comunidad (Adams, 1990).

Genéricamente los vertidos de efluentes de papeleras contienen sustancias tóxicas como clorofenoles, hipoclorito, dioxinas y furanos (Burnison, *op. cit.*)

En la última década el uso y desarrollo de biomarcadores han cobrado un interés creciente a fin de evaluar el riesgo biológico de una sustancia química potencialmente tóxica. Particularmente, los biomarcadores de efecto se constituyen en valiosos parámetros indicativos de la presencia de sustancias endógenas o cambios biológicos como respuestas a distintos xenobióticos (Kloepper- Sams *et al.*, 1994).

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la utilidad de biomarcadores de estrés metabólico (glucosa plasmática), estrés hemodinámico (hematocrito, hemoglobina) y enzimas de daño hepático (aspartato amino transferasa –GOT-, alanina amino transferasa –GPT-, fosfatasa ácida –FAc- y alcalina –FAI) en individuos adultos de *C. facetum* expuestos a descargas de efluentes de papeleras cuya actividad productiva se ha visto incrementada en los últimos meses con volcados en arroyos periurbanos de la ciudad de La Plata. Los ensayos han sido diseñados de forma de detectar cambios bioquímicos y fisiológicos subletales en los organismos expuestos a sustancias tóxicas. La utilidad de estos métodos yace en su habilidad en proveer un sistema de alerta temprano de tóxicos de estrés a nivel orgánico antes de que puedan ser detectadas respuestas a nivel de comunidad y ecosistema.

MATERIALES Y MÉTODO

Los peces (n=36, 50-60 g, peso total) procedentes de sitios no contaminados fueron aclimatados 120 horas a temperatura ambiente (20-22°C), fotoperíodo natural y agua de red. Los ensayos se realizaron en el período pre-reproductivo. La muestra del efluente se tomó a 10 m agua abajo de la boca principal de vertido.

Los animales fueron divididos en tres grupos y mantenidos en acuarios con un volumen total de agua de 20 l durante una semana. El grupo control (-C-n=12) recibió agua de red, el grupo 1 (Tratados 1-T1-, n=12) fueron expuestos al vertido de papelera sin diluir y el tercer grupo (Tratados 2-T2-, n=12) al vertido de papelera con dilución 1:20.

Durante el desarrollo del experimento (1 semana) los animales no recibieron alimento. No se observaron mortandades.

Las determinaciones se realizaron en pools de sangre de tres animales obtenidos por punción de la arteria opercular. El hematocrito (Hct), como porcentaje de paquete de glóbulos rojos, se determinó por centrifugación de la sangre total a 3000 rpm durante 5 minutos en tubos capilares heparinizados. La concentración de hemoglobina [Hb] fue medida espectrofotométricamente (540 nm) usando el método de cyanmetahemoglobina de Drabkin. El recuento de glóbulos rojos (RBC) y blancos (WBC) se realizó en cámara de Neubauer diluyendo la muestra de sangre en solución Ringer. Se calculó el índice de concentración corpuscular media de Hemoglobina según Dacie and Lewis (1977) a fin de distinguir variaciones debidas al estrés del manejo de los animales, del causado por los xenobióticos (Primmitt *et al.*, 1986)

La glucosa plasmática, GOT, GPT, actividad de FAc FAI se midieron por espectrofotometría en la fracción sérica con kits de Wiener Laboratorios. El factor de condición e índice hepatosomático se midieron como indicadores no específicos de estrés.

Los datos fueron analizados utilizando el software Statistica, aplicando ANOVA y test *t*.

RESULTADOS

Las concentraciones de hemoglobina de T1 y T2 mostraron diferencias significativas respecto de los controles duplicando el valor de los mismos. La respuesta del hematocrito no mostró variaciones en ninguno de los tres grupos, sin embargo, el índice de concentración corpuscular media de hemoglobina duplica en los tratamientos 1 y 2 a la respuesta de los controles (Figura 1). Los animales expuestos a las descargas de la papelera mostraron un incremento de un 25 a 30 % de glóbulos blancos respecto de los controles, mientras que los hematíes no variaron durante el período del experimento (Tabla 1).

Tabla 1. Hematología y bioquímica sanguínea de *C. facetum* de individuos controles y expuestos a efluentes de papeleras.

	Controles	Tratados 1	Tratados 2
Hematología			
(n)	12	12	12
Hct (L/L)	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.07
Hb (g/dL)	38.02 ± 6.4	62.39 ± 6.2*	58.24 ± 10.8*
WBC 10 ⁹ L	2.6 ± 0.5	3.7 ± 0.4	3.4 ± 0.6
RBC 10 ¹² L	1.1 ± 0.4	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1
Bioquímica sanguínea			
(n)	12	12	12
Glucosa (mg/dL)	62 ± 12	120 ± 24*	112 ± 18*
GOT (U/l)	24 ± 0.1	38 ± 0.1	35 ± 0.2
GPT (U/l)	16 ± 0.2	45 ± 0.2*	35 ± 0.1*
Fac (U/l)	8.5 ± 0.4	10.8 ± 1.3	9.5 ± 0.8
FAI(U/l)	134 ± 8.7	221 ± 6.5 *	186 ± 5.4*

Los datos corresponden al promedio ± desvío estándar. *Test de significancia p < 0.05 respecto de los controles.

La concentración de glucosa sanguínea en cíclidos expuestos en el tratamiento 1 y 2 no mostraron diferencias significativas entre sí duplicando sus valores respecto de los controles. El daño hepático evaluado mostró diferencia significativas a través de las enzimas alanina amino transferasa y fosfatasa alcalina. Como se puede observar en la Tabla 1, ni la actividad de la aspartato amino transferasa ni la de la fosfatasa ácida mostró diferencias significativas en los animales tratados 1 y 2.

En los parámetros analizados con diferencias significativas en los tratamientos 1 y 2 respecto de los controles, no se observaron diferencias entre sí. El factor de condición e índices organosomáticos no mostraron diferencias significativas (valores no tabulados)

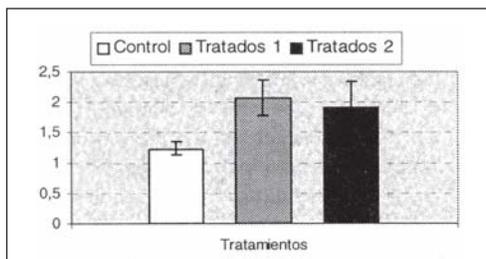


Figura 1. Índice hematimétrico. Concentración corpuscular media de Hemoglobina en *Cichlasoma facetum* expuesto a efluentes de papelería.

DISCUSIÓN

La respuesta del hematocrito analizada concomitantemente con las variaciones observadas en la concentración de hemoglobina a través de la concentración corpuscular media indica un aumento en la síntesis de Hg sin inducción de la eritropoyesis. La respuesta del Hct es comparable a la registrada en catostómidos procedentes de lagos canadiense con altos grados de contaminación por pulpa de papel, contrariamente a lo observado en nuestros ensayos donde se observó un aumento significativo de esta proteína, la [Hb] se vió reducida en un 20% (Kloepper-Sams *et al.*, 1994). El análisis de estas respuestas debe ser cuidadoso ya que el aumento de catecolaminas circulantes producidas por el estrés del manipuleo en la obtención de la muestra resulta en un aumento del volumen eritrocitario, sin un concomitante aumento de la concentración de hemoglobina. Los resultados que se observan en Figura 1 señalan un aumento en la concentración de la hemoglobina eritrocitaria sin aumento de paquete globular. Este incremento de la hemoglobina en los peces del tratamiento 1 y 2 se atribuye a un mecanismo compensatorio de niveles hipóxicos y estaría relacionado con la vía regulatoria de la síntesis del hemo, involucrada con enzimas del citocromo P450 responsables de la primer etapa de detoxificación. Variaciones en la [Hb] han sido señaladas por Gallagher (1998) para distintas especies de teleósteos en condiciones de estrés normóxicas e hipóxicas. En vertebrados inferiores como peces y anfibios, la respuesta subletal a metales como el cobre y el plomo conducen a un aumento del hematocrito y de la concentración de la hemoglobina (Wilson and Taylor, 1993; Perí *et al.*, 1998; Rosenberg *et al.*, 1998).

Algunos indicadores de disfunción metabólica causados por el impacto de efluentes de papel incluyen diferencias significativas en el metabolismo de hidratos de carbono (Anderson, 1988). El aumento de la concentración de glucosa en los peces expuestos (T1 y T2) indican una movilización de la glucosa dado por los estresores químicos en el proceso de detoxificación hepática. Estos datos son comparable a los observados por Jeney *et al.* (1995) en *Rutilus* sp. con exposición aguda a efluentes de papel durante 72 hs. La glucosa al utilizarse en la ruta del ácido glucurónico para detoxificar compuestos podría verse aumentada como respuesta rápida a los requerimientos hepáticos de detoxificación.

El aumento de las concentración de GOT y GPT (T1 y T2) constituyen indicadores específicos de una elevada actividad del hepatocito que al alterar la permeabilidad de la membrana citoplasmática, las transaminasas experimentan un aumento de actividad en sangre periférica. Los requisitos indispensables para una elevación cuantitativamente importante de transaminasas son que el daño sea difuso y agudo.

CONCLUSIONES

La aplicación de biomarcadores ambientales -cambios en parámetros bioquímicos y fisiológicos sensibles- (Klopper-Sams, *op. cit.*) están siendo incluidas cada vez con más rigor en programas de monitoreo de pequeña a gran escala.

En atención a evaluar el uso de estos biomarcadores de estrés hemodinámico y metabólico en especies autóctonas como *C. facetum*, como herramienta diagnóstica a corto plazo, muestran ser consistentes en este estudio puntual. El efecto dilutor de 1: 20, escogido al azar en este diseño, es relevante para este trabajo a fin de diseñar nuevos experimentos con diluciones mayores y hallar factores de respuesta de estos biomarcadores y otros específicos para efluentes de papel como son las enzimas del sistema de oxidasas de función múltiple.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, S. M. 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *Amer. Fish. Soc. Sym.* 8:1-8.
- Adams, S. M., W. D. Crumby, M. S. Greeley Jr, L. R. Shugart and C. F. Saylor. 1992. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: A holistic assesment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 24: 347-360.
- Anderson, T. L., J. H. Forlin and A. Larson. 1988. Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1525-1536.
- Burnison, B. K., P. V. Hodson; D. J. Nuttley and S. Efler. 1996. A Bleached-Kraft miill effluent fraction causing induction of a fish mixed-function oxygenase enzyme. *Environ. Toxicol. And Chem.* 15 (9): 1524-1531.
- Dacie, J. V. and S. M. Lewis. 1977. Practical haematology. New York, Churchill, Livingstone.
- Gallaugher, P. and A. P. Farrel, 1998. Hematocrit and blood oxygen-carrying capacity. *Fish Physiol.* 17: 185-227.
- Jeney, Z., E. T. Valtonen, G. Jeney and E. Jokinen, 1995. Effects of Pulp and Paper Mill Effluent (BKME) on Physiology and Biochemistry of the Roach (*Rutilus rutilus* L.). *Ecotoxicol Environ Saf.* 31(3):228-37.
- Klopper-Sams, P. J., S. M. Swanson, T. Marchant, R. Schryer and J. W. Owens. 1994. Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. I. Biochemical, physiological and pathological assesment of Rocky mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) and longnose sucker (*catostomus catostomus*). *Env. Toxicol. And Chem.* 13(9): 1469-1482.
- Perí, S. I., N. Fink and A. Salibián (1998). Hematological parameters in *Bufo arenarum* injected with sub-lethal lead acetato. *Biomed. Environ. Sci.* 11: 70-74.
- Primmet, D. R. N., D. J. Randall, M. Mazeaud and R. G. Boutilier (1986). The role of catecholamines in erythrocyte pH regulation and oxygen transport in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during exercise. *J. exp. Biol.*, 122: 139-148.
- Rosenberg, C. E., S. I. Perú, M. A. Arrieta, N. E. Fink and A. Salibián. 1998. Red blood cell osmotic fragility in *Bufo arenarum* exposed to lead. *Arch. Physiol. Biochem.* 106: 19-24.
- Wilson R.W. and E.W. Taylor. 1993. Differential responses to copper in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*), during acutely lethal copper exposure. *J. Comp. Physiol.* 163: 239-246.