

BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES EN CRUSTÁCEOS DECÁPODOS DULCEACUÍCOLAS

Lorente Camila Jazmín^{1,2}

¹ Instituto Nacional de Limnología (UNL-CONICET)

² Escuela Superior de Sanidad, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL)

Director: Negro Carlos Leandro

Codirector: Collins Pablo

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

La humanidad ha estado desde siempre íntimamente ligada a los ríos y demás sistemas acuáticos, utilizando los sitios cercanos a ellos para establecer asentamientos y desarrollar actividades de importancia económica y ambiental. Los contaminantes producidos en estas actividades pueden alcanzar los cursos de agua y afectar a la biota acuática (Elosegui y Sabater, 2009). Existen diversas metodologías relacionadas con la detección de compuestos químicos en el ambiente, los cuales permiten obtener información acerca de los tipos de contaminantes y sus concentraciones en diferentes matrices. Sin embargo, estos métodos se basan en la detección individual de cada compuesto buscado y los resultados obtenidos no permiten inferir directamente su efecto sobre la biota, ya que no ponderan los mecanismos biológicos de defensa (Padinha y col., 2000; Den Besten y Munawar, 2005). Las respuestas producidas a niveles bioquímicos, fisiológicos, morfológicos o histológicos en los seres vivos pueden ser utilizadas como biomarcadores del efecto de contaminantes, ya que estos indican que suficiente cantidad de un compuesto tóxico fue incorporado en un determinado organismo vivo durante suficiente tiempo como para provocar un efecto. Los cambios bioquímicos, como las variaciones en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo, son reconocidos como herramientas de alerta temprana (biomarcadores de exposición). La utilización de esta herramienta, así como también de indicadores de daño a niveles de organización biológica superiores, como a niveles histológicos y poblacionales, permitiría reconocer la contaminación de humedales por su efecto en los crustáceos decápodos, a través de biomonitoreos.

La exposición a plaguicidas y otros contaminantes puede causar un aumento en las sustancias reactivas de oxígeno (ROS), las cuales producirán un desbalance en el equilibrio oxidantes/antioxidantes de diferentes órganos de los crustáceos decápodos. El aumento en las ROS provocará un aumento en la concentración de enzimas relacionadas con los mecanismos antioxidantes, como método de defensa para evitar el daño oxidativo. Si la capacidad antioxidante no es suficiente, se observará un aumento en los indicadores de daño oxidativo, como el contenido de malonildialdehído proveniente de la peroxidación lipídica (LPO). Los mecanismos de defensa antioxidante serían los primeros en reaccionar (respuesta temprana), observándose el daño oxidativo en el caso de no ser suficiente la respuesta. El daño provocado se representaría luego en niveles de organización biológica superiores. Diversos autores han detectado modificaciones en los parámetros enzimáticos y no enzimáticos relacionados con el estrés oxidativo luego de la exposición a plaguicidas las cuales pueden ser utilizadas en biomonitoreos (Pinho y col., 2005; Ghedira y col. 2011).

Título del proyecto: Utilización de crustáceos decápodos en biomonitoreos.

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2015

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Negro Carlos Leandro

Además, la exposición permanente a estos contaminantes podría causar efectos perjudiciales en la reproducción de los crustáceos decápodos dulceacuícolas, incluyendo

alteraciones en la producción de espermatozoides. La reducción en el número de espermatozoides podría relacionarse con la disminución de la fertilidad en crustáceos decápodos, provocando una disminución de la población a corto y mediano plazo (Dunn y col., 2006; Hollows y col., 2007). Los estudios sobre los efectos ambientales en la fertilidad en crustáceos machos son actualmente limitados (Lewis y Ford, 2012). Estudios con anfípodos han demostrado que el conteo reducido de espermatozoides puede tener un impacto dramático en el éxito de la fertilización (Dunn y col., 2006; Lemaitre y col., 2009; Rondeau y Sainte-Marie, 2001). Estos resultados sugieren que en algunos crustáceos los impactos de los contaminantes en la cantidad del esperma producido podrían resultar en efectos posteriores a nivel de la población (Lewis y Ford, 2012). Sin embargo, no existen trabajos en los que se evalúe el efecto de la exposición a contaminantes sobre estas variables reproductivas en crustáceos decápodos dulceacuícolas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Reconocer y evaluar biomarcadores de exposición a contaminantes en crustáceos decápodos dulceacuícolas.

Objetivos específicos:

- Reconocer las diferencias en niveles enzimáticos y parámetros de estrés oxidativo no enzimáticos de crustáceos decápodos dulceacuícolas expuestos a plaguicidas.
- Reconocer los efectos sobre variables reproductivas en crustáceos decápodos machos.

METODOLOGÍA

Se colectaron individuos de la especie de cangrejo *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae) en la llanura de inundación del Río Paraná (31°30'S, 60°41'O; Santa Fe, Argentina), lejos de las ciudades y áreas de cultivos. Estos fueron mantenidos en laboratorio por un mes. Luego del período de aclimatación, los individuos fueron expuestos de manera individual a 0 (C0), 0.1 (C1) y 0.5 (C2) μg de clorpirifós L^{-1} . Estas concentraciones son similares a las encontradas por diferentes investigadores en muestras ambientales (Jergentz y col., 2005; Marino y Ronco, 2005). Durante los experimentos no se alimentó a los individuos. Seis individuos fueron extraídos luego de 12, 24, 48 y 96 horas de exposición cada uno. Luego, los cangrejos fueron crioadestesiados en agua con hielo (1 – 3 °C), abiertos por su cefalotórax y se tomaron muestras de hepatopáncreas y branquias, las cuales fueron preservadas a -80°C hasta su análisis. La extracción enzimática se realizó según Wiegand y col. (2000). Las actividades enzimáticas fueron determinadas por espectrofotometría usando un Shimadzu UV-210A (DOBLE-BEAM). La actividad de las Glutación-S-transferasas (GST) solubles (citosólicas), la Glutación reductasa (GR), Catalasa (CAT) Superóxido dismutasa (SOD) fueron determinadas según Habig y col. (1974), Tanaka y col. (1994), Claiborne (1985) y Scebba y col. (1998), respectivamente. En todos los casos cada muestra se midió por triplicado y el contenido de proteínas totales se determinó de acuerdo al método de Bradford (Bradford, 1976), a 595 nm, usando albúmina bovina como proteína estándar. La actividad enzimática fue expresada como nanokatalas por miligramo de proteína. El contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) fue cuantificado por espectrofotometría de acuerdo con Bellincampi y col. (2000). La LPO fue expresada como malonildialdehído (MDA) y determinada mediante la medición de la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) (Oakes y Van Der Kraak, 2003). El sobrenadante que contenía MDA fue medido por espectrofotometría (abs: 532 nm). Los niveles de TBARs fueron expresados como nmol mg^{-1} de tejido fresco utilizando un coeficiente de extinción molar de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Las comparaciones entre el control y los cangrejos expuestos

para cada momento se realizaron mediante ANOVA con post test de Tukey, luego de verificar la normalidad y homogeneidad de la varianza mediante el ensayo de Sahpiro-Wilk y Leven respectivamente (Zar, 1996). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$.

Para el recuento de espermatozoides se utilizaron individuos no expuestos a Clorpirifós, los cuales fueron crioadestesiados en agua con hielo (1 – 3 °C) y abiertos por su cefalotórax para la extracción de las gónadas, las cuales fueron preservadas a -80°C hasta su posterior análisis. Se realizó la adaptación de los métodos descritos por Dunn y col. (2006) y Yang y col. (2008) para la extracción de las gónadas y recuento de espermatozoides. La técnica adaptada consiste en extraer un testículo del animal, tomar una porción del mismo, aproximadamente la mitad, pesarlo y luego colocar la muestra en un tubo de homogeneización y completar hasta 1 ml con solución salina (concentración: 10 g/L). Homogeneizar durante 30 segundos, luego agregar 3 gotas de formalina (Formol:Eritrosina, 1:1), colocar el homogenato en una cámara de Sedgwick-Rafter y realizar el recuento bajo microscopio óptico a 40X. Se tomaron fotografías para realizar la identificación y caracterización de las distintas etapas de la espermatogénesis a partir de trabajos realizados con esta y otras especies de cangrejos decápodos (Binford, 1913; Simeó y col., 2009; Senkman, 2014).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

La exposición de *Z. collastinensis* a concentraciones ambientalmente relevantes de clorpirifós produjo modificaciones en las actividades de enzimas de estrés oxidativo (GST, GR, CAT y SOD) y un incremento general en los niveles de H₂O₂ en branquias y hepatopáncreas. Aunque la exposición a estas concentraciones de clorpirifós no fue letal, el incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno muestra el estrés oxidativo causado, que a su vez puede producir efectos en niveles de organización biológica superiores. Los cambios en las actividades enzimáticas y los niveles de H₂O₂ podrían ser una herramienta útil en biomonitoreos.

Luego de la puesta a punto de la técnica de recuento de espermatozoides se pudieron identificar distintas etapas de la espermatogénesis (Figura 1), siendo éstas: espermatogonia, espermatocito inicial, espermatocito final, espermatida y espermatozoide. Las espermatogonias son células madre que se dividen mitóticamente para dar lugar a los espermatocitos primarios. Estos últimos son células diploides que durante la meiosis pasarán por la división reduccional, formándose dos células haploides llamadas espermatocitos secundarios, células mucho más pequeñas que los primarios. Los espermatocitos secundarios inician rápidamente la segunda división meiótica y dan lugar a las espermatidas, que ya no sufren divisiones pero sí profundos cambios, como la descondensación nuclear, polarización celular, desarrollo acrosomal y crecimiento final que las transforman en espermatozoides maduros. El recuento de espermatozoides podría utilizarse como biomarcador para evaluar la contaminación de ambientes acuáticos.



Figura 1: muestra de testículo de *Z. collastinensis*, 40 X. Esp: Espermatogonia, Ei: Espermatocito inicial, Ef: Espermatocito final, Espa:

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G., 2000. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiology*, 122, 1379-1385.

- Binford R.**, 1913. The germ-cells and the process of fertilization in the crab *Menippe mercenaria*. *Journal of Morphology*, 24 (2), 147-201.
- Bradford M.M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Claiborne A.**, 1985. Catalase activity. *Book of methods in oxygen radical research*. Greenwald RA, CRC, Boca Raton, 283–284.
- Den Besten P.J., Munawar M.**, 2005. *Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends, and strategies*. CRC Press Taylor & Francis. Boca Raton, Estados Unidos. 296 pp.
- Dunn A.M., Andrews T., Ingreby H., Riley J., Wedell N.**, 2006. Strategic sperm allocation under parasitic sex-ratio distortion. *Biology Letters*, 2, 78-80.
- Elosegui A., Sabater S.**, 2009. *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Fundación BBVA. Bilbao, España. 444 pp.
- Ghedira J., Jebali J., Banni M., Chouba L., Bousetta H., López-Barea J., Alhama J.**, 2011. Use of oxidative stress biomarkers in *Carcinus maenas* to assess littoral zone contamination in Tunisia. *Aquatic Biology*, 14, 87-98.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B.**, 1974. Glutathione S transferases. The first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- Hollows C.F., Johnston E.L., Marshall D.J.**, 2007. Copper reduces fertilisation success and exacerbates Allee effects in the field. *Marine Ecology Progress Series*, 333, 51-60.
- Jergentz S., Mugni H., Bonetto C., Schulz R.**, 2005. Assessment of insecticide in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61, 817-826.
- Lemaitre J.F., Rigaud T., Cornet S., Bollache L.**, 2009. Sperm depletion, male mating behaviour and reproductive 'time-out' in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda). *Animal Behaviour* 77, 49–54.
- Lewis C., Ford A.T.**, 2012. Infertility in male aquatic invertebrates: a review. *Aquatic Toxicology*, 120-121, 79-89.
- Marino D., Ronco A.**, 2005. Cypermethrin and Chlopyrifos Concentration Levels in Surface Water Bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75, 820-826.
- Oakes K.D., Van Del Kraak G.J.**, 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63, 447-463.
- Padinha C., Santos R., Brown M.T.**, 2000. Evaluating environmental contamination in Ria Formosa (Portugal) using stress indexes of *Spartina maritima*. *Marine Environmental Research*, 49, 67- 78.
- Pinho G.L.L., Moura da Rosa C., Maciel F.E., Bianchini A., Yunes J.S., Proença L.A.O., Monserrat J.M.**, 2005. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61 (3), 353-360.
- Rondeau A., Sainte-Marie B.**, 2001. Variable mate-guarding time and sperm allocation by male snow crabs (*Chionoecetes opilio*) in response to sexual competition, and their impact on the mating success of females. *Biological Bulletin*, 201, 204–217.
- Scebba F., Sebastiani L., Vitagliano C.**, 1998. Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 104, 147-752.
- Senkman L.E.**, 2014. *Biología reproductiva de cangrejos tricodactílicos del Río Paraná Medio*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata, 189 pp.
- Simeó C.G., Ribes E., Rotlant G.**, 2009. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Tissue and cell*, 41, 345-361.
- Tanaka K., Sano T., Ishizuba K., Kitta K., Kawamura Y.**, 1994. Comparison of properties of leaf and root glutathione reductases from spinach. *Physiologia Plantarum*, 91, 353-358.
- Wiegand C., Pflugmacher S., Oberemm A., Steinberg C.**, 2000. Activity development of selected detoxication enzymes during the ontogenesis of the zebrafish (*Danio rerio*). *International Review of Hydrobiology*, 85 (4), 413-422.
- Yang G., Kille P., Ford A.**, 2008. Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates? *Aquatic Toxicology*, 88, 81-87.
- Zar J.H.**, 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New York, Estados Unidos, 662 pp.