

# BIOMARCADORES HEPÁTICOS DE LA CARPA (*Cyprinus carpio* L.): RESPUESTAS ANTIOXIDANTES INDUCIDAS POR LA β-NAFTOFLAVONA, UN HIDROCARBURO AROMÁTICO POLICÍCLICO

M. I. ASCAR<sup>1</sup> & F. R. DE LA TORRE<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa Ecofisiología Aplicada, Dpto. Ciencias. Básicas, Universidad Nacional de Luján, C.C. 221, (B6700ZAB) - Luján ; <sup>2</sup>CONICET, email: flatorre@mail.retina.ar

## ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) exert adverse effects in many aquatic organisms and fish among them. β-naphtoflavone (BNF) is a PAH inducer of biotransformation processes that potentially could enhance the production of reactive oxygen species promoting the responses of the cellular antioxidant defences. Hepatic biomarker responses were assessed in juvenile *Cyprinus carpio* injected with a sublethal dose of BNF; catalase (CAT), Superoxid dismutase (SOD), Glutathion S-transferase (GST) activities, the condition factor (FC) and the liver somatic index (IHS) were evaluated. Fish were acclimated to experimental conditions for 1 week (continuous flow potable water: 50 ml/min; 2,5 g fish/L; photoperiod: 12 h L/D; temperature: 22 °C; daily feeding *ad libitum*). At the beginning of the assays experimental fish (BNF) (n=10) were intraperitoneally injected with 50 mg BNF/kg. b. w. dissolved in corn oil; controls (C) (n=10) received corn oil. No fish mortality was observed along the assay. After 48 h, fish were killed, livers excised and FC and IHS index were determined. Then, tissues were homogenized and postmitochondrial fractions were obtained; total protein content, and specific activities of CAT, SOD and GST were determined in this fraction. Statistical differences between groups C and BNF were performed by Student's *t* test ( $p < 0.05$ ). A significant increase of GST (22.8%) and SOD (27.3%) activities were observed in BNF fish, but no differences were detected in CAT suggesting there is an effective capacity of SOD in removing the ( $O_2$ ) of the cellular media; the absence of differences in CAT would indicate that the formed  $H_2O_2$  was only partially catalyzed. No statistical differences were observed in the IHS and FC indexes. These results will also allow considering the use of these valuable environmental bioindicators of this test species in the assessment of the quality of water bodies of the Buenos Aires Province.

**Keywords:** biomarkers of contamination, antioxidant defences, PAHs, *Cyprinus carpio*.

## INTRODUCCIÓN

La contaminación del ambiente generada por compuestos de origen antropogénico es un fenómeno de carácter complejo y es producida tanto por fuentes puntuales como difusas. En las últimas décadas los componentes bióticos y abióticos del medio acuático han sufrido los efectos de un creciente número de xenobióticos sis-

temáticamente vertidos en él. Los centros urbanos, y los industrializados en particular, son generadores de una gran variedad de poluentes orgánicos persistentes (POPs) que alcanzan rápidamente los ambientes acuáticos afectando la integridad biológica de los ecosistemas. Entre ellos se encuentran los compuestos policíclicos aromáticos hidrocarbonados (PAHs), un grupo de poluentes ambientales que contienen

uno o más anillos aromáticos. Aunque existen fuentes naturales de PAHs (por ej., incendios forestales), la contaminación del medio acuático es producida principalmente por fuentes antropogénicas tales como la combustión incompleta de los combustibles fósiles, derrames de petróleo, efluentes industriales, aportes por productos de la madera tratados con creosota (Meador y col., 1995). En el agua, los PAHs tienden a asociarse con el material particulado y finalmente se depositan en los sedimentos que actúan como un reservorio natural de estos contaminantes hidrofóbicos. Un considerable número de este tipo de compuestos ejercen efectos adversos sobre los organismos acuáticos, entre los más estudiados se destacan el benzo(a)pireno, el 3-metilcolantreno (ambos presentes ambientalmente) y la  $\beta$ -naftoflavona, un compuesto modelo de síntesis.

Los mecanismos convencionales de monitoreo ambiental permiten evaluar los niveles de contaminación pero rara vez pueden establecerse vinculaciones entre ellos y el estado de «salud ambiental». En este contexto, el uso de los marcadores biológicos o *biomarcadores* medidos a nivel molecular o celular ha sido propuesto como una herramienta sensible para la «prevención temprana» de los efectos biológicos en la evaluación de la calidad ambiental (McCarthy & Shugart, 1990). Por su parte, los estudios de laboratorio son importantes para la validación de los biomarcadores como métodos para evaluar la condición ecotoxicológica de un ambiente en particular (Mayer y col., 1992). Recientemente el estudio de los biomarcadores adquirió un papel más activo dentro de las evaluaciones ambientales siendo incorporado en varios programas de monitoreo ambiental en Europa y los E.E.U.U aunque aun no lo fue en nuestro país.

Es importante señalar que en el ámbito de la Provincia de Buenos Aires el impacto adverso de la contaminación

antropica producida por los POPs es evidente en diversos cuerpos de agua tanto lóticos como lénticos y fue reportada por diversos autores (por ej. Colombo y col., 1989; Lenardon y col., 1984; Menone y col., 2000). Por sus características de ambiente severamente contaminado merece destacarse a modo de ejemplo a las costas del sur del estuario del Río de la Plata aledañas a los centros urbanos. Estudios realizados en dichas zonas detectaron la presencia de hidrocarburos alifáticos, PAHs, fenilos policlorados, dioxinas, benzofuranos en cantidades notablemente superiores a los límites permitidos por la legislación vigente (ver Colombo y col., 2000).

Una considerable cantidad de poluentes orgánicos presentes en el ambiente acuático, incluidos los PAHs, tienen la capacidad de ser rápidamente incorporados a los tejidos de los organismos y bioacumularse. La biotransformación de estos compuestos lipofílicos en metabolitos más hidrosolubles es un proceso requerido antes de que sean excretados y ocurre principalmente en hígado. Aunque la biotransformación en general es aceptada como un proceso de detoxificación puede involucrar reacciones que producen especies reactivas del oxígeno (EROs) así como metabolitos electrofílicos. Los organismos aeróbicos cuentan con sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos, que actúan a nivel celular previniendo el daño de las EROs a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Dentro de los mecanismos enzimáticos disponibles la acción antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), y la glutatión S-transferasa (GST) es de gran relevancia. Cuando las fuerzas pro-oxidantes sobrepasan a las defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) el estrés oxidativo celular queda establecido. Estos mecanismos antioxidantes enzimáticos celulares fueron utilizados en peces en diversas oca-

siones como potenciales biomarcadores de exposición a hidrocarburos poliaromáticos y a ambientes poluidos (ver van der Oost y col., 2003).

Dentro de los ecosistemas acuáticos los peces ocupan una gran variedad de nichos ecológicos tanto límnicos como marinos y representan diferentes niveles dentro de la trama trófica. Al ser los principales vertebrados acuáticos primarios, merecen especial atención como sistema de monitoreo en la vigilancia de los ecosistemas acuáticos, es por ello que se han convertido en los organismos *test* clásicos (Nagel & Isberner, 1998). La utilización de especies *test* estandarizadas en los ensayos de toxicidad es un enfoque comúnmente adoptado dado que el conocimiento previo de estas especies (biología, fisiología, etc.) facilita a menudo la interpretación de las respuestas de los biomarcadores. En este contexto, la carpa común (*Cyprinus carpio*) es una de las especies *test* estandarizadas que los Organismos Internacionales como la OECD (Organization of Economic Cooperation and Development) recomiendan utilizar en ensayos de toxicidad aguda y

prolongada. Es una especie omnívora asociada al bentos y su presencia en nuestro país como especie exótica fue registrada en diversos ambientes acuáticos, cohabitando con las demás especies de la ictiofauna de la Provincia de Buenos Aires (Lopez y col., 1994).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las respuestas tempranas de tres biomarcadores hepáticos vinculados con las defensas enzimáticas antioxidantes (CAT, SOD y GST) en la carpa común (*C. carpio*) luego de la inyección de una dosis subletal de un PAH modelo, la  $\beta$ -naftoflavona.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Peces

Se utilizaron ejemplares juveniles de *C. carpio* con un peso promedio de  $9,2 \pm 0.1$  g y una longitud total de  $10 \pm 1$  cm (media  $\pm$  Desv. est.). Los peces provinieron de un conocido criadero comercial y no estuvieron previamente expuestos a contaminantes. Los animales luego de ser trasladados al laboratorio permanecieron en observación durante dos semanas bajo condiciones

**Tabla 1.** Parámetros físicoquímicos y microbiológicos del agua de red.

Parámetros evaluados	Unidades	Valores registrados *	MPQ
Turbiedad	NTU	<1	3 <sup>a</sup>
pH		7.84	6.5-8.5 <sup>a</sup>
Alcalinidad (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	mg/L	409	-
Dureza total	mg/L	72	400 <sup>a</sup>
Cloruros (Cl <sup>-</sup> )	mg/L	24	350 <sup>a</sup>
Sulfatos (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	mg/L	14	400 <sup>a</sup>
Nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	mg/L	40	45 <sup>a</sup>
Nitritos (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	mg/L	<0.05	0.06 <sup>b</sup>
Amonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	mg/L	<0.1	1.13 <sup>b</sup>
Cloro residual libre	mg/L	<0.05	0.2 <sup>a</sup>
Arsénico	µg/L	37	40 <sup>b</sup>
Flúor	µg/L	<10	300 <sup>a</sup>
Cadmio	µg/L	<5	2 <sup>b</sup>
Plomo	µg/L	<5	2 <sup>b</sup>
Cromo total	µg/L	<2	2 <sup>b</sup>
Bacterias Coniformes totales	NMP/100ml	<1	3 <sup>a</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Presencia/ausencia	Ausencia	ausencia <sup>a</sup>

\*Los valores que se informan corresponden a los resultados de los análisis efectuados oportunamente en el agua de red que abastece a toda la Universidad; las muestras fueron tomadas de una canilla de la Planta Piloto de la UNLu y se respetaron las técnicas propuestas por APHA (1992). MPQ: Máximas cantidades permitidas según: <sup>a</sup> Ley 19587 de Higiene y Seguridad para agua potable y <sup>b</sup> Ley 24051 para la protección de la vida de agua dulce.

estandarizadas (22 °C; fotoperíodo 12 h de luz/12 h de oscuridad) en tanques de 50 L conectados a un flujo continuo de agua potable de red no clorada. En fecha cercana a la realización del ensayo se caracterizó la composición físico-química y microbiológica del agua de red utilizada, los valores se indican en la Tabla 1. Diariamente los peces recibieron alimento comercial para peces de la siguiente composición: proteína cruda: 47%; fibras: 2%; humedad: 10%; cenizas: 13%.

#### *Diseño Experimental*

Se evaluó el efecto agudo de la intoxicación inducida por inyección de una dosis subletal de  $\beta$ -naftoflavona. Para ello los peces fueron asignados al azar a dos grupos: experimentales (BNF) y control negativo (C); cada grupo estuvo conformado por 10 individuos. El compuesto fue administrado mediante una única inyección intraperitoneal (50 mg/kg peso corporal) disuelto en aceite de maíz; los individuos control recibieron una inyección de aceite de maíz. Luego de 48 h los peces fueron sacrificados.

Al inicio de la preadaptación los peces fueron ubicados en acuarios de vidrio de 20 L conectados a un flujo abierto de agua potable de 50 ml/min que renovó totalmente el medio cada 8 h. Se respetó una densidad de carga de 2,5 g peso corporal/L y los peces recibieron una vez al día alimento *ad libitum*. La temperatura y el fotoperíodo fueron fijadas en  $22 \pm 1$  °C y 12 h luz/12 h oscuridad respectivamente. Los animales se mantuvieron en las condiciones recién descritas durante el periodo del ensayo; por su parte la fase de preadaptación fue de 7 días.

#### *Preparación de las muestras*

Finalizado el periodo experimental, los animales fueron extraídos de los acuarios y anestesiados sumergiéndolos durante 2-3 minutos en agua a punto de congelación. Luego fueron pesados y se registró la longitud total. Los animales fueron sacrificados me-

dante una incisión de la columna vertebral realizada por detrás del opérculo y se colocaron en hielo sobre una placa de vidrio. Se accedió a la cavidad peritoneal, se les extrajo el hepatopáncreas y se almacenó en nitrógeno líquido hasta el momento de su procesado. Posteriormente las muestras fueron retiradas del N<sub>2</sub>, se pesaron en balanza analítica y fueron procesadas de acuerdo a lo indicado por Nilsen y col. (1998). Para ello fueron individualmente homogenizadas en hielo con buffer fosfato pH= 7,4 (0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,15 M KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % v/v glicerol) utilizando un homogenizador vidrio-vidrio hasta obtener la total desintegración del tejido. Los homogenatos obtenidos fueron centrifugados por 15 minutos a 10.000 g a 4 °C, se descartó el pellet obtenido y se separó la fracción postmitocondrial (PMS) para ser usada posteriormente en los distintos análisis bioquímicos.

#### *Medición de índices morfométricos y parámetros bioquímicos*

Se determinaron en cada uno de los animales los siguientes índices morfométricos: el factor de condición corporal (FC) calculado como el [peso corporal (g) / longitud total<sup>3</sup> (cm<sup>3</sup>)] x 100 y el índice hepatosomático (IHS) como el [peso hígado (g)/peso corporal (g)] x 100.

La actividad de la Superóxido dismutasa total fue medida de acuerdo a la técnica empleada por Misra & Fridovich (1972) basada en el grado de inhibición de la autooxidación de la epinefrina y cuantificada por medición de la aparición del epinocromo a 480 nm. Las muestras de PMS fueron incubadas en buffer glicina 50 mM, pH 10,2. La actividad de la SOD se expresó en Unidades/mg de proteínas; donde cada Unidad corresponde a los ml de muestra que inhiben en un 50% la velocidad de formación del epinocromo.

La determinación de la actividad de la glutatión S-transferasa se realizó de acuerdo a lo sugerido por Habig y col.

(1974), utilizando el reactivo 1 cloro 2,4 dinitrobenzenu (CDNB) quien en presencia de glutatión reducido (GSH) forma GS-dinitrobenzenu que absorbe a 340 nm. Las alícuotas de PMS fueron incubadas en un medio conteniendo buffer fosfato 100 mM pH 6,5 y una solución de GSH 10 mM. La actividad enzimática se expresó como nmoles GS-CDNB formados/min/mg proteína.

La actividad de la catalasa fue determinada evaluando la desaparición en el tiempo del  $H_2O_2$  a 240 nm mediante el método modificado de Baudhuin y col. (1964). Las alícuotas de PMS fueron incubadas en un medio conteniendo buffer fosfato 500 mM pH 7,2 y una solución 10 mM de  $H_2O_2$  preparada al momento del ensayo. La actividad de la CAT fue calculada en términos de nmoles de  $H_2O_2$  consumidos/min/mg de proteína.

El contenido de proteínas totales fue estimado utilizando el método de Lowry y col (1951) utilizando el reactivo de Folin y sero-albumina bovina como estándar de referencia. Los resultados se expresaron como mg de proteína/g de tejido fresco.

Se utilizaron reactivos de grado analítico y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Todas las actividades enzimáticas fueron referidas al contenido proteico y fueron evaluadas a 25 °C.

#### *Análisis Estadístico*

Se estudió la normalidad y la homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos mediante el *test* de Kolmogorov-Smirnov y el *test* de Levene respectivamente. Las comparaciones entre los valores experimentales y los de control fueron evaluadas mediante el *test t* de Student ( $p < 0,05$ ) (Zar, 1996).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La exposición de los juveniles de *C. carpio* a  $\beta$ -naftoflavona (50 mg/kg p.c.) por inyección intraperitoneal durante 48 h fue tolerada por los animales y no se observó mortalidad

de los animales ni signos de toxicidad aguda. En ensayos realizados en nuestro laboratorio se comprobó que, bajo las mismas condiciones experimentales, la dosis ensayada no provocó la mortalidad de los organismos *test* aún después de 21 días. La forma de administración de la  $\beta$ -naftoflavona y la dosis ensayada se efectuaron de acuerdo a lo propuesto por Washburn y col. (1996) Cabe destacar que esta metodología de estudio es a menudo adoptada como una de las instancias para evaluar la sensibilidad de los biomarcadores frente a diversos PAHs (Hughes & Gallagher, 2004; Shailaja & D'Silva, 2003; Washburn y col, 1996).

Por su parte, los valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua de red empleada que se indican en la Tabla 1 permitieron confirmar la calidad del agua utilizada en el ensayo. Debe destacarse que los valores aquí reportados son coincidentes con los de evaluaciones previas realizadas en nuestro laboratorio. De esta forma se verificó que los organismos *test* no estuvieron en contacto con otros tóxicos durante el ensayo y que los efectos adversos observados en los biomarcadores pueden ser atribuidos a la exposición al tóxico.

La presencia de los PAHs en el ambiente acuático es de gran preocupación debido a sus propiedades mutagénicas/carcinogénicas. Un ejemplo de ello fue reportado por Henson y col. (2001) quien observó que las concentraciones de PAHs presentes en sedimentos y en tejidos de un bagre bentónico (*Ameriurus nebulosus*) se encuentran estrechamente asociadas con el desarrollo de tumores a nivel hepático. Debe destacarse que el destino de los PAHs y sus efectos adversos dependen principalmente de la activación metabólica llevada a cabo por el sistema de las monoxigenasas citocromo P450 dependientes y las enzimas de conjugación de la fase II. El sistema del citocromo P450 cumple con la biotransformación inicial de los

PAHs dando lugar tanto a metabolitos no tóxicos así como a compuestos promotores del estrés oxidativo y/o carcinogénicos. En este contexto, es importante disponer de información sobre el metabolismo de los mismos para poder evaluar el potencial carcinogénico de estos compuestos hidrocarbonados.

La  $\beta$ -naftoflavona (5,6 benzoflavona) es un compuesto hidrocarbonado de síntesis muy utilizado en los ensayos de toxicidad con peces por sus propiedades inductoras de la CYP1A1, una de las isoenzimas del citocromo P450 frecuentemente utilizada como biomarcador de exposición. Sin embargo, muchos de estos estudios concentran menor atención sobre otras respuestas celulares y fisiológicas relevantes también promovidas por la exposición a este PAH. El presente trabajo aborda este aspecto y reporta el impacto de la  $\beta$ -naftoflavona en algunos índices morfométricos y respuestas enzimáticas antioxidantes de juveniles de *C. carpio*.

Los índices generales pueden ser indicadores de efectos de los tóxicos, en este sentido permiten realizar una primera aproximación para identificar potenciales exposiciones y efectos de los poluentes mediante mediciones relativamente sencillas (Mayer y col., 1992). Numerosos índices de condición basados en relaciones entre la masa corporal y el largo han sido utilizados para evaluar el estado de salud general de los peces. El índice de condición de Fulton (FC) ha sido ampliamente utilizado en la literatura aunque su uso para los fines de comparación está limitado a muestras de peces de similar tamaño. Considerando este aspecto se utilizó este índice en el presente trabajo para evaluar la exposición a  $\beta$ -naftoflavona en juveniles de *C. carpio* de tamaño comparable. Los valores hallados no mostraron diferencias significativas (ver Tabla 2), estos resultados podrían atribuirse a que las respuestas de este parámetro frecuentemente se

manifiestan en eventos mayor duración que los aquí ensayados. En este contexto, cabe destacar que Couture & Rajotte (2003) vincularon valores bajos del FC con la contaminación por metales pesados en estudios de campo prolongados realizados con *Perca flavescens* permitiendo discriminar mediante este índice a los individuos provenientes de lagunas «limpias».

El índice hepatosomático refleja el estado nutricional a corto plazo y las demandas metabólicas energéticas. En los peces el IHS es también sensible al estrés por tóxicos motivado principalmente por el agrandamiento del hígado debido a hiperplasia (aumento en el número de células) e hipertrofia (aumento en el tamaño de las células). Diversos estudios de campo y de laboratorio reportaron, en peces expuestos a PCBs, PAHs, dioxinas, un significativo aumento aunque también la ausencia de cambios del IHS (van der Oost y col., 2003). En nuestro caso la exposición de *C. carpio* a la  $\beta$ -naftoflavona no provocó diferencias significativas en los valores del IHS indicando que este parámetro no permitiría detectar tempranamente los efectos adversos de la exposición al PAH aquí estudiado (ver Tabla 2). Estos resultados fueron similares a los reportados por Washburn y col. (1996) en ejemplares de *Morone saxatilis* inyectados con la misma dosis de  $\beta$ -naftoflavona.

Dentro de las alteraciones reportadas a nivel hepático también se encuentran las producidas en el contenido tisular de proteínas. Reddy y col. (1991) evaluaron en *C. carpio* los efectos adversos producidos por la exposición a concentraciones subletales de malatión y observaron una disminución significativa del contenido de proteínas totales sugiriendo la existencia de una alta actividad hidrolítica de las proteínas.

Al analizar el efecto de la  $\beta$ -naftoflavona en los juveniles de *C. carpio* nuestros resultados mostraron valores

**Tabla 2.** Índices morfométricos y contenido de proteínas totales hepáticas de juveniles de *Cyprinus carpio* expuestos a  $\beta$ -naftoflavona.

Parámetros biológicos	Controles	BNF
Factor de condición	1.15 $\pm$ 0.02 (10)	1.18 $\pm$ 0.02 (10)
Índice hepatosomático	1.63 $\pm$ 0.04 (10)	1.68 $\pm$ 0.06 (10)
Contenido de proteínas hepático (mg /g peso fresco)	125.7 $\pm$ 8.0 (10)	133.6 $\pm$ 7.3 (10)

**BNF**, peces inyectados con una dosis única subletal de  $\beta$ -naftoflavona y mantenidos en agua potable de red; **Controles**, peces inyectados con aceite y mantenidos en agua potable de red.

Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM; número de muestras en paréntesis. Las diferencias significativas respecto a Controles se evaluaron mediante el test *t* de Student ( $p < 0.05$ ) y se indican con asterisco (\*).

similares del contenido de proteínas totales hepáticas a los de controles indicando para las condiciones experimentales ensayadas una ausencia de respuesta de este parámetro frente a este PAH (ver Tabla 2). Esta ausencia de respuesta también fue observada en el contenido de proteínas citosólicas de *M. saxatilis* expuestos a similares condiciones experimentales que las ensayadas en este trabajo (Washburn y col., 1996).

Las actividades enzimáticas antioxidantes hepáticas de peces expuestos a PAHs han mostrado una amplia variedad de respuestas para las distintas enzimas observándose desde incrementos que llegan al doble hasta la ausencia de cambios indicando la existencia de una complejidad de los mecanismos de regulación. Dentro del conjunto de mecanismos antioxidantes disponibles a nivel celular que previenen de la peroxidación lipídica el conjunto de enzimas SOD-CAT constituye el primer sistema de defensa de la toxicidad de las EROs.

Las CAT son enzimas que se encuentran principalmente en peroxisomas y que facilitan la remoción del peróxido de hidrógeno metabolizándolo a oxígeno molecular y agua. En mamíferos se demostró que la proliferación de los peroxisomas es promotora de la inducción de la actividad de

las oxidasas de ácidos grasos generadoras de  $H_2O_2$  y también de las CAT (van der Oost y col., 2003). Los incrementos de actividad de la CAT hepática fueron observados en algunos estudios de laboratorio con peces expuestos a PCBs y sedimentos que contenían PAHs (van der Oost y col., 2003), sin embargo muchos de ellos no pudieron demostrar la existencia de alteraciones importantes de este parámetro. En nuestro caso la exposición de los juveniles de *C. carpio* a  $\beta$ -naftoflavona no provocó un aumento significativo de la actividad de la CAT hepática aunque se observó una ligera tendencia de aumento de dicha actividad (ver Tabla 3). Estos resultados fueron similares a los reportados por Lemaire y col. (1996) quienes no observaron diferencias en la actividad de la CAT de *Limanda limanda* inyectados con  $\beta$ -naftoflavona y con 3-metilcolantreno un PAH.

Las SODs son un grupo de metaloenzimas que catalizan la conversión de aniones superóxidos reactivos ( $O_2^{\cdot-}$ ) para formar agua y peróxido de hidrógeno. Aunque la SOD remueve el ( $O_2^{\cdot-}$ ) del medio celular, el  $H_2O_2$  formado como uno de los productos es otra importante especie reactiva del oxígeno y puede también ser iniciador de la peroxidación lipídica; sin embargo mediante la actividad de las enzimas

**Tabla 3.** Respuestas de las defensas antioxidantes hepáticas de juveniles de *Cyprinus carpio* expuestos a  $\beta$ -naftoflavona.

<b>Parámetros biológicos</b>	<b>Controles</b>	<b>BNF</b>
Catalasa ( $\mu$ moles $H_2O_2$ consumidos/min/mg proteína)	64.7 $\pm$ 4.8 (10)	68.0 $\pm$ 3.9 (10)
Superóxido dismutasa (Unidades SOD/mg de proteína)	3.4 $\pm$ 0.3 (9)	4.3 $\pm$ 0.2 * (10)
Glutación S-transferasa (nmoles GS-DNB formados/min/mg proteína)	136.5 $\pm$ 7.3 (10)	167.6 $\pm$ 10.5 * (10)

Los datos se expresan como medias  $\pm$  ESM; número de muestras en paréntesis. Las diferencias significativas respecto a Controles se evaluaron mediante el *test t* de Student ( $p < 0.05$ ) y se indican con asterisco (\*).

CAT y las peroxidases estas especies reactivas también pueden ser removidas. Diversos estudios de laboratorio reportaron el incremento de la actividad de la SOD hepática, por ejemplo en peces expuestos a paraquat, tetraclorobifenilos y alimentados con comida contaminada con Hexaclorobenceno (ver van der Oost y col., 2003). Nuestros resultados indicaron que la  $\beta$ -naftoflavona provocó un aumento significativo de la actividad de la SOD hepática en los juveniles de *C. carpio* (ver Tabla 3). Este comportamiento también se observó frente a la exposición a diversos metales pesados. En particular, Dimitrova y col. (1994) reportaron el incremento conjunto de las actividades de la SOD y la CAT luego de exponer a *C. carpio* a soluciones conteniendo cinc y plomo. Sin embargo se debe destacar que en el presente estudio la exposición a  $\beta$ -naftoflavona no afectó la actividad de la CAT de *C. carpio* aunque se verificó un aumento de la SOD. Frente a esta situación puede postularse que el aumento de la actividad de la SOD, y por ende el incremento de los niveles de  $H_2O_2$ , pudo haber conducido a un aumento del estrés oxidativo celular ya que la producción de esta especie reactiva no fue compensada con el correspondiente aumento de la CAT. En un contexto ambiental debe destacarse que diversos estudios de campo indicaron que los peces provenientes de áreas poluidas tenían una elevada SOD sugiriendo que esta actividad

podría ser utilizada como una medida de severidad del impacto ambiental (Mayer y col., 1992).

La GST representa una familia de enzimas de la fase II que provee protección celular contra los efectos tóxicos de una variedad de compuestos químicos ambientales. En mamíferos, las isoenzimas citosólicas de la GST comprenden siete familias de genes y son clasificadas en base a la homología de secuencias proteicas. Los mecanismos de detoxificación de las GSTs involucran la conjugación catalítica del sustrato y la reducción oxidante del mismo con glutación reducido (GSH). En la actualidad es escaso el conocimiento acerca de la inducción de la actividad de la GST hepática en peces. Varios estudios reportaron el incremento de la actividad de la GST hacia 1-cloro.2,4-dinitrobenceno (actividad GST-CDNB) luego de la exposición en laboratorio a diversos agentes inductores incluidos los PAHs (van der Oost y col., 2003). En general se observó en estos estudios una modesta inducción (el doble o menor) de la actividad total GST-CDNB bajo estas condiciones experimentales que dependió de la especie *test*. Cabe mencionar que la actividad GST representa una integración de la actividad de múltiples isoformas y que las mismas no siempre pueden ser distinguibles por análisis de la actividad GST-CDNB (Hughes & Gallagher, 2004). Nuestros resultados indicaron que hubo una significativa inducción de la actividad de la GST

total hepática de *C. carpio* luego de la inyección de 50mg/kg p.c. de  $\beta$ -naftoflavona (ver Tabla 3). Por su parte, Washburn y col. (1996) observaron que en *Morone saxatilis* igual dosis de  $\beta$ -naftoflavona solo provocaba una tendencia al aumento de la actividad de la GST pero sin llegar a diferenciarse de controles.

Debe destacarse también que *C. carpio* ya ha sido empleada como especie *test* en diversas ocasiones en el estudio de la calidad de cuerpos de agua de distintos ambientes bonaerenses. Se pueden mencionar, a modo de ejemplo, los estudios realizados por Colombo y col. (2000) reportando procesos de bioacumulación de distintos xenobióticos en peces del río de la Plata; los realizados por de la Torre y col. (1999, 2000) reportando los efectos adversos producidos en distintos biomarcadores de contaminación luego de la exposición de los organismos *test* al agua del río Reconquista.

Por último, debe mencionarse que los biomarcadores de contaminación tienen la potencialidad de actuar como una medida integradora a nivel suborganismo indicando condiciones adversas antes de que se pongan de manifiesto los efectos a nivel poblacional. En este contexto el empleo de los parámetros aquí estudiados como parte de una batería de biomarcadores permitiría disponer de una herramienta útil y relevante que podría ser empleada en el biomonitoreo de ambientes acuáticos contaminados de nuestro país.

## CONCLUSIONES

*C. carpio* demostró ser una especie exótica estandarizada apta para evaluar, mediante biomarcadores de contaminación, la toxicidad de compuestos inductores de estrés oxidativo.

La dosis inyectada de  $\beta$ -naftoflavona promovió en *C. carpio* procesos hepáticos de defensa antioxidante y de biotransformación mediados por la

SOD y por la GST (conjugación). La  $\beta$ -naftoflavona no indujo en CAT una respuesta antioxidante significativamente diferente a la basal de los controles

En nuestras condiciones experimentales los índices morfométricos utilizados (FC y IHS) y el contenido de proteínas hepáticas no permitieron discriminar entre individuos expuestos y los controles.

Estos resultados preliminares sugieren que *C. carpio* es una especie susceptible de ser empleada como organismo prueba en programas de monitoreo ecotoxicológico acuático en especial en ambientes afectados por poluentes del tipo de los PAHs.

## AGRADECIMIENTOS

Se contó con el apoyo económico de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2002 N° 11225) y del Dpto. Cs. Básicas de la UNLu.

## BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association** (APHA), American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater 18th Ed., Washington DC.
- Baudhuin, P.; H. Beaufy; Y. Rahman-Li; O.Z. Sellinger; R. Wattiaux; P. Jacques & C. De Duve.** 1964. Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, alanine aminotransferase, d-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochem. J.* 92: 179-184.
- Colombo, J. C.; E. Pelletier; C. Brochu; M. Khalil & J. A. Catoggio.** 1989. Determination of Hydrocarbons sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.* 23, 888-894.
- Colombo, J. C.; C. Bilos; M. Remes Lenicov; D. Colautti; P. Landoni & C. Brochu.** 2000. Detritivorous fish contamination in the Río de la Plata estuary: a critical accumulation pathway in the cycle of anthropogenic compounds. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57: 1139-1150.
- Couture, P. & J.W. Rajotte.** 2003. Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (*Perca*

- flavescens*) form Sudbury, Ontario: A review. *J. Environ. Monit.* 5: 216-221.
- De la Torre, F.R.; L. Ferrari & A. Salibián.** 1999. Enzyme activities as biomarkers of freshwater pollution: responses of fish branchial (Na+K)-ATPase and liver transaminases. *Environmental Toxicology* 14: 313-319.
- De la Torre, F.R.; L. Ferrari & A. Salibián.** 2000. Long-term in situ water toxicity bioassays in the Reconquista river (Argentina) with *Cyprinus carpio* as sentinel organism. *Water Air and Soil Pollution* 121: 205-215.
- Dimitrova, M.S.T.; V. Tsinova & V. Velcheva.** 1994. Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108C: 43-46.
- Habig, W. H.; M. Pabst & W. B. Jakoby.** 1974. Glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- Henson, K. L.; G. Stauffer & E. Gallagher.** 2001. Induction of Glutathione S-transferase Activity and Protein expression in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) liver by ethoxyquin. *Toxicol. Sciences* 62: 54-60.
- Hughes, E. M. & E. P. Gallagher.** 2004. Effects of  $\beta$ -naphthoflavone on hepatic biotransformation and glutathione biosynthesis in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Mar. Environ. Res.* 58: 675-679.
- Lemaire, P.; L. Forlin & D. Livingstone.** 1996. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A-inducers (3-methylcholanthrene,  $\beta$ -naphthoflavone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 36, 141-160.
- Lenardon, A. M.; M. I. M. De Hevia; J. A. Fuse; C. B. De Nochetto & P. J. Depetris.** 1984. Organochlorine and organophosphorous pesticides in the Paraná river (Argentina). *Sci. Tot. Environ.* 34: 289-297.
- López, H. L.; R.C. Menni y L.C. Protogino.** 1994. Bibliografía de los peces de agua dulce de Argentina. Suplemento 1993. Situación Ambiental de la Provincia de Buenos Aires, año IV-N° 26: 1-20.
- Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough; A. L. Farr & R. J. Randall.** 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mayer, F. L.; D. J. Versteeg; M. J. McKee; L. C. Folmar; R. L. Graney; D. C. McCume & B. A. Rattner.** 1992. Physiological and non-specific biomarkers. En: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle, P.M. & Bergman, H.L. (Eds.): *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic stress.* Lewis Publishers, 5-85.
- McCarthy, J. F. & L. R. Shugart.** 1990. Biological markers of environmental contamination. En: McCarthy, J.F. & L.R. Shugart, (Eds.): *Biomarkers of environmental contamination,* Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 3-14.
- Meador, J. P.; J. E. Stein; W. L. Reichert & U. Varanasi.** 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 143: 79-165.
- Menone, M. L.; J. E. Aizpun de Moreno; V. J. Moreno; A. L. Lanfranchi; T. L. Metcalfe & C. D. Metcalfe.** 2000. PCBs and organochlorines in tissues of silver-side (*Odontesthes bonariensis*) from a coastal lagoon in Argentina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38:202-208.
- Misra, H. P. & I. Fridovich.** 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a single assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3174.
- Nagel, R. & K. Isberner.** 1998. Testing of chemicals with fish a critical evaluation of tests with special regard to zebrafish. En: Braunbeck, D.E.; D.E. Hinton & B. Streit, (Eds.): *Fish Ecotoxicology,* Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, 337-342.
- Nilsen, B. M.; K. Berg & A. Goksoyr.** 1998. Induction of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish. A biomarker of environmental pollution. En: Phillip, I. R. y E. A. Shephard, (Eds). *Methods in Molecular Biology,* Vol 107: Cytochrome P450 Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 423-438.
- Reddy, P. M. & G. H. Philip.** 1991. Hepato Toxicity of malathion on the protein metabolism in *Cyprinus carpio*. *Acta Hydrochim. hydrobiol.* 19: 127-130.
- Shailaja, M. S. & C. D'Silva.** 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53: 835-841.
- van der Oost, R.; J. Beyer & N.P.E. Vermeulen.** 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57-149.
- Washburn, B.S.; C.A. Vines; D.G. Baden; D.E. Hinton & P.J. Walsh.** 1996. Differential effect of brevetoxin and  $\beta$ -naphthoflavone on xenobiotic metabolizing enzymes in striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquat. Toxicol.* 35:1-10.
- Zar, J. H.** 1996. *Biostatistical Analysis,* Prentice Hall, N.J., 662 p.