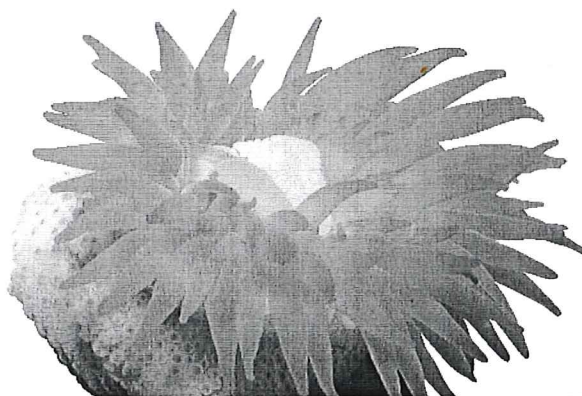


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



BIOTRANSFORMACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN LA ANÉMONA *Anthopleura elegantissima*



**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANÓLOGO**

Presenta

Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

ENSENADA, B. C., AGOSTO DE 2002

RESUMEN

Se evaluó la capacidad de la anémona *Anthopleura elegantissima* para biotransformar hidrocarburos policíclicos aromáticos, mediante la medición de la actividad de la enzima NADPH citocromo C reductasa en tres fracciones subcelulares: nuclear, mitocondrial y microsomal. Se realizó un bioensayo de toxicidad en el que se usaron cinco grupos de 10 organismos; cada grupo se nombró de acuerdo a la concentración de benzo(a)pireno a la que se expuso a los organismos: 2 mM (G2), 4 mM (G4) y 6 mM (G6). Además, se formó un grupo control (GC) que fue tratado con agua de mar natural filtrada y tratada con luz UV; y un grupo expuesto al solvente puro (GS). Cada organismo fue inyectado con 100 μ l de la solución correspondiente e inmediatamente colocado en agua de mar natural con aireación constante durante 72 horas. Posteriormente se prepararon fracciones subcelulares (nuclear, mitocondrial y microsomal) a partir de tejido columnar de cada anémona. En cada fracción se determinó la actividad de la enzima NADPH citocromo C reductasa. La actividad encontrada fue desde $1.00 \pm 0.142 \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ hasta $8.9 \pm 8.91 \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ hallándose los valores más bajos en la fracción nuclear y los más altos en la fracción mitocondrial. En ninguna de las fracciones se observaron diferencias significativas entre el efecto sobre la enzima ocasionado por el agua de mar y el efecto inducido por el solvente ($\alpha = 0.05$), por lo que se deduce que la actividad enzimática en los organismos expuestos no está influenciada por el solvente. De las tres fracciones estudiadas, sólo la microsomal mostró una clara correlación entre la concentración de B(a)P y la actividad de la NADPH citocromo C reductasa ($r = 0.961$), por lo que se considera que esta fracción puede ser útil para la aplicación de esta enzima como biomarcador. Se concluye que *Anthopleura elegantissima* es capaz de biotransformar hidrocarburos policíclicos aromáticos.

BIOTRANSFORMACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS

AROMÁTICOS EN LA ANÉMOMA *Anthopleura elegantissima*

TESIS

QUE PRESENTA

CLAUDIA MARIANA GÓMEZ GUTIÉRREZ

APROBADA POR :



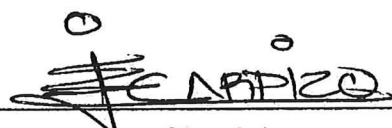
Directora de Tesis

M. C. Graciela Guerra Rivas



Sinodal

Dr. Jorge de la Rosa Vélez



Sinodal

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte

A mi madre.....

Busque palabras y no las encontré....

Pero sé que esto completa uno más de los sueños que dejaste aquí..

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis **M. C. Graciela Guerra Rivas**, por ser esa guía que me acompañó en este vuelo, compartiendo todo ese conocimiento que todavía me sorprende cómo guarda en su cerebro....y por tantas cosas.....Gracias

A mi abuela, por esa fortaleza que sin proponerse me contagió para seguir caminando.

A mi hermana, por estar ahí para hacerme reír, gritar, llorar, rabiar y todas esas emociones que sólo una hermana puede provocar.

A los mueganitos (Eli, Isma, Meli y Krista), por todas las risas y momentos que hemos vivido y sobre todo por ser esa voz tras el teléfono que me recuerda que siempre estarán ahí.

A César, por todas las cosas que hizo y sigue haciendo para ayudar a la familia.

A mi mejor amiga Graciela Guerra, por las pláticas eternas, el apoyo incondicional, por aparecer en mi vida y compartir las cosas de todos los días.

A mis socias, Kim y Cris, por los momentos compartidos que forman parte de eso que no se olvida y se atesora para siempre.

A Ricardo y Vero, por esas dos etapas de amistad y a los que estuvieron ahí y me tendieron la mano en los momentos difíciles, Lizz, Miriam y Silvia.....Mil Gracias...

A los chaparros, Cluster, Floppy y Kiwi por esa paciencia y amor incondicional que con ese movimiento tan peculiar de colita me expresan

A Grafik, por el diseño y color que personalizan esta tesis.

ÍNDICE

Página

1.0.	INTRODUCCIÓN	1
2.0.	ANTECEDENTES	12
3.0.	OBJETIVO	16
4.0.	METODOLOGÍA	16
4.1.	Localización del área de colecta	17
4.2.	Colecta y mantenimiento de organismos	18
4.3.	Pruebas de solubilidad del tóxico	19
4.4.	Bioensayo	20
4.4.1	Exposición al hidrocarburo	20
4.4.2	Preparación de fracciones celulares	23
4.4.2.1	Nuclear y mitocondrial	23
4.4.2.2	Microsomal	23
4.5.	Ensayo enzimático	24
4.6.	Determinación de proteínas	25
4.7.	Evaluación del hidrocarburo residual	25
4.8.	Análisis estadístico	26

5.0.	RESULTADOS	28
5.1.	Tamaño y peso de los cinco grupos experimentales	28
5.2.	Benzo(a)pireno residual en los frascos de exposición	29
5.3.	Actividad de la NADPH citocromo C reductasa en tres Fracciones subcelulares	31
6.0.	DISCUSIÓN	36
7.0.	CONCLUSIONES	46
8.0.	BIBLIOGRAFÍA	48

LISTA DE TABLAS

Página

- Tabla I.- Pesos y tallas promedio (\pm d.s.) de especímenes de *Anthopleura elegantissima* para los cinco grupos experimentales utilizados en el bioensayo realizado en este trabajo. En todos los casos, el número de organismos por grupo fue de 10. Se muestran las sustancias y las concentraciones a las que cada grupo fue expuesto.
B(a)P = Benzo (a) pireno. Solvente = Acetonitrilo
- Tabla II.- Actividad (\pm d.s.) de la NADPH citocromo C reductasa en tres fracciones subcelulares de especímenes de *Anthopleura elegantissima* sometidos a diferentes tratamientos durante 72 horas. En todos los casos, el número de organismos por grupo fue de 10. Se muestran las sustancias y las concentraciones a las que cada grupo fue expuesto.
B(a)P = Benzo (a) pireno. Solvente = Acetonitrilo. La actividad se expresa en nanomoles de citocromo C reducido por minuto por miligramo de proteína.

LISTA DE FIGURAS

Página

- Fig. 1.- Reacciones del transporte electrónico microsomal involucradas en el metabolismo de benzo(a)pireno. (Tomado de Omura, 1964) 8
- Fig. 2.- Localización del área de colecta. 17
- Fig. 3.- Diagrama esquemático de *Anthopleura elegantissima*. Se muestra la base de la corona, cuyo diámetro se utilizó para evaluar talla. 18
- Fig. 4a.- Distribución de los organismos utilizados en el bioensayo. En la parte superior se muestra el grupo GC, que fue inyectado con agua de mar; en la parte inferior se observa el grupo GS, al que se le administró solvente (acetónitrilo). Ambos grupos fueron usados como controles. 21
- Fig. 4b.- Distribución de los organismos utilizados en el bioensayo, durante el período de exposición a soluciones de benzo(a)pireno de diferentes concentraciones. En la parte superior se muestra el grupo G2, tratado con una solución 2 mM; en la parte media el grupo G4, sometido a una solución 4 mM y en la parte inferior el grupo G6, expuesto a una solución 6 mM. 21
- Fig. 5.- Administración de 100 microlitros de la solución correspondiente a cada individuo de *A. elegantissima*. En todos los casos se inyectó en la zona columnar del organismo. 22
- Fig. 6.- Corte del tejido columnar después de finalizar las 72 horas de exposición a la solución correspondiente. 22
- Fig. 7.- Relación entre peso y diámetro de los 50 organismos de *Anthopleura elegantissima* utilizados en los cinco grupos experimentales del bioensayo. 29

- Fig. 8.- Espectros de absorción de extractos del agua de mar en la que fueron colocados especímenes de *Anthopleura elegantissima* tratados con benzo (a) pireno durante la prueba de toxicidad de este trabajo. Los extractos fueron obtenidos después de remover a los organismos, tratando el agua de los recipientes con diclorometano. La absorbancia de esta fracción orgánica se midió en el intervalo de 200 a 400 nm para evaluar la posible expulsión de benzo (a) pireno, B(a)P, por los organismos. Las concentraciones que aparecen en el recuadro indican la concentración de benzopireno que se aplicó a cada individuo, lo cual se realizó por quintuplicado. Cada espectro corresponde a un recipiente a excepción del espectro B(a)P, que es una solución 56 μ M de este compuesto. 30
- Fig. 9.- Actividad de NADPH citocromo C reductasa en tres fracciones subcelulares de *Anthopleura elegantissima*. Las abreviaturas se refieren a los grupos de organismos a los que se aplicaron diferentes tratamientos, los cuales consistieron en administrar 100 μ L de cada uno de los siguientes: GC, agua de mar; GS, acetonitrilo; G2, solución 2 mM de benzo (a) pireno; G4, solución 4 mM de benzo (a) pireno; G6, solución 6 mM de benzo (a) pireno. El benzo (a) pireno fue administrado en soluciones preparadas en acetonitrilo. Las actividades enzimáticas se expresan en nanomoles de citocromo C reducido por minuto por miligramo de proteína. 33
- Fig. 10.- Relación entre el incremento de la concentración del benzo (a) pireno y la actividad de la NADPH citocromo C reductasa en las fracciones microsomales obtenidas de *Anthopleura elegantissima*. La actividad enzimática se expresa en nanomoles de citocromo C reducido por minuto por miligramo de proteína. 35

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las actividades humanas repercuten en el ambiente. En particular, este impacto es trascendente en los ecosistemas marinos, ya que las descargas tanto domésticas como industriales contienen desechos que tarde o temprano llegan al océano. Estos desechos son impactantes porque contienen compuestos tóxicos conocidos como agentes xenobióticos, los cuales pueden encontrarse en la columna de agua, en el sedimento e incluso acumulados en los organismos; su ubicación está en función de las propiedades fisico-químicas del contaminante.

La identificación de cualquier agente xenobiótico en un organismo marino es útil porque indica la presencia de este compuesto en el ecosistema; sin embargo, es una herramienta insuficiente para evaluar los efectos de éstos sobre los individuos que son expuestos. Para poder realizar el diagnóstico tanto a escala individual como poblacional, se recurre a los biomarcadores como medidas de la presencia o efecto de las sustancias químicas en los organismos que habitan ambientes contaminados.

Los biomarcadores son variaciones o indicadores fisiológicos, histológicos o bioquímicos inducidos en un organismo por agentes químicos ajenos al organismo o sistema biológico. Estas variaciones pueden ser detectadas en tejidos, morfología, funciones bioquímicas, etc. dependiendo del organismo que se trate (Rand y Petrocelli, 1985). Se han establecido diferentes tipos de biomarcadores, entre los que se incluyen los cambios en la función de ciertas enzimas, los productos metabólicos derivados de las sustancias tóxicas o las rutas bioquímicas afectadas por éstas, y los cambios patológicos ocurridos en los tejidos de los organismos expuestos (Hahn, 1999). La elección de cualquiera de estos biomarcadores como indicadores de daño está en función del compuesto de que se trate, ya que no todas los agentes xenobióticos actúan de la misma forma dentro de los organismos.

Actualmente los biomarcadores son utilizados como una herramienta de gran importancia para realizar monitoreos ambientales ya que los organismos del área pueden ser analizados y comparados con biomarcadores que se consideran controles. Éstos son establecidos mediante pruebas de toxicidad o de exposición a sustancias tóxicas, ya que algunas respuestas que son utilizadas como biomarcadores son enzimas o metabolitos que se alteran al exponer el organismo al agente xenobiótico. Aunado a esto, los biomarcadores sirven también en estudios de prospección, en los cuales se establece la toxicidad de compuestos químicos mediante bioensayos (Hahn, 1999).

En la identificación de biomarcadores potenciales hay algunos factores que deben ser investigados. Primero, la correlación entre el contaminante y la respuesta del biomarcador. Segundo, la correlación entre la respuesta y los efectos a escala individual y poblacional. Tercero, la facilidad para evaluar el efecto, y cuarto, la especificidad de la respuesta, ya que algunos biomarcadores sólo responden a un xenobiótico en particular, mientras que otros indican la presencia de una familia de compuestos (Rees, 1993). Algunos otros factores no menos importantes a considerar son: la sensibilidad del biomarcador y la especificidad biológica, que si bien no está muy estudiada, debe formar parte del estudio completo de un biomarcador ya que algunos de éstos sólo se presentan en determinadas especies.

Actualmente los biomarcadores son necesarios para evaluar la salud y condición de un ecosistema debido a la información que éstos pueden aportar dentro de un estudio de monitoreo ambiental (Stegeman *et al.*, 1992). Los biomarcadores pueden ser utilizados para realizar cribados, como herramientas de diagnóstico, como un parámetro dentro de un análisis o como marcadores de predicción (indicadores de riesgo). Su uso está en función de los objetivos que se pretendan alcanzar con el monitoreo ambiental.

En la realización de cribados, el biomarcador puede ser utilizado como una primera medición para establecer la presencia o efectos de contaminantes

en los organismos. Los biomarcadores que se utilizan para el cribado pueden ser solamente marcadores de exposición (específicos para ciertos xenobióticos) o marcadores de toxicidad. Su función es la de propiciar investigaciones que establezcan si este biomarcador puede ser utilizado para diagnosticar la condición de una población o un ecosistema (den Besten, 1998).

El término diagnóstico se refiere a la aplicación de una serie de biomarcadores que puedan señalar la causa de los efectos observados en una población de organismos en el campo. En este contexto, los biomarcadores son utilizados para determinar si el organismo se encuentra fisiológicamente bien. En este caso, es necesario determinar el punto de partida en el cual el organismo se encuentra en buenas condiciones de salud. De esta forma, los biomarcadores pueden ser utilizados como una señal de alarma temprana (Depledge y Fossi, 1994).

Los biomarcadores que se estudian en la actualidad son aquéllos que responden a compuestos altamente tóxicos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's por sus siglas en inglés, polynuclear aromatic hydrocarbons), los hidrocarburos halogenados, metales pesados y solventes, entre otros. En el medio acuático, las sustancias de mayor interés son los hidrocarburos policíclicos aromáticos halogenados (HPAH's por sus siglas en inglés, halogenated polyaromatic hydrocarbons) y los PAH's. Los primeros incluyen

compuestos como los bifenilos policlorados (PCB's), dibenzo-p-dioxinas, y dibenzofuranos, mientras que en el grupo de los PAH's se encuentran derivados del petróleo como el benzo(a)pireno, pireno, fenantreno, naftaleno y fluoranteno, productos de la combustión incompleta de la gasolina y el aceite diesel (Leaver, 1996).

Los PAH's forman parte de las sustancias más nocivas para los organismos, ya que, si bien no son tan persistentes en el medio como los HPAH's, se sabe que son agentes mutagénicos y cancerígenos (Leaver, 1996). Se caracterizan por sus anillos bencénicos constituidos por carbono e hidrógeno, su peso molecular oscila entre 128.16 y 300.36, y se ha encontrado que tienen menor solubilidad a medida que el peso molecular aumenta (Rand y Petrocelli, 1985). La Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés Environmental Protection Agency), ha establecido 16 PAH's como contaminantes altamente tóxicos, entre los que se encuentra el benzo(a)pireno (Fent y Bättscher, 2000).

Una vez que los PAH's son introducidos al medio, son adsorbidos por el material particulado ya sea orgánico o inorgánico, el que al ser depositado en el suelo marino lleva consigo al hidrocarburo. De esta forma, gran parte del contaminante es retirado de la columna de agua. Las sustancias xenobióticas que permanecen en la columna de agua son acumuladas por algunos

organismos, como crustáceos (James, 1989), balanos (Stegeman y Kaplan, 1981), peces (Stegeman *et al.*, 1979) y mejillones (Pruell *et al.*, 1986), entre otros.

Al igual que en los mamíferos terrestres, se ha encontrado que algunos organismos marinos poseen enzimas capaces de biotransformar agentes xenobióticos. La función principal de estas enzimas es la de convertir las sustancias hidrofóbicas liposolubles en metabolitos solubles en agua para facilitar su excreción. Las enzimas que participan en la fase I de esta biotransformación introducen o modifican grupos funcionales (-OH, -COOH, -NO₂, etc.) del xenobiótico para convertirlo en un derivado más polar. En la fase II, otro grupo de enzimas se encarga de agregarle grupos polares (sulfato, aminoácidos, etc.) a estos derivados. La biotransformación afecta el tiempo de residencia y la toxicidad del xenobiótico en el organismo (Livingstone, 1998).

Uno de los sistemas responsables de la biotransformación de las sustancias xenobióticas en la fase I es la llamada oxidasa de función mixta (MFO por sus siglas en inglés mixed function oxidase). Esta oxidasa es un complejo enzimático acoplado a un sistema de transporte de electrones denominado P450, el cual está constituido por dos enzimas, el citocromo P450 y una flavoproteína, la NADPH citocromo reductasa, enzima conocida también

como NADPH citocromo C reductasa dado que el aceptor de electrones puede ser el citocromo c (Peakall, 1992).

El citocromo P450 es una hemoproteína que sirve como oxidasa terminal de las oxidaciones de función mixta; se induce en presencia de diferentes sustratos, lo que al parecer propicia formas de citocromo con diferentes masas moleculares y especificidades distintas hacia el sustrato, así como características inmunoquímicas y espectrales distintas. Una de estas formas es la CYP1A1 (citocromo P450 1A1, citocromo P₁450 o P448), la cual es inducida por los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's) (Katzung, 1999).

El P450 dependiente de la MFO es el sistema de enzimas que se estudia en la mayoría de los casos para observar si es que la MFO se encuentra presente en los organismos. En este sistema, el citocromo P450 oxidado (Fe^{+3}) se combina con el xenobiótico (sustrato) para formar un complejo binario. El NADPH dona un electrón a la NADPH citocromo C reductasa, la cual a su vez reduce el complejo oxidado de citocromo P450 – tóxico (Fe^{+2}). Entonces se introduce otro electrón del NADPH a través de la misma NADPH citocromo C reductasa, lo que permite reducir el oxígeno molecular y formar un complejo con el oxígeno y el citocromo P450-tóxico. Este transfiere el oxígeno al tóxico para oxidarlo y así facilitar su eliminación (fig. 1) (Omura *et al.*, 1964).

El P450 y todas las enzimas relacionadas son inducidas en presencia de sustancias tóxicas; por lo que los cambios relacionados en la función catalítica de estas enzimas (citocromo P450, NADPH citocromo C reductasa) pueden ser utilizados como biomarcadores.

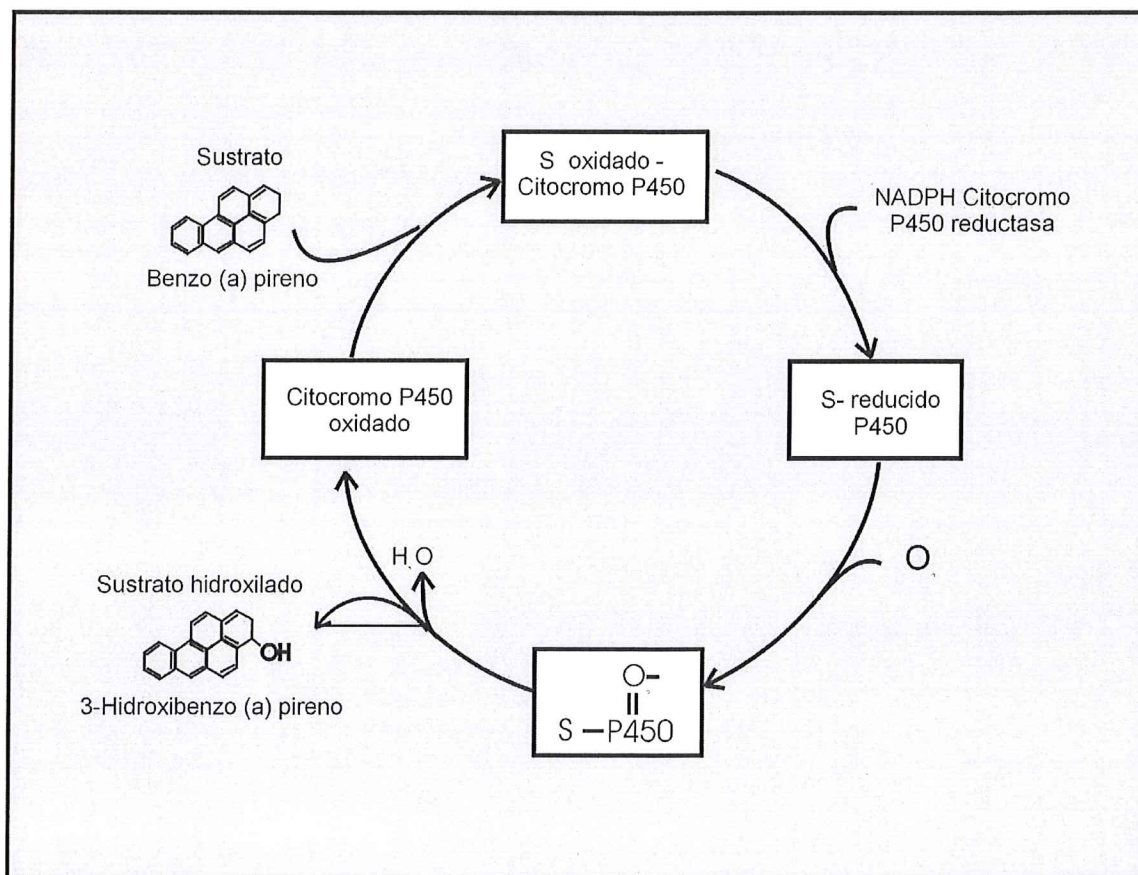


Fig. 1.- Reacciones del transporte electrónico microsomal involucradas en el metabolismo de benzo (a) pireno. (Tomado de Omura, 1964)

Uno de los hidrocarburos más estudiados es el benzo(a)pireno, B(a)P, ya que está comprobado que éste es potencialmente cancerígeno (Heidelberger,

1976). La B(a)P hidroxilasa forma parte de la biotransformación de este xenobiótico en los organismos expuestos, su función principal es la de oxidar el B(a)P generando principalmente tres clases de compuestos: dihidrodioles, quinonas y fenoles, cuyos intermediarios forman macromoléculas celulares que dan lugar a aductos cancerígenos (Michel *et al.*, 1992). Debido a la importancia de identificar estos xenobióticos en organismos marinos se han establecido algunos biomarcadores tales como la actividad de enzimas relacionadas con la biotransformación del B(a)P, de las cuales las más utilizadas son NADPH citocromo C reductasa y B(a)P hidroxilasa.

Para que un biomarcador pueda ser implementado en estudios de monitoreo ambiental es necesario que éste pueda ser identificado y estudiado en organismos cuyas características permitan su manejo en el laboratorio, con la finalidad de establecer controles mediante pruebas de toxicidad. De acuerdo con Landis y Yu (1995), la elección de un organismo de prueba debe tomar en cuenta las siguientes características:

1. Los organismos deben ser sensibles a la sustancia que se pretende identificar.
2. La abundancia del organismo debe ser suficiente para ser representativa en el área que se pretenda estudiar.

3. El organismo debe estar disponible durante todas las estaciones del año.
4. El organismo debe ser de importancia económica y ecológica.
5. El organismo de prueba debe ser manejable en el laboratorio, por lo que son preferibles organismos pequeños con poca o nula movilidad.
6. El organismo tiene que poder ser mantenido en el laboratorio durante el tiempo que dure el experimento, por lo que es necesario que se conozcan las características del organismo tales como tipo de alimentación, temperatura y salinidad óptimas y ciclo de vida, entre otras.

Los cnidarios son organismos marinos cuya distribución abarca la mayoría de los habitats desde las zonas tropicales hasta el ártico y desde la zona intermareal hasta la zona pelágica. El phylum contiene más de 10 000 especies y se divide en tres clases : Hydrozoa (hydra), Scyphozoa (medusas) y Anthozoa (anémonas, corales). Son organismos primitivos, carentes de órganos especializados ya que sólo evolucionaron hasta la formación de tejidos (Campbell, 1993). Estos organismos se componen básicamente de un saco digestivo rodeado de una red nerviosa, una región gonadal, una región muscular delgada, y una pared de protección. Se caracterizan por contener células especializadas en los tentáculos llamadas nematocistos.

Anthopleura elegantissima (phylum Cnidaria, clase Anthozoa, subclase Zoantharia, orden Actiniatia, familia Actiniidae) es abundante principalmente en las zonas rocosas y pozas de marea. Es una especie característica de la zona intermareal de la región comprendida entre Alaska y Baja California; se puede encontrar en grupos o en forma solitaria (Smith and Carlton, 1975). El diámetro de su columna no excede de 6 cm, lo que la diferencia de *Anthopleura xanthogrammica* cuyo diámetro puede alcanzar hasta los 30 cm (Salinas, 2000).

2. ANTECEDENTES

La actividad de MFO ha sido encontrada en mamíferos, aves, peces e insectos. Son pocos los estudios que se han realizado para determinar la presencia o ausencia de este complejo en los invertebrados marinos (Lee, 1981). Hasta el momento, se ha reportado la presencia de la MFO en 18 especies de invertebrados marinos pertenecientes a 6 phyla: Annelida, Arthropoda, Echinodermata, Mollusca, Cnidaria y Porifera (Fries y Lee, 1984; den Besten et al., 1990,1993,1994, 2001; Anderson, 1978; Livingstone et al., 1988; Gassman y Kennedy, 1992). Para algunas de estas especies se ha demostrado que la MFO puede ser estimulada o inducida por contaminantes orgánicos (Lee et al., 1981).

La actividad de la MFO puede ser identificada en las fracciones subcelulares de los tejidos animales. Muchas de estas enzimas se localizan en las membranas lipofílicas del retículo endoplásmico del hígado y otros tejidos. Cuando estas membranas laminares se aíslan por homogenización y fragmentación de la célula, vuelven a formar vesículas denominadas microsomas. Los microsomas retienen la mayor parte de las características morfológicas y funcionales de las membranas intactas, como la rugosidad del

retículo endoplásmico rugoso (que contiene ribosomas) y la lisura de la superficie del retículo liso (sin ribosomas). En particular, los microsomas lisos contienen la clase de enzimas conocidas como oxidasas de función mixta (MFO) o monooxigenasas (Katzung, 1999). Por esta razón, la mayoría de las investigaciones sobre la MFO de los organismos se enfoca principalmente sobre los microsomas. Sin embargo, esto no significa que la actividad de la MFO sea exclusiva de esta fracción ya que se ha reportado actividad en el núcleo y mitocondrias de algunos organismos (Stegeman, 1979).

Es poco lo que se conoce sobre la actividad de la MFO en los cnidarios. De hecho, la presencia de este sistema enzimático en el phylum ha sido recientemente establecida en cinco especies de anémonas marinas y en una especie de coral (Heffernan y Winston, 1998). Los estudios que se han realizado en anémonas en el campo de la ecotoxicología se enfocan principalmente a la biotransformación del B(a)P. La presencia de la MFO ha sido identificada en *Hydra littoralis*, organismo en el cual se comprobó la epoxidación *in vivo* del aldrin, presumiblemente debido a la actividad de la MFO (Khan *et al.*, 1972). En la clase anthozoa, el metabolismo *in vitro* del B(a)P se detectó en la anémona *Bunodosoma cavernata* (Winston *et al.*, 1998), y en el coral *Favia fragum* (Gassman y Kennedy, 1992). En esta especie Gassman y Kennedy (1992) encontraron diferencias en la actividad de la benzo(a)pireno hidroxilasa de corales colectados en diferentes zonas de la costa de Florida. La

actividad de esta enzima fue mayor en corales colectados en zonas contaminadas que en zonas menos impactadas.

La presencia de proteínas con epítopes similares al citocromo P450 identificado en la trucha y proteínas con pesos moleculares similares al P450 (≈ 50 kDa) fue comprobada por Heffernan *et al.* (1996) en cinco especies de anémonas (*Anthopleura elegantissima*, *Aiptasia pallida*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Bunodosoma cavernata* y *Condylactis gigantea*). En su estudio, estos autores también detectaron actividad de la NADPH citocromo C reductasa en las cinco especies de anémonas. Esto sugiere que la MFO se encuentra presente en estas especies y, por lo tanto, su actividad puede inducirse mediante sustancias químicas o agentes xenobióticos. Winston *et al.* (1998) demostraron la presencia de la MFO en la anémona marina *Bunodosoma cavernata*, basándose en la producción de metabolitos oxidados del benzo(a)pireno como el 3-OH-B(a)P, y diversas 1,6-B(a)P dionas, entre otros. La identificación de estos compuestos es consistente con la actividad del P450, cuya función principal es la de aumentar la polaridad de los compuestos para facilitar su eliminación.

Ninguna de las investigaciones que se han llevado a cabo con anémonas se ha realizado *in vivo*. Tanto Heffernan (1996) como Winston (1998) realizaron sus determinaciones en microsomas incubados con el tóxico. Los resultados

que obtuvieron, si bien permiten establecer la presencia de la MFO en anémonas, no son suficientes para la selección de estos organismos en programas de monitoreo ambiental ya que para que un organismo pueda ser establecido como un bioindicador, es necesario que se lleve a cabo un estudio completo del impacto que tienen los agentes xenobióticos sobre el organismo intacto, debido a los procesos de absorción y distribución que sufre una sustancia al ser introducida y procesada por todos los órganos.

Los estudios *in vivo* son un recurso útil para establecer si un organismo es adecuado como bioindicador de contaminantes debido a que este tipo de investigaciones nos acercan más a la realidad permitiendo el estudio tanto fisiológico como metabólico de todo el organismo. El estudio *in vivo* de efectos de PAH's sobre *Anthopleura elegantissima*, una especie que abunda en nuestra región, podría confirmar que la anémona lleva a cabo la biotransformación de estos agentes xenobióticos. A su vez, si las enzimas responsables de este proceso muestran correlación entre la concentración de tóxico y la respuesta, podrían servir como biomarcadores de contaminación en programas de monitoreo ambiental de nuestra zona costera.

3. OBJETIVO

- Evaluar la capacidad de la anémona *Anthopleura elegantissima* para biotransformar hidrocarburos policíclicos aromáticos, mediante la medición de la actividad enzimática de NADPH citocromo C reductasa en tres fracciones subcelulares: nuclear, mitocondrial y microsomal.

4. METODOLOGÍA

Se llevaron a cabo pruebas de toxicidad en la anémona *Anthopleura elegantissima*. Se trabajaron cinco grupos de organismos, cada uno de los cuales estuvo conformado por 10 organismos. Cada grupo fue tratado como lo indica el apartado 4.4.1 Exposición al hidrocarburo. Después de 72 horas de exposición al hidrocarburo (B(a)P), se obtuvieron muestras de tejido de la zona del tronco de cada organismo; estas muestras se homogenizaron y se obtuvieron tres fracciones subcelulares: nuclear, mitocondrial y microsomal. En cada fracción se determinó la actividad enzimática de la NADPH citocromo C reductasa y la concentración de proteínas.

4.1 Localización del área de colecta

Las anémonas se colectaron en la playa Popotla localizada en el municipio de Rosarito, B. C. a los 32° 17' latitud norte y 117° 2' longitud oeste (fig. 2). La zona se encuentra expuesta a la acción del oleaje fuerte.

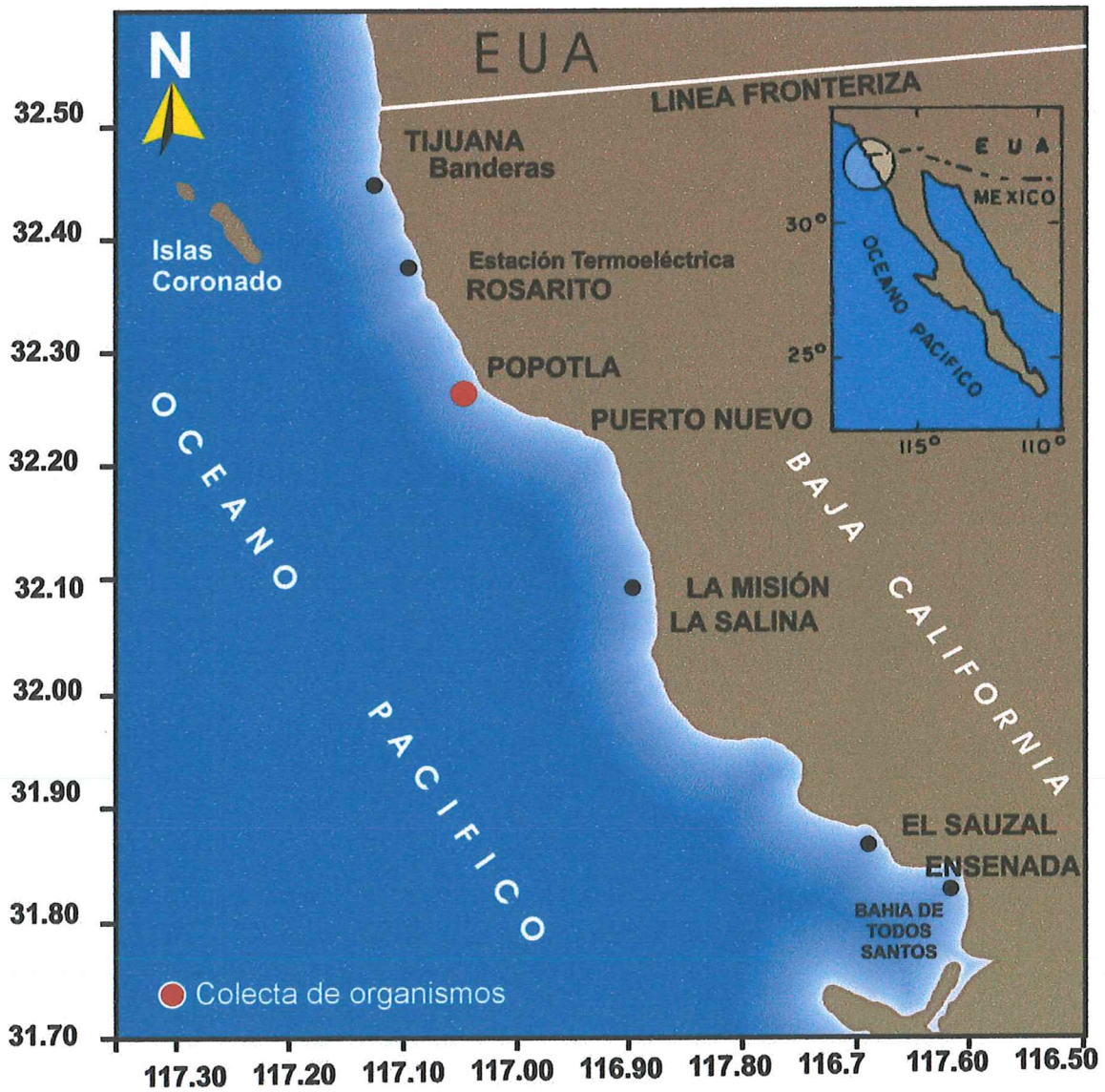
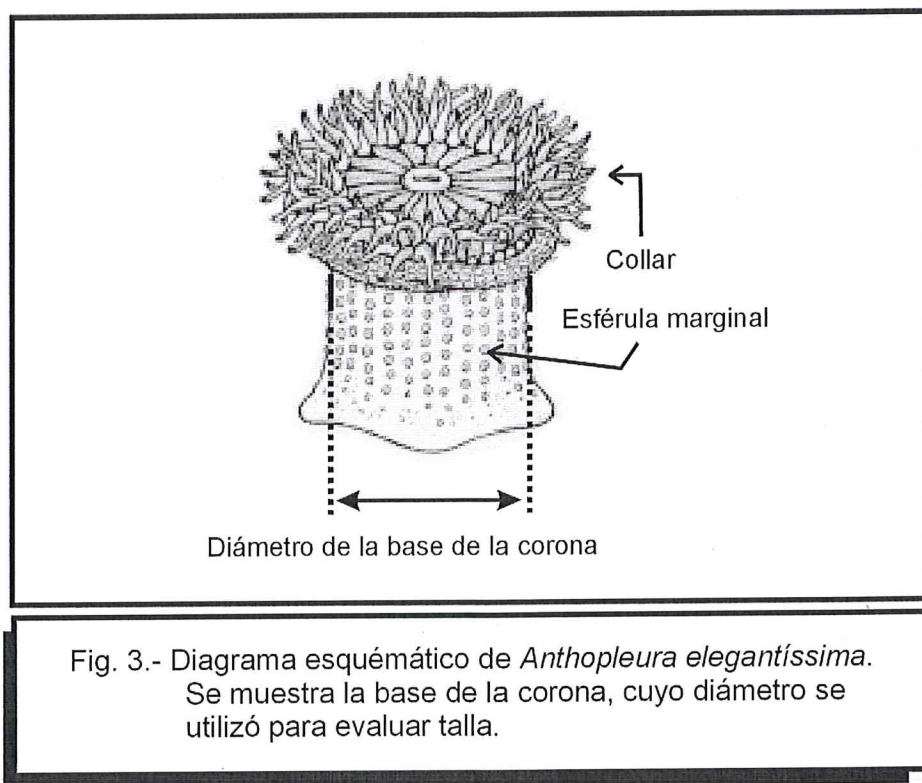


Fig. 2.- Localización del área de colecta.

4.2 Colecta y mantenimiento de organismos

La colecta se llevó a cabo en el mes de abril de 2002 dentro de la zona intermareal. Se colectaron 50 organismos entre 3.0 y 3.6 cm de diámetro en la corona (fig. 3).



Una vez colectadas se transportaron al laboratorio de Farmacología Marina de la Facultad de Ciencias Marinas. Ahí se lavaron eliminando arena y trozos de concha después de lo cual se distribuyeron en frascos de vidrio con capacidad de 3.0 litros previamente llenos de agua de mar filtrada (0.45 μ m),

con una salinidad de 34 ‰. En cada frasco se colocaron dos anémonas de tamaño similar.

Los organismos se mantuvieron durante 4 días con recambios de agua cada dos días antes de realizar el bioensayo. La temperatura tanto del agua de mar como del ambiente se mantuvieron a 17°C, con un fotoperíodo de 12 por 12. Todas las anémonas fueron alimentadas el primer y el tercer día con trozos de pescado blanco.

4.3 Pruebas de solubilidad del tóxico

Se realizaron pruebas de solubilidad para el benzo(a)pireno en solventes: acetona al 20 % en agua de mar, acetona al 40% en agua de mar, acetona al 60% en agua de mar, así como acetona, diclorometano y acetonitrilo puros. En función de estas pruebas se decidió utilizar acetona como solvente para preparar las tres soluciones de benzo(a)pireno utilizadas en el bioensayo, ya que en este solvente se encontró la mejor solubilidad del tóxico.

4.4 Bioensayo

4.4.1 Exposición al hidrocarburo

Se conformaron cinco grupos de 10 organismos cada uno (fig. 4a, fig. 4b). Las anémonas no se movieron del frasco de aclimatación, sólo se cambió el agua para eliminar partículas de alimento y excreciones corporales. Los grupos se nombraron de acuerdo a la concentración de B(a)P a la que se expuso a los organismos: 2 mM (G2), 4 mM (G4) y 6 mM (G6). Además, se denominó como GC al grupo control, conformado por organismos a los que no se les realizó ninguna adición y GS al grupo expuesto al solvente (acetona).

Cada organismo fue inyectado en la zona del tronco con 100 μ l de la solución correspondiente (fig. 5). Una vez que se inyectaron, los organismos se mantuvieron en observación durante 72 horas. En este período no se hicieron recambios de agua, se mantuvo el fotoperíodo de 12 por 12 y no fueron alimentadas. El experimento se terminó después 72 horas; en este momento se realizó el corte del tejido columnar de cada anémona (fig. 6) y todos los tejidos se colocaron inmediatamente a -80°C .



Fig. 4a.- Distribución de los organismos utilizados en el bioensayo. En la parte superior se muestra el grupo GC, que fue inyectado con agua de mar; en la parte inferior se observa el grupo GS, al que se le administró solvente (acetónitrilo). Ambos grupos fueron usados como controles.



Fig. 4b.- Distribución de los organismos utilizados en el bioensayo, durante el período de exposición a soluciones de benzo(a)pireno de diferentes concentraciones. En la parte superior se muestra el grupo G2, tratado con una solución 2 mM; en la parte media el grupo G4, sometido a una solución 4 mM y en la parte inferior el grupo G6, expuesto a una solución 6 mM.



Fig. 5.- Administración de 100 microlitros de la solución correspondiente a cada individuo de *A. elegantissima*. En todos los casos se inyectó en la zona columnar del organismo.



Fig. 6.- Corte del tejido columnar después de finalizar las 72 horas de exposición a la solución correspondiente.

4.4.2 Preparación de fracciones celulares

4.4.2.1 **Nuclear y mitocondrial.** Cada homogenado se preparó con tejido de la región columnar del cuerpo de cuatro anémonas que habían sido sometidas a las mismas condiciones de exposición. Los tejidos fueron enjuagados, pesados y cortados en pequeños trozos para después ser homogenizados en un homogenizador Elvehjem-Potter. Los tejidos se homogenizaron en cinco volúmenes de amortiguador de fosfatos 0.065M, a pH 7.0, conteniendo 1.15% de KCl y $MgCl_2$ 3 mM, de acuerdo al método descrito por Stegeman *et al.* (1981). Las fracciones subcelulares se obtuvieron mediante una centrifugación escalonada, a 750 g por 10 min (nuclear) y 13 000 g por 10 min (mitocondrial) en una ultracentrífuga BIOFUGE 22R-HAEREAUS INSTRUMENTS. Los pellets obtenidos se resuspendieron en 2.0 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.3 por cada gramo de tejido.

4.4.2.2 **Microsomal.** Se homogenizaron cuatro porciones de tejido columnar de cuatro anémonas sometidas a las mismas condiciones de exposición. Los tejidos fueron homogenizados en cuatro volúmenes de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.6; conteniendo sacarosa 125 mM, siguiendo el método propuesto por Heffernan *et al.* (1998). Los homogenados fueron centrifugados consecutivamente en una ultracentrífuga BIOFUGE 22R-HAEREAUS INSTRUMENTS, a 8 500 xg por 15 minutos y a 14 000 xg por 15

min. Los pellets resultantes en ambas centrifugaciones fueron descartados. El sobrenadante obtenido de la segunda centrifugación fue sometido a 105 000 xg por 1 hora en una centrífuga Sorvall-20/17 para obtener la fracción microsomal. Los microsomas fueron resuspendidos en 1.0 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.6; conteniendo sacarosa 250 mM por cada 4 gramos de tejido tratado.

4.5 Ensayo enzimático

La actividad de la NADPH citocromo C reductasa se midió mediante el incremento en la absorbancia del citocromo c a través del tiempo a 550 nm (Lake, 1987). El ensayo se llevó a cabo de acuerdo al método de Heffernan *et al.* (1998), utilizando una mezcla de reacción consistente en: citocromo c 0.048 mM; NADPH, 1 mM; KCN, 1 mM; 0.020 ml de fracción subcelular y amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.7. La reacción se inició al adicionarse el cofactor NADPH. La actividad enzimática se definió como la cantidad de nmol de citocromo c reducido, por minuto, por mg de proteína ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína). La actividad encontrada en las tres fracciones subcelulares del grupo GC, fue utilizada como la actividad basal para los grupos GS, G2, G4 y G6. El coeficiente de extinción para calcular las actividades fue $21 \text{ cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ (Heffernan *et al.*, 1998).

4.6 Determinación de proteínas

Para determinar la concentración de proteína en cada ml de homogenado, se utilizó el método de Lowry *et al.* (1951). De cada homogenado, se tomaron 0.030 ml, a los cuales se agregaron 0.97 ml de agua destilada. A esta mezcla se le agregaron 5 ml de una solución alcalina de cobre (1 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en tartrato sódico potásico al 1% y 50 ml de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N), se dejó reposar por 10 minutos, y se adicionaron 0.5 ml de reactivo de Folin. Después de 30 minutos de reposo, se leyó la transmitancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro Spectronic. La concentración de proteína (mg/ml) se calculó en función de la ecuación obtenida mediante una curva de calibración (0-0.5 mg/ml), en la cual se utilizó una solución estándar de albúmina (0.5 mg/ml).

4.7 Evaluación del hidrocarburo residual

Para determinar si los organismos arrojaron B(a)P al medio circundante, el agua de mar de los recipientes se extrajo con diclorometano al final de las 72 horas de exposición al tóxico. Se tomaron 100 ml de cada frasco, los cuales se colocaron en un embudo de separación. A estos 100 ml se les adicionó un volumen igual de diclorometano, se agitó vigorosamente y se esperaron unos

minutos a que ambas fases se separaran. Una vez que éstas se separaron, se guardó la fase orgánica en un vaso de precipitado. Se repitió el proceso de extracción con la fase acuosa del embudo dos veces más hasta obtener aproximadamente 300 ml de fase orgánica. Los 300 ml de fase orgánica obtenidos se colocaron en una plancha de calentamiento y se evaporó el solvente a sequedad. Todos los residuos de los vasos fueron resuspendidos con 2.00 ml de diclorometano. Inmediatamente después de resuspender, se corrió el espectro de 200 a 400 nm para cada muestra, usando la muestra de un frasco del grupo control como línea base.

4. 8 Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Zar, 1999) para verificar si los valores de actividad enzimática obtenidos en cada fracción celular a las concentraciones de B(a)P probadas se distribuían normalmente. La homogeneidad de varianzas se analizó mediante la prueba de Bartlett (Zar, 1999).

Para evaluar si existía un efecto en la actividad de la NADPH citocromo C reductasa relacionada con la concentración del B(a)P, se realizó un análisis de varianza unifactorial de una vía (Zar, 1999).

A los resultados encontrados en la fracción nuclear y mitocondrial se les realizó la prueba de Tukey (Zar, 1999) para establecer las diferencias de actividad enzimática en función de la concentración de B(a)P.

Para establecer las correlaciones entre talla y peso, así como entre la de la concentración del B(a)P y la actividad enzimática se realizaron regresiones lineales, y se determinó el coeficiente de correlación (r), para las cuales se utilizó el programa Statistica versión 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Tamaño y peso de los cinco grupos experimentales

Las tallas y pesos de los cinco grupos experimentales no presentaron diferencias significativas ($\alpha = 0.001$) manteniendo una media general de 3.22 ± 0.19 cm (Tabla I). Las tallas de los organismos se encontraron entre 3.00 y 3.60 cm de diámetro en la corona, y los pesos entre 12.63 y 31.23 gramos.

Tabla I.- Pesos y tallas promedio (\pm d.s.) de especímenes de *Anthopleura elegantissima* para los cinco grupos experimentales utilizados en el bioensayo realizado en este trabajo. En todos los casos, el número de organismos por grupo fue de 10. Se muestran las sustancias y las concentraciones a las que cada grupo fue expuesto. B(a)P = Benzo (a)pireno. Solvente = Acetonitrilo

Grupo	H ₀ mar (GC)	Solvente (GS)	B(a)P 2 mM (G2)	B(a)P 4 mM (G4)	B(a)P 6 mM (G6)	Promedio total
Talla (cm)	3.20 ± 0.12	3.22 ± 0.20	3.22 ± 0.22	3.22 ± 0.21	3.22 ± 0.21	3.22 ± 0.19
Peso (g)	18.94 ± 4.70	18.94 ± 4.30	17.91 ± 6.20	17.81 ± 6.18	18.85 ± 7.23	18.25 ± 5.70

Se encontró una relación lineal entre el peso y la talla de los 50 organismos utilizados en el bioensayo, con un coeficiente de correlación de 0.9257 (fig. 7).

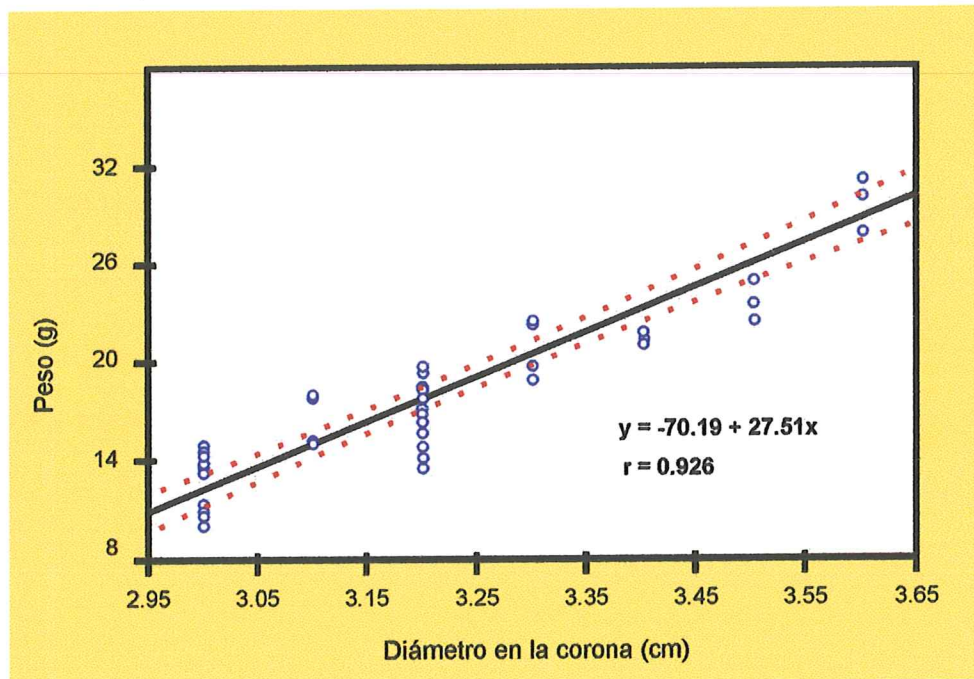


Fig. 7.- Relación entre peso y diámetro de los 50 organismos de *Anthopleura elegantissima* utilizados en los cinco grupos experimentales del bioensayo.

5.2 Benzo(a)pireno residual en los frascos de exposición

En ninguno de los 15 frascos de exposición se identificaron los picos de absorbancia máxima característicos del Benzo(a)pireno (264, 284, 296, 365 y 383 nm), de acuerdo a los espectros que se muestran en la fig. 8. En la mayoría de los espectros, se encontraron absorbancias negativas en la zona de 200 nm a 280 nm.

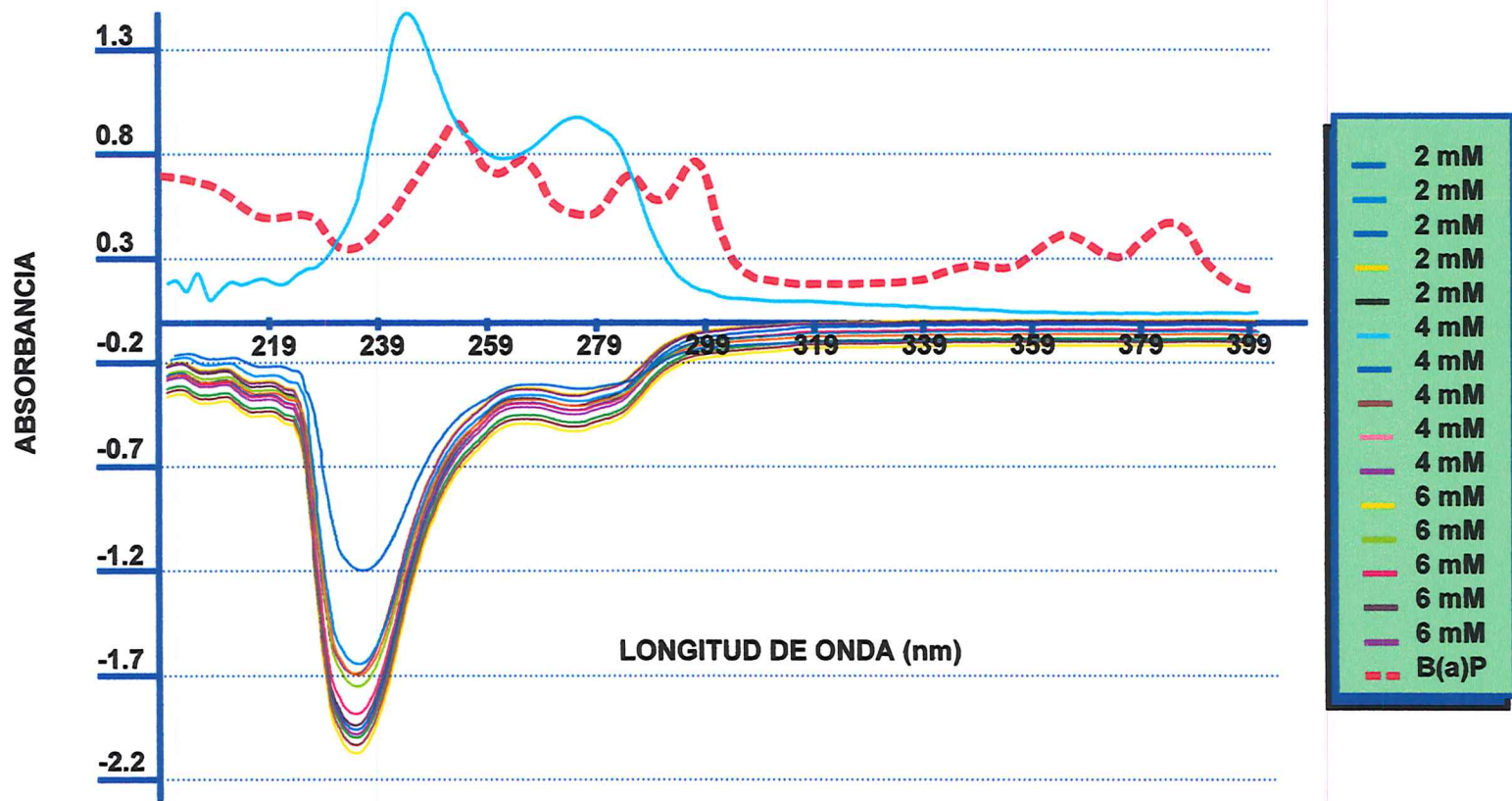


Fig. 8.- Espectros de absorción de extractos del agua de mar en la que fueron colocados especímenes de *Anthopleura elegantissima* tratados con benzo (a) pireno durante la prueba de toxicidad de este trabajo. Los extractos fueron obtenidos después de remover a los organismos, tratando el agua de los recipientes con diclorometano. La absorbancia de esta fracción orgánica se midió en el intervalo de 200 a 400 nm para evaluar la posible expulsión de benzo (a) pireno, B(a)P, por los organismos. Las concentraciones que aparecen en el recuadro indican la concentración de benzopireno que se aplicó a cada individuo, lo cual se realizó por quintuplicado. Cada espectro corresponde a un recipiente a excepción del espectro B(a)P, que es una solución 56 μ M de este compuesto.

5.3 Actividad de la NADPH citocromo C reductasa en tres fracciones subcelulares

Se encontró actividad de la NADPH en las tres fracciones subcelulares de todos los grupos experimentales (GC, GS, G2, G4, G6). Los valores para cada una de las fracciones se muestran en la Tabla II.

Tabla II.- Actividad (\pm d.s.) de la NADPH citocromo C reductasa en tres fracciones subcelulares de especímenes de *Anthopleura elegantissima* sometidos a diferentes tratamientos durante 72 horas. En todos los casos, el número de organismos por grupo fue de 10. Se muestran las sustancias y las concentraciones a las que cada grupo fue expuesto. B(a)P = Benzo (a) pireno. Solvente = Acetonitrilo. La actividad se expresa en nanomoles de citocromo C reducido por minuto por miligramo de proteína.

Grupo Fracción	H 0 mar (GC)	Solvente (GS)	B(a)P 2 mM (G2)	B(a)P 4 mM (G4)	B(a)P 6 mM (G6)
Nuclear	1.126 \pm 0.31	1.183 \pm 0.47	1.815 \pm 0.40	2.137 \pm 0.06	1.000 \pm 0.14
Mitocondrial	8.793 \pm 1.53	8.91 \pm 0.66	5.057 \pm 0.33	5.690 \pm 0.58	4.770 \pm 0.66
Microsomal	2.961 \pm 0.19	3.063 \pm 0.37	3.803 \pm 0.52	3.869 \pm 0.74	4.610 \pm 0.62

El análisis estadístico de las fracciones nuclear, mitocondrial y microsomal provenientes del grupo GS, realizado para comparar cada una de ellas con la fracción correspondiente del grupo GC, reveló que no existen diferencias significativas en la actividad de la NADPH citocromo C reductasa ($\alpha = 0.05$).

En la fracción nuclear se encontraron actividades entre 1.00 y 2.1366 nmol citocromo c reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. Las actividades más altas se observaron en los grupos G2 y G4, los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí ($\alpha = 0.05$), mientras que en los grupos GC, GS y G6 se encontraron las actividades más bajas: 1.126, 1.183 y 1.000 nmol citocromo c reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ respectivamente (Tabla II). En estos tres grupos no se encontraron diferencias significativas entre si ($\alpha = 0.05$).

La actividad basal en la fracción mitocondrial fue superior a la actividad basal encontrada tanto en la fracción nuclear como microsomal. En general, la actividad de la NADPH citocromo C reductasa en las mitocondrias de todos los grupos fueron muy altas, las más elevadas se encontraron en los grupos GC y GS, entre los cuales no se hallaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) (fig. 9). Las actividades de mitocondrias para los organismos expuestos se comportaron de forma similar a las encontradas en la fracción nuclear, ya que no se observaron diferencias significativas entre las actividades de los grupos G2

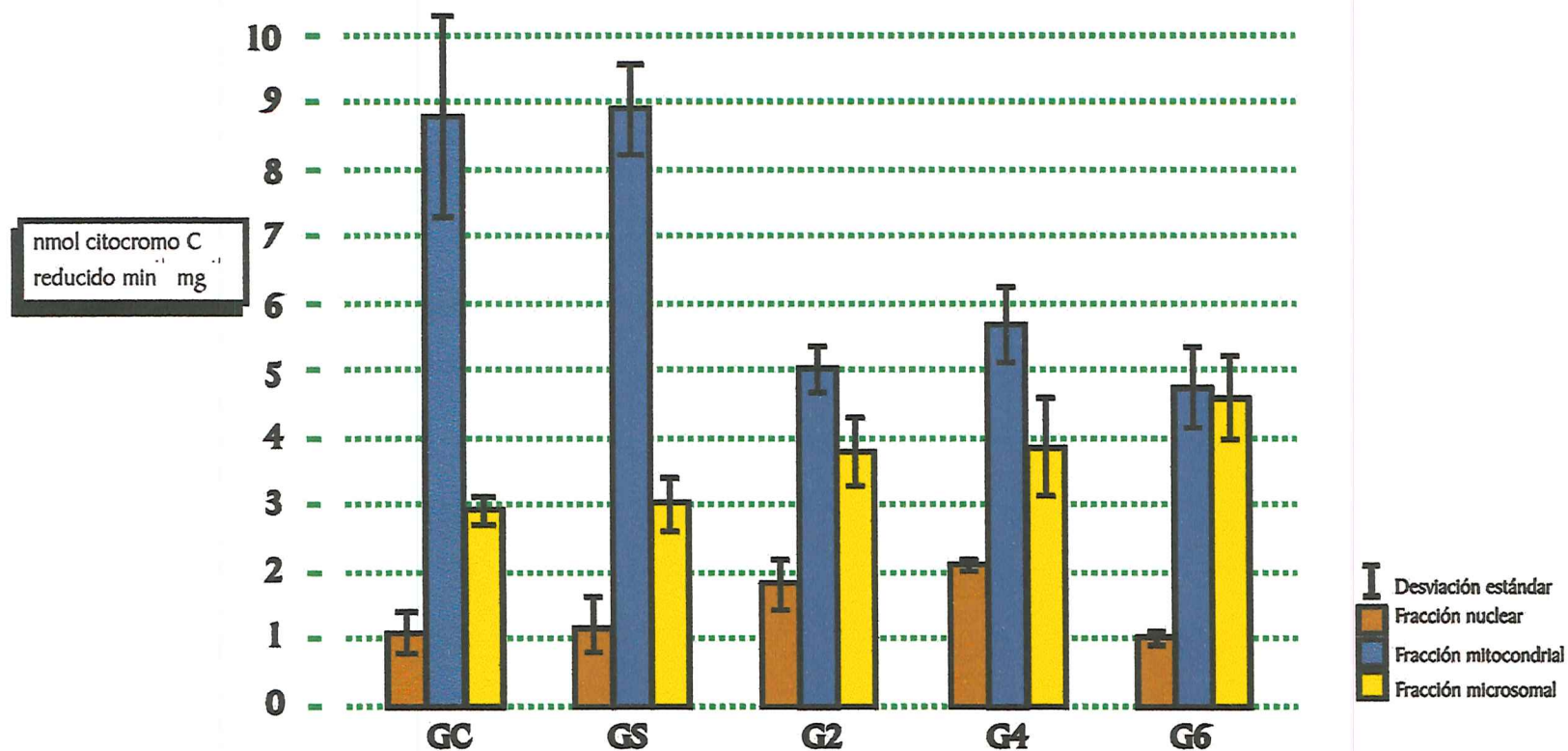


Fig. 9.- Actividad de NADPH citocromo C reductasa en tres fracciones subcelulares de *Anthopleura elegantissima*. Las abreviaturas se refieren a los grupos de organismos a los que se aplicaron diferentes tratamientos, los cuales consistieron en administrar 100 μ L de cada uno de los siguientes: GC, agua de mar; GS, acetonitrilo; G2, solución 2 mM de benzo (a) pireno; G4, solución 4 mM de benzo (a) pireno; G6, solución 6 mM de benzo (a) pireno. El benzo (a) pireno fue administrado en soluciones preparadas en acetonitrilo. Las actividades enzimáticas se expresan en nanomoles de citocromo C reducido por minuto por miligramo de proteína.

y G4 ($\alpha = 0.05$). Sin embargo, en las mitocondrias del grupo G6 la actividad enzimática disminuyó 16.17% con respecto a la actividad del grupo G4.

En la fracción microsomal se observó un incremento en la actividad de la NADPH citocromo C reductasa relacionada con el incremento de la concentración del B(a)P (fig. 9). La actividad en el grupo GC y GS, fue de 2.961 ± 0.19 y 3.063 ± 0.371 nmol citocromo c reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ respectivamente. En esta fracción, al igual que en núcleos y mitocondrias, no se encontraron diferencias significativas entre la actividad de estos dos grupos ($\alpha = 0.05$). En cuanto a los organismos expuestos a diferentes concentraciones de B(a)P, se observaron incrementos de 28.44% en los organismos expuestos a 2 mM, 30.67% en los organismos expuestos a 4 mM y 56.00% en los organismos expuestos a 6 mM, todos calculados con respecto a la actividad basal obtenida para esta fracción (2.961 ± 0.190 nmol citocromo c reducido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

En la fracción microsomal se encontró un coeficiente de correlación(r), de 0.961, entre la actividad de la NADPH citocromo C reductasa y la concentración del B(a)P (fig. 10). Para la fracción nuclear, el coeficiente de correlación obtenido, 0.05 no indicó dependencia entre la actividad enzimática y la concentración del tóxico. En el caso de la actividad mitocondrial, se obtuvo un coeficiente de correlación de -0.79, el cual si bien indica dependencia entre la actividad de la NADPH citocromo C reductasa y la concentración del B(a)P,

describe una tendencia negativa, es decir, la actividad enzimática disminuye al aumentar la concentración del B(a)P.

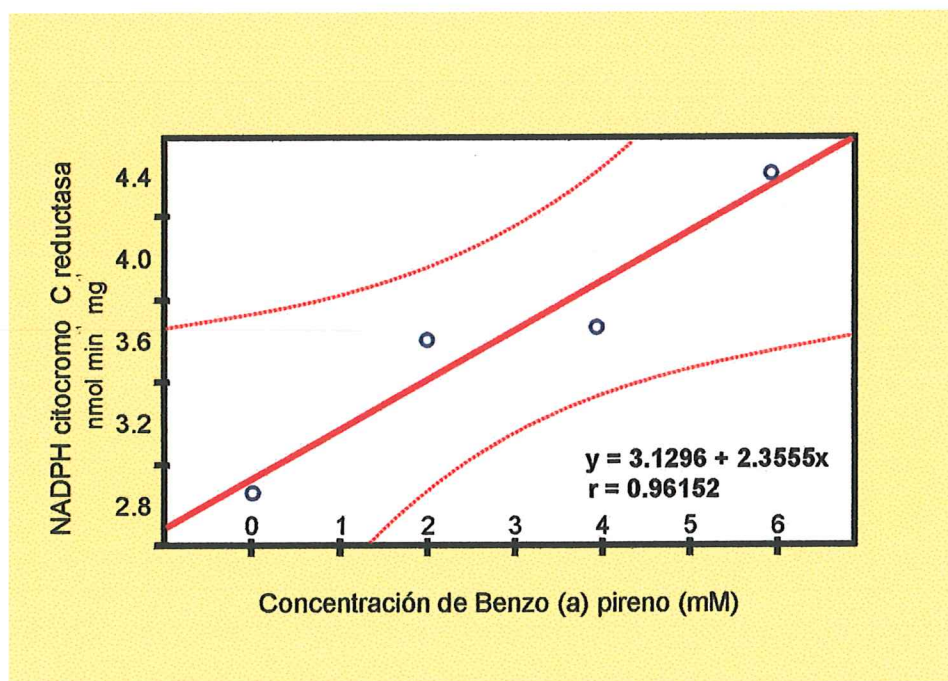


Fig. 10.- Relación entre el incremento de la concentración del benzo (a) pireno y la actividad de la NADPH citocromo C reductasa en las fracciones microsomales obtenidas de *Anthopleura elegantissima*. La actividad enzimática se expresa en nanomoles de citocromo C reducido por minuto por miligramo de proteína.

6. DISCUSIÓN

La actividad de la NADPH citocromo C reductasa en las tres fracciones subcelulares estudiadas indicó la presencia de esta enzima en todas ellas. Sin embargo, la tendencia general de esta actividad en cada fracción con respecto al aumento de la concentración del tóxico suministrado, no muestra el mismo patrón en todas.

En relación a los valores basales, es decir, la actividad encontrada en el grupo control o GC, la fracción nuclear presentó un valor más bajo con respecto al encontrado en microsomas, el cual a su vez fue menor al de la fracción mitocondrial. Los valores basales para la fracción nuclear son comparables con los encontrados en el balano *Balanus eberneus*, para el cual se reportó una actividad de $0.8 \text{ nmol citocromo c reducido min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Stegeman y Kaplan 1981) y con el pez marino *Stenotomus versicolor* cuya actividad en núcleos se estableció de $0.2 \text{ nmol citocromo c reducido min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Stegeman *et al.*, 1979).

La fracción microsomal ha sido la más estudiada para la identificación de la MFO ya que en la mayoría de los organismos la NADPH citocromo C reductasa se encuentra en mayor concentración dentro del retículo endoplásmico. El valor basal para microsomas determinado en el presente estudio ($2.961 \pm 0.19 \text{ nmol citocromo c reducido min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), se encuentra dentro

del intervalo reportado para los cnidarios por Heffernan y Winston (1998), quienes hallaron valores de 3.4 ± 0.5 , 2.0 ± 0.2 y 2.1 ± 0.3 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para los microsomas de *Anthopleura elegantissima*, *A. xanthogrammica* y *Bunodosoma cavernata* respectivamente. Estos datos ubican a los cnidarios en la parte más baja de la escala de valores reportados para invertebrados, ya que el intervalo de la actividad de la NADPH citocromo C reductasa para la mayoría de los invertebrados se reporta entre 2 y 12 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Las actividades más cercanas se han encontrado en el erizo *Echinus esculentus* (5.6 ± 1.9 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Actividades mayores a 12 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ se han reportado en organismos como el balano *Balanus eberneus* (Stegeman y Kaplan, 1981) y el mejillón *Mytilus edulis* (Stegeman *et. al.*, 1985). Es importante recalcar que tanto los cirripedios como los moluscos bivalvos se encuentran en un nivel evolutivo que posee órganos especializados (hepatopáncreas, glándula digestiva, etc.) en los que se ha comprobado que la NADPH citocromo C reductasa se encuentra en mayor concentración, mientras que los cnidarios se caracterizan por un menor desarrollo evolutivo que carece de ese grado de especialización.

La actividad basal encontrada en la fracción mitocondrial fue anormalmente superior a la actividad basal encontrada en núcleos y microsomas. Este valor podría estar alterado debido a errores en la disección, en donde no se eliminó tejido que podría contener moléculas lipídicas. La capa

grasosa encontrada después de la primera centrifugación en las muestras del grupo GC y GS evidenció la presencia de componentes lipídicos en estos tejidos, además del tejido columnar (carente de grasa) y sugiere la presencia de ácidos grasos además de un alto contenido de NADPH, cofactor necesario para la síntesis de estas biomoléculas. Un exceso de NADPH podría haber impactado la reducción del citocromo c ocasionando incrementos inesperados en su actividad, ya que en el ensayo enzimático utilizado para cuantificar la actividad de la reductasa de P-450, el NADPH actúa como donador de electrones. En general, en todas las fracciones mitocondriales, tanto de organismos control como de organismos expuestos, cabía esperar actividades más altas, ya que además de la presencia del NADPH, en las mitocondrias se encuentra NADH en altas cantidades producto del ciclo de Krebs. Este nucleótido, al igual que el NADPH, es capaz de reducir al citocromo c. El KCN agregado durante el ensayo enzimático se añadió con la finalidad de inhibir el aporte de NADH ya que el KCN inhibe el transporte electrónico (síntesis de ATP), específicamente en el complejo en el cual se encuentra la citocromo c oxidasa. Si la concentración de este inhibidor no fue suficiente, entonces la actividad estimada puede ser el resultado de la suma del citocromo c reducido por el NADPH y el citocromo c reducido por el NADH.

En ninguna de las fracciones se encontró que el solvente tiene un impacto sobre la actividad de la enzima. La implicación práctica más importante de este

hecho radica en que la acetona es un solvente adecuado para realizar pruebas de toxicidad en anémonas, ya que no ejerce mayor efecto que el agua de mar.

En relación a la actividad de la NADPH citocromo C reductasa determinada en las fracciones provenientes de los organismos expuestos al benzo(a)pireno, se encontró un incremento con respecto al control correspondiente en la mayoría de los casos. La fracción nuclear presentó un incremento de 71.16% en el grupo expuesto a una concentración de 2 mM. Sin embargo, esta actividad no es significativamente diferente a la encontrada en los organismos expuestos a la concentración 4 mM de B(a)P. En los organismos expuestos a la mayor concentración del PAH (G6), la actividad disminuyó de tal forma que no se encontraron diferencias significativas entre este grupo y el grupo control. Esta disminución propicia una escasa correlación ($r = 0.06$) entre la actividad de esta enzima y la concentración del B(a)P, por lo que la actividad de la NADPH citocromo C reductasa es independiente de la concentración del tóxico, situación que puede explicarse por el hecho de que esta fracción contiene otros elementos celulares que sedimentan a la misma velocidad que los núcleos, como son células completas, citoesqueletos y membranas del plasma. La presencia de estos componentes podría arrojar resultados erráticos, razón por la cual puede concluirse que los núcleos no son útiles como fracción para la búsqueda de biomarcadores.

En las fracciones mitocondriales se observa la misma tendencia que en las fracciones nucleares. Es decir, la actividad más alta se encontró en los organismos expuestos a las concentraciones 2 y 4 mM de B(a)P, los cuales no presentan diferencias significativas entre sí ($\alpha = 0.05$) y para la concentración de 6 mM se observa un decremento con respecto al efecto de las concentraciones más bajas. Por otra parte, para estas tres fracciones no fue posible establecer una comparación con el grupo GC y GS debido a las anomalías encontradas en estas últimas, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, si se asume que la actividad enzimática de las fracciones G2, G4 y G6 están proporcionalmente sobreestimadas, al realizar la regresión lineal se obtiene un coeficiente de correlación ($r = -0.78$); el cual, si bien indica una alta correlación entre la concentración del hidrocarburo y la actividad de la NADPH citocromo C reductasa, indica también una tendencia negativa. Esto implica que el P450 no aumenta su actividad en presencia del xenobiótico utilizado en el bioensayo, es decir, no cumple con su función degradativa y por lo tanto en esta fracción no puede establecerse que se lleva a cabo la biotransformación de los PAH's.

Al igual que en las fracciones nuclear y mitocondrial de los organismos que se expusieron a diferentes concentraciones de B(a)P, en la fracción microsomal también se encontraron variaciones en las actividades enzimáticas relacionadas con la concentración del PAH. Sin embargo, en esta fracción sí se

observa una clara correlación entre la actividad de la NADPH citocromo C reductasa y la concentración del PAH ($r = 0.961$). Este valor implica que a medida que la concentración del tóxico aumenta ocurre una estimulación microsomal que propicia una mayor actividad de la MFO, característica deseable en un biomarcador. Si bien esto no asegura la biotransformación completa del B(a)P en la anémona por las mismas rutas propuestas para otros organismos marinos (Mitchelmore *et al.*, 1998), sí indica la inducibilidad del sistema de reductasas asociado a la MFO.

Incrementos en la actividad de las reductasas asociadas a la MFO, así como de las enzimas involucradas en la fase II de la biotransformación, similares a los obtenidos en este trabajo han sido encontrados por otros autores para otras especies marinas expuestas a HPAH's y PAH's. García *et al.* (2000) establecieron efectos de este tipo en peces mesopelágicos, Niyogi *et al.* (2001) y Lee (1981) en los poliquetos marinos *Nereis virens* y *Capitella capitata* y Fries *et al.* (1984) en el balano *Balanus balanoides*. En la anémona *A. elegantissima* Winston (1999) realizó pruebas de exposición a metales pesados encontrando que en este caso también se incrementa la actividad de las reductasas asociadas a la MFO. Sin embargo, en ninguno de los trabajos anteriores los organismos fueron sometidos a gradientes de exposición, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo no pueden ser comparados con los de otros autores.

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos decir que la NADPH citocromo C reductasa pudo ser identificada en las tres fracciones subcelulares estudiadas. La identificación de esta reductasa, específica del P450, indica que la anémona cuenta con el complejo enzimático llamado MFO responsable de la biotransformación de las sustancias xenobioticas. La presencia de este sistema enzimático implica que la anémona *Anthopleura elegantissima* es capaz de oxidar y depurar xenobióticos orgánicos que se encuentran en su ambiente. El coeficiente de correlación (r), indica que sólo en la fracción microsomal se puede observar una clara correlación entre el contaminante y la respuesta del biomarcador (incremento en la actividad de NADPH citocromo C reductasa), por lo que esta fracción es la única de las tres investigadas que muestra las mejores características de un citocromo P450 funcional dependiente de la MFO. De esta forma, la fracción microsomal es la que podría ser utilizada potencialmente para evaluar los efectos de los PAH's sobre las anémonas, las que gracias a sus características de abundancia, tamaño, movilidad, simplicidad morfológica e importancia ecológica dentro de su nicho representan un bioindicador adecuado para ser incorporado a programas de monitoreo ambiental en nuestra región.

Una de las problemáticas que presenta este organismo al ser utilizado en el laboratorio, es la medición de talla y peso dada su tendencia a absorber

agua del medio, la cual, en el caso específico de las anémonas, es expulsada ante cualquier factor de estrés. De acuerdo al diseño experimental planteado en este trabajo, todos los organismos utilizados tenían que encontrarse dentro un intervalo con baja dispersión de talla, por lo que cada espécimen se midió al ser colectado, encontrando así una media de 3.22 ± 0.19 cm de diámetro en la corona para los 50 organismos colectados. Debido a la incertidumbre de establecer la talla exacta de cada organismo, se determinó que además de medir el diámetro en la corona también se pesaran después de que éstos expulsaran la mayor parte del agua. El coeficiente de correlación encontrado al relacionar estos dos parámetros ($r = 0.9257$) (fig. 10), muestra que el peso de los organismos colectados aumenta linealmente en función de la talla. Con base en el incremento lineal de estos dos parámetros y su coeficiente de correlación, puede decirse que la talla de los organismos utilizados en este experimento está correctamente estimada. La importancia de mantener una talla promedio similar en los cinco grupos de exposición radica en que la MFO no sólo participa en la biotransformación de xenobióticos, sino también en otros procesos relacionados con el desarrollo como la producción hormonal. En el caso del cangrejo *Callinectes sapidus*, se han encontrado variaciones en las enzimas dependientes de la MFO, relacionadas tanto con el sexo como con el estado de desarrollo de los organismos. Casos similares han sido reportados para *Cancer magister* y *Rhithropanopeus harrissi* (Brookhout *et al.*, 1976; Armstrong *et. al.*, 1976). En el caso de la anémona, a pesar de encontrarse en

un nivel evolutivo inferior se asumió que en este trabajo podrían presentarse fluctuaciones en la actividad de la NADPH citocromo C reductasa debido a la edad o estado de desarrollo en el que se encontraban los organismos al ser colectados. Para evitar en lo más posible esta problemática, se colectaron organismos de tallas similares, considerando que de esta manera se reduciría el error que podría propiciar el estado de desarrollo de los organismos en los resultados finales. No se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.001$) entre los valores promedio de las tallas de los cinco grupos experimentales, por lo que se concluye que la actividad de la NADPH citocromo C reductasa encontrada en estos cinco grupos no está influenciada por la talla de los organismos.

Otro de los factores que se tomó en cuenta en la realización del bioensayo, es la concentración del tóxico administrado. Las características del organismo de prueba utilizado en el presente trabajo podrían dar lugar a dudas sobre la concentración real del B(a)P dentro del organismo, dada su tendencia a contraerse ante cualquier estímulo externo, lo que da como resultado que el tóxico sea expulsado al medio circundante. Para descartar una posible pérdida de B(a)P por los organismos o bien aplicar la corrección correspondiente, se evaluó el hidrocarburo residual en el agua de los recipientes de exposición. De acuerdo a la fig. 8, en ninguno de los espectros correspondientes a los frascos de exposición se encontró lectura a las longitudes de onda de máxima absorbancia del B(a)P, las que se encuentran a 264, 284, 296, 365 y 383 nm

(Chen y Chen, 2000). Todos los frascos de exposición, a excepción de uno correspondiente a una concentración de 4 mM, presentaron absorbancias negativas en el intervalo de 200 nm a 280 nm. Esto se debe a que el blanco se hizo con agua de los recipientes del grupo GC, el cual presentó máximas absorbancias a 234 y 272 nm; por lo que al restarse al blanco se obtuvieron los valles con absorbancias negativas a estas mismas longitudes de onda. El espectro correspondiente a la concentración de 4 mM que presentó diferencias con respecto al resto de los espectros, indica puntos de máxima absorbancia a 244 nm y 272 nm, ninguno de los cuales concuerda con los máximos del B(a)P. Probablemente estas absorbancias son propiciadas por otras sustancias presentes en el medio, como desechos metabólicos de las anémonas. Con base en los espectros puede decirse que no había B(a)P residual en ninguno de los frascos de exposición, por lo que puede asegurarse que ningún organismo expulsó el B(a)P que le fue inyectado. De esta forma, tanto la cantidad como la concentración que se le suministró a cada uno se mantuvieron durante todo el experimento dentro del organismo.

7. CONCLUSIONES

- I. La acetona es un solvente adecuado para realizar pruebas de toxicidad en anémonas ya que no ejerce mayor efecto en la actividad de la NADPH citocromo C reductasa que el agua de mar.
- II. En la fracción nuclear del tejido columnar de la anémona *Anthopleura elegantissima* no presenta correlación entre la actividad de esta enzima y la concentración del B(a)P ($r = 0.06$).
- III. La fracción mitocondrial del tejido columnar de la anémona *Anthopleura elegantissima* no es útil para la aplicación de NADPH citocromo C reductasa como biomarcador ya que no se observaron incrementos en la actividad de esta enzima en función con la concentración del B(a)P.
- IV. La fracción microsomal del tejido columnar de la anémona *Anthopleura elegantissima* presentó una alta correlación entre la actividad de la NADPH citocromo C reductasa y la concentración del B(a)P ($r = 0.961$), lo que indica inducibilidad de esta enzima por el tóxico.
- V. La fracción microsomal del tejido columnar de la anémona *Anthopleura elegantissima* es útil para la aplicación de NADPH citocromo C reductasa

como biomarcador ya que presenta una alta correlación entre la actividad de esta enzima y la concentración del B(a)P ($r = 0.961$).

VI. La inducibilidad y correlación entre la actividad de la NADPH citocromo C reductasa y la concentración del tóxico encontradas en la anémona *Anthopleura elegantissima* indican que esta especie marina es capaz de biotransformar hidrocarburos policíclicos aromáticos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Anderson, R. S. (1978). Benzo(a)pyrene metabolism in the American oyster, *Crassostrea virginica*. Ecological Research Series EPA-600/3-78-009. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
- ❖ Armstrong, D. A., Buchanan, D. V., Mallon, M. H., Caldwell, R. S., y Milleman, R. E. (1976). Toxicity of the insecticide methoxychlor to the dungeness crab *Cancer magister*. *Marine Biology*, 38: 239-252
- ❖ Brookhout, C. G., Costlow, J. D., y Monroe, R. (1976). Effects of methoxychlor on larval development of mud crab and blue crab. *Water Air Soil Pollution*, 5: 349-365
- ❖ Campbell, N. A. (1993). Invertebrates and the origin of animal diversity. *Biology*, 3rd edition, Campbell, N. A. ed. Pp. 598-634.
- ❖ Chen Y. C. y Chen B. H. (2000). Stability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Heating. *Journal of Food and Drug Análisis*, 9(1): 33-39.
- ❖ den Besten, P. J., Herwig, H. J., van Donselaar, E. G. y Livingstone, D. R. (1990). Cytochrome P450 monooxygenase system and benzo(a)pyrene metabolism in echinoderms. *Marine Biology*, 107:171-177.
- ❖ den Besten, P.J., Lemaire, P., O'Hara, S. C. M. y Livingstone, D. R. (1993) Metabolism of benzo(a)pyrene by the sea star, *Asterias rubens* L. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 3(suppl.):1055-1061.

- ❖ den Besten, P. J., Lemaire, P. y Livingstone, D. R. (1994) NADPH-, NADH- and cumene hydroperoxide-dependent metabolism of benzo(a)pyrene by pyloric caeca microsomes of the sea star *Asterias rubens* L. (Echinodermata: Asteroidea). *Xenobiotica*, 24(10):989-1001.
- ❖ den Besten, P. J., (1998). Concepts for the Implementation of Biomarkers in Environmental Monitoring. *Marine Environmental Research*, 46 (1): 253-256.
- ❖ den Besten, P. J., Valk S., van Weerlee E., Nolting R. F., Postma J. F. y Everaarts J. M. (2001) Bioaccumulation and biomarkers in the sea star *Asterias rubens* (Echinodermata : Asteroidea):a North Sea field study. *Marine Environmental Research*, 51:365-387.
- ❖ Depledge, M. H. y Fossi, M. C., (1994). Using Biomarkers to Detect Contamination of the Marine Environment. *Ecotoxicology*, 3: 161-172.
- ❖ Fent, K. y Bättscher, R. (2000). Cytochrome P4501A induction potencies of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: Demonstration of Additive interactions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(8): 2047-2058.
- ❖ Fries, C. R. y Lee, R. F. (1984) Pollutant effects on the mixed-function oxigenase (MFO) and reproductive systems of the marine polychaete, *Nereis virens*. *Marine Biology*, 79:187-193.

- ❖ García, L. M., Porte, C., y Albaigés, J. (2000). Organochlorinated Pollutants and Xenobiotic Metabolizing Enzymes in W. Mediterranean Mesopelagic Fish. *Marine Pollution Bulletin*, 40(9): 764-768.
- ❖ Gassman, N. J. y Kennedy, C. J. (1992) Cytochrome P-450 content and xenobiotic metabolism enzyme activities in the scleractian coral, *Flavia fragum* (ESPER). *Bulletin of Marine Science*, 50(2): 320-330.
- ❖ Hahn, M. E. (1999) Using Biomarkers to Detect Contamination of the Marine Environment. Innovative Technology. Northeast Sea Grant-Archives.
- ❖ Heffernan, L. M., Ertl, R. P., Stegeman, J. J., Buhler, D. R. y Winston, G. W. (1996) Immunodetection of proteins by cytochromes P450 antibodies in five species of sea anemones. *Marine Environmental Research*, 45: 353-357.
- ❖ Heffernan, L. M., y Winston, G. W. (1998) Spectral análisis and catalytic activities of the microsomal mixed-function oxidase system of the sea anemone (phylum: Cnidaria). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121C: 371-383.
- ❖ Heidelberger, C. (1976). Studies on the mechanisms of carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives. *Polynuclear aromatic hydrocarbons: chemistry, metabolism and carcinogenesis*, Freudenthal and Jones eds. New York, pp 1-8.

- ❖ James, M. O. (1989) Cytochrome P450 monooxygenase in crustaceans. *Xenobiotica*, 19:1063-1076.
- ❖ Katzung, B. G. (1999) *Farmacología básica y clínica*. Manual Moderno, México, D. F., Santafé de Bogotá, 1310 pp.
- ❖ Khan, M. A. Q., Kamal, A., Wolin, R. J., y Runnels, J. (1972). In vivo and in vitro epoxidation of aldrin by aquatic food Cañ organisms. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 8:219-228.
- ❖ Landis W. G. y Yu M. H. (1995) *Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals upon ecological systems*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 328 pp .
- ❖ Leaver, M. J. (1996) *Toxicology of Aquatic Pollution*. Physiological, molecular and cellular approaches. Ed. E. W. Taylor, Cambridge University Press, pp. 267-278.
- ❖ Lee, R. F. (1981). Mixed Function Oxigenases (MFO) in Marine Invertebrates. *Marine Biology Letters*, 2: 87-105.
- ❖ Lee, R. F., Singer, S. C., y Page, D. S. (1981). Responses of cytochrome P-450 systems in marine crab and polychaetes to organic pollutants. *Aquatic Toxicology*, 1:355-365.
- ❖ Livingstone, D. R., Garcia-Martinez, P., Stegeman, J. J., y Winston, G. W. (1988). Benzo(a)pyrene metabolism and aspects of oxygen radical generation in the common mussel, *Mytilus edulis*. *Biochemical Society Transactions*, 16: 779.

- ❖ Livingstone , D. R. (1998). Review. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative differences in biotransformation by invertebrate and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 120: 43-49.
- ❖ Lowry, O. H., Rosenberg, J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 193: 265-275.
- ❖ Mitchel, X. R., Cassand, P. M., Ribera, D. G., y Narbonne, J. F. (1992). Metabolism and mutagenic activation of Benzo(a)pyrene by subcellular fractions from mussel (*Mytilus galloprovincialis*) digestive gland and sea bass (*Discenthracus labrax*) liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 103C: 43-51.
- ❖ Mitchelmore, C. L., Birmelin, C., Chipman, J. K., y Livingstone, D. R. (1998). Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo(a)pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells. *Aquatic Toxicology*, 41:193-212.
- ❖ Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., y Datta, A. G. (2001). Seasonal variation of antioxidant and biotransformation encimes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 52:13-26.

- ❖ Omura, T., Sanders, E, y Estabrook, R. W. (1964). Isolation from Adrenal Cortex of a Nonheme Iron Protein and a Flavoprotein Functional as a Reduced Triphosphopyridine Nucleotide-Cytochrome P-450 reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 117:660-673.
- ❖ Peakall, D. (1992). *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman and Hall, London, 291 pp.
- ❖ Pruell, R. J., Lake, J. L., Davis, W. R., y Quinn, J. G. (1986). Uptake and depuration of organic contaminants by blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to environmentally contaminated sediment. *Marine Biology*, 91: 497-507
- ❖ Rand, G. M., y Petrocelli, S. R. . Eds. (1985). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, 670 pp.
- ❖ Rees, T. J. (1993). *Glutathione S-Transferase as a Biological Marker of Aquatic Contamination. Research Thesis in Applied Toxicology*. Portsmouth University, UK, 99 pp.
- ❖ Salinas, S. (2000). *The ecological niche of Anthopleura elegantissima at Race Rocks*. Lester B. Pearson College of the Pacific, USA, pp 1-18.
- ❖ Smith, R. I., y Carlton, J. T. (1975). *Intertidal invertebrates of the Central California Coast*. University of California, Los Angeles, California, 79 pp.
- ❖ Stegeman J. J., Binder, R. L., y Orren A. (1979). Hepatic and Extrahepatic microsomal electron transport components and Mixed Function Oxigenase in the Marine fish *Stenotomus versicolor*. *Biochemical Pharmacology*, 28:3431-3439.

- ❖ Stegeman, J. J. y Kaplan, H. B. (1981). Mixed Function Oxigenase activity and Benzo(a)pyrene metabolism in the barnacle *Balanus Eberneus* (Crustacea: Cirripedia). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 68C:55-61.
- ❖ Stegeman, J. J. (1985). Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the Western North Atlantic. *Marine Biology*, 89:21-30.
- ❖ Stegeman, J. J., Brouwer, M., T. D. G., Richard, B. A., Förlin, B. M., Sanders, y P. A. van Veld (1992). Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Eds., R. J. Hugget, R. A., Kimerly, P. M. Mehrle Jr. And H. L. Bergman. Lewis Publishers Inc., Chelsea, MI, 115 pp
- ❖ Winston, G. W., Mayeaux, M. H., y Heffernan, L. M. (1998). Benzo(a)pyrene Metabolism by the interdial sea anemone, *Bunodosoma cavernata*. *Marine Environmental Research*, 45(1): 89-100
- ❖ Winston, G. W. (1999). Development and Characterization of Sea Anemones as Bioindicators of Offshore Resource Exploitation and Environmental Impact. Technical Summary : MMS Publication 99-0037, 4 pp.
- ❖ Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analisis*. Prentice Hall, 4th edition, New Jersey. 663 pp.