

ENSAYOS PRELIMINARES SOBRE CITOCROMO P₄₅₀ EN MOLUSCOS BIVALVOS DE LAS COSTAS DE LA VIII REGION, CHILE CENTRAL

ANNY RUDOLPH¹ y MARIA I. RUDOLPH²

ABSTRACT: Rudolph A. & M. I. Rudolph. 1993. Preliminary assays on cytochrome P₄₅₀ in bivalve molluscs at coastal zone of VIII Region, central Chile. *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 28(2): 261-269.

Mytilus edulis mixed-function oxidase enzyme cytochrome P₄₅₀ that catalyzes oxidation of a variety of endogenous and exogenous compounds, increases its activity when the organism is exposed to petroleum hydrocarbons. This could constitute an early biochemical signal of environmental contamination, potentially toxic, for the organism that lives in the ecosystem. The cytochrome P₄₅₀ activity was studied in molluscs bivalves from a natural population of the San Vicente and Concepcion Bays, this was related with species maintained in acuarium free of contamination. The control samples and the samples of *Semimytilus algosus* recolected in Lengua (San Vicente Bay) showed mean activity similar to control sample. Nevertheless, the samples recolected in the Concepcion Bay, showed a mean activity of 0,047 pmol/mg protein, two times higher than control samples. It is likely that this increased activity of cytochrome P₄₅₀ could be due to a response of these species to the presence of xenobiotics that are produced by the industries of fisheries processes that eliminate their wastes to the Concepción Bay.

Key words: cytochrome P₄₅₀, mussel, digestive gland microsomes, organic pollutants.

RESUMEN: Rudolph A. & M. I. Rudolph. 1993. Ensayos preliminares sobre citocromo P₄₅₀ en moluscos bivalvos de las costas de la VIII Región, Chile Central. *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 28(2): 261-269.

El citocromo P₄₅₀ del sistema enzimático de función mixta, cataliza la oxidación de diversos compuestos endógenos y exógenos. La actividad enzimática se incrementa en *Mytilus edulis*, cuando el organismo es expuesto a hidrocarburos. Esto podría constituir una señal bioquímica temprana de contaminación ambiental, potencialmente tóxica, para los organismos que viven en el ecosistema. Se estudió la actividad del citocromo P₄₅₀ en moluscos bivalvos de bancos naturales de las bahías San Vicente y Concepción, en relación a muestras mantenidas en acuarios libres de contaminación. Los ejemplares extraídos del sector de Lengua (bahía San Vicente) mostraron una actividad muy similar a los controles mantenidos en el laboratorio libres de contaminación. Los ejemplares de bahía Concepción, en cambio, mostraron una actividad de citocromo P₄₅₀ promedio de 0,047 pmol/mg proteína, dos veces superior a los controles. Es probable que el aumento en la actividad del citocromo P₄₅₀ se deba a la presencia de xenobióticos que origina la industria reductora de pescado, que elimina residuos en esa área.

Palabras claves: Citocromo P₄₅₀, bivalvos, microsomas de glándulas digestiva, contaminantes orgánicos.

INTRODUCCION

La creciente incorporación al medio marino de sustancias xenobióticas, crea un estado de estrés para las comunidades naturales, situación que ha estimulado la búsqueda de indicadores, sistemas enzimáticos, que permitan detectar el problema de contaminación cuando el proceso de deterioro aún puede ser revertido.

El sistema de monooxigenasas citocromo P₄₅₀ se encuentra involucrado en la transformación a metabolitos polares de un amplio rango de compuestos orgánicos (Hodgson & Dauterman 1982). Actúa metabolizando compuestos endógenos como esteroides y ácidos grasos y se le considera como un mecanismo detoxificador de contaminantes ambientales, entre los que se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Haux & Forlin 1988; Livingstone 1990, Yamashita *et al.* 1992). Sin embargo, dependiendo del compuesto metabolizado, también se pueden formar metabolitos electrofílicamente reactivos *i.e.* cancerígenos, mutagénicos o agentes citotóxicos. Puesto que los productos intermedios de la metabolización de xenobióticos pueden llegar, en algunos casos, a ser más dañinos que sus antecesores, éste sistema de monooxigenasas, es considerado como componente de un sistema detoxificador/intoxicador (Moore *et al.* 1980, Livingstone 1985).

El grado en el cual éstas funciones oxidativas ocurren en los diferentes individuos, dependería de la complementación de las diferentes isoenzimas de citocromo P₄₅₀ de su función catalítica y de su regulación (Stegeman *et al.*

1990). Además, pueden ser inducidas por hidrocarburos como se ha demostrado anteriormente tanto en vertebrados como en el bivalvo común *Mytilus edulis* (Bayne *et al.* 1979, Livingstone 1990, Mazel 1971, Spry *et al.* 1989, Fossi *et al.* 1991, Yamashita *et al.* 1992).

En el presente trabajo se estudia la actividad citocromo P₄₅₀ en bivalvos provenientes de bancos naturales ubicados en el golfo de Arauco y dos bahías, situadas entre los 36° y 37° 20'S. Estos sectores reciben un impacto antrópico distinto. Los resultados obtenidos de las distintas localidades de muestreo se relacionan entre sí y comparan con organismos mantenidos en laboratorio.

Este es un trabajo preliminar, diseñado con el fin de analizar el fenómeno de inducción del sistema de oxidasas de función mixta, en algunos moluscos endémicos de la costa central de Chile. El objetivo final es investigar la posibilidad que organismos endémicos pudieran ser utilizados como bioindicadores de problemas de contaminación por xenobióticos.

MATERIALES Y METODOS

SITIOS DE COLECTA DE ORGANISMOS.

El estudio se realizó en organismos recolectados desde bancos naturales del golfo de Arauco, bahía San Vicente y bahía Concepción (Fig 1). Dichos sistemas costeros forman parte de un conjunto de bahías templadas, entre las latitudes 36° y 37°20'S de la zona centro sur de Chile.

En el golfo de Arauco y desde un banco natural ubicado en la localidad de

Colcura (Fig. 1) se extrajo *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) y *Mulinia edulis* (King y Broderip, 1835) Gray, 1837. Los ejemplares de *Choromytilus chorus*, cuyas tallas fluctuaban entre 4 y 5 cm, fueron mantenidos por 6 meses en condiciones de laboratorio con agua de mar filtrada y alimentados con policultivo de microalgas (*Isochrysis* sp. *Dunaliella* sp., *Nannochloris* sp.).

En la orilla sur de la bahía San Vicente fueron recolectados *Semimytilus algosus* (Gould, 1850), provenientes de

un banco natural ubicado en el intermareal de la playa de Lengua, cercano a una pradera de algas y al parque nacional Hualpen (ver Fig. 1).

En el sector sureste de la cabeza de la bahía Concepción y desde el submareal se recolectaron *Semimytilus algosus*. El sitio de colecta se ubica a unos 600 m del área de descarga de efluentes de plantas procesadoras de pescado y de la desembocadura de la marisma Rocuant (ver Fig. 1).

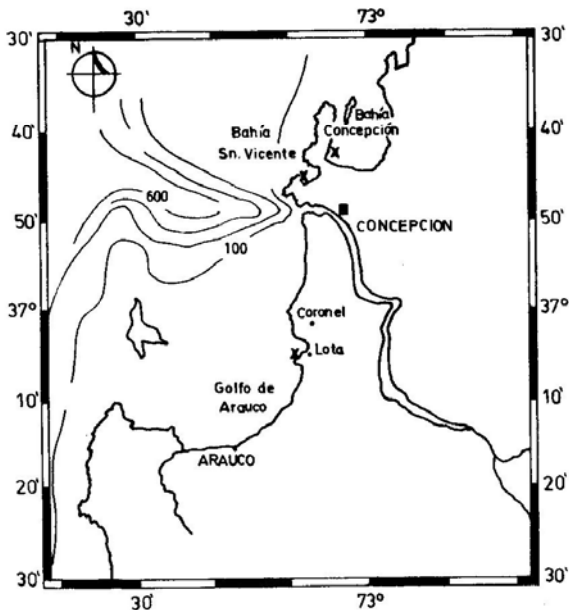


Fig. 1. Esquema de la costa de la VIII Región. Se muestra con x la ubicación aproximada de colecta de los organismos, en bahía Concepción, bahía San Vicente y golfo de Arauco.

PROCEDIMIENTO DE ANALISIS.

Para la estandarización de la técnica se trabajó con hígados de ratas de laboratorio, previamente tratadas con fenobarbital, de acuerdo a la metodología de Omura & Sato (1964).

Todos los organismos fueron procesados, *i.e.*, extraído su sistema digestivo en frío, inmediatamente antes del análisis de citocromo. En bivalvos se utilizó una adaptación de las metodologías propuestas por Livingstone & Farrar (1984) y Livingstone (1988). Para ello, se trabajó con grupos de 6 a 8 individuos (4 a 5 cm). Se pesó y homogenizó el tejido utilizando buffer (Tris HCl 20 mM; sucrosa 0,5 M; KCl 0,15 M; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 100 μ M; pH 7,6) en una relación de 1:4. Luego siempre a 4°C, el tejido homogenizado se centrifugó a 500 g por 30 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 12.000 g por 45 minutos y 100.000 g por 60 minutos. El pellet microsomal se lavó con bufer (Tris HCl 20 mM, glicerol 20% w/v, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) y se diluyó en buffer (Tris HCl 5 mM, pH 6), hasta obtener aproximadamente 10 mg/ml de proteína. Para la lectura, se utilizó un total de 1 ml, en una relación de 0,850 ml de agua destilada y 0,150 ml de microsoma resuspendido.

La cantidad de citocromo P₄₅₀ presente en la muestra microsomal se determinó por medio de espectros diferenciales, entre 400 y 550 nm. Para ello se realizó una reacción de óxido-reducción adicionando ditionito de sodio (línea base), y se burbujeó CO a la cubeta de reacción. El contenido de cito-

cromo P₄₅₀ de la muestra se estimó por el incremento de la absorbancia, utilizando el coeficiente de extinción molar 91 mM⁻¹cm⁻¹ (Omura & Sato 1964) y la concentración de proteínas (Lowry *et al.* 1951). Las muestras se leyeron a temperatura ambiente, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a lo contradictorio de la información respecto de la presencia y actividad del sistema citocromo en invertebrados marinos (Livingstone 1993), se presenta como referencia en las Fig. 2a y 2b el espectro de absorbancia del sistema citocromo inducido con fenobarbital en ratas. La Fig. 2a muestra el espectro de línea base de la preparación microsomal, en que el sistema citocromo ha sido reducido por la adición de ditionito de sodio y en Fig. 2b el espectro diferencial del sistema citocromo el cual es selectivamente oxidado al burbujear monóxido de carbono en la cubeta de reacción.

Los espectros siguientes corresponden al trabajo con bivalvos, aunque la metodología básicamente es la misma que para vertebrados, es necesario utilizar antioxidantes como dithiothreitol (DTT), un inhibidor de proteasas el fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), rangos de pH distinto en los buffer y una escala ampliada dado que la cantidad y actividad de éste sistema enzimático es menor en invertebrados (ver metodología).

La Fig. 2c muestra el espectro diferencial de microsomas de tejido *Ch. chorus* mantenidos por seis meses en

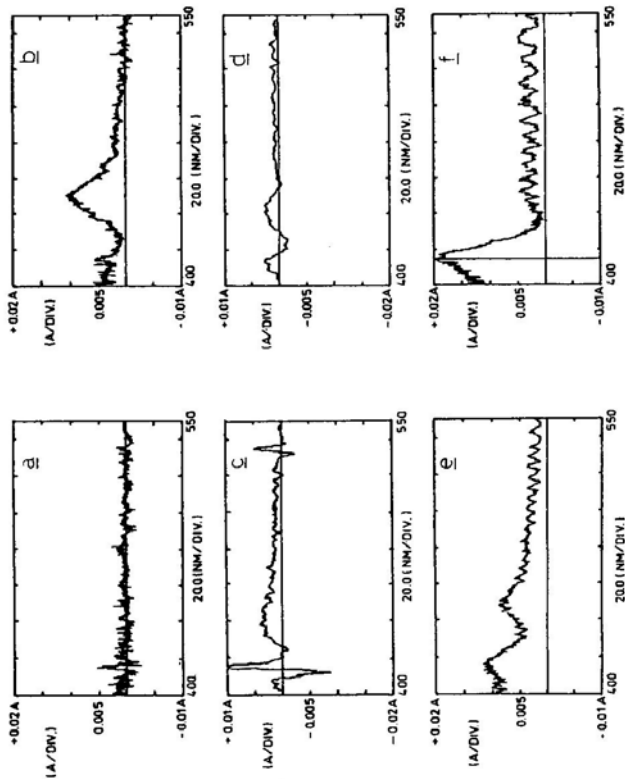


Fig. 2. Espectro de absorvancia para los diferentes organismos estudiados: a: línea base para microsome de rata, b: respuesta de citocromo P₄₅₀ inducido en rata, c: respuesta de citocromo P₄₅₀ en *Ch. chloris* control, d: respuesta de citocromo P₄₅₀ en *S. algosus* de bahía San Vicente, e: respuesta de citocromo P₄₅₀ en *S. algosus* de bahía Concepción y f: espectro de *Mulinaria* sp.

condiciones de laboratorio. El objetivo de mantener los *Ch. chorus* en condiciones libres de contaminación por un largo período, fue obtener un espectro de referencia del sistema enzimático en microsomas de sistema digestivo, sin la acción de contaminantes.

La Fig. 2d muestra el espectro diferencial del sistema citocromo obtenido de microsomas de *S. algosus*, al igual que en la Fig. 2c, en los resultados no se observa un pick definido que indique que sus sistema citocromo se encuentra inducido por la presencia de algún xenobiótico. Estos bivalvos fueron recolectados desde un banco natural en el submareal de la playa de Lenga en la bahía San Vicente. Los resultados obtenidos desde las preparaciones microsomales de tejido digestivo indicarían que en esta zona la contaminación posible por xenobióticos no estaría afectando a la población de *S. algosus*. Esto último, podría deberse a la forma de circulación de la bahía. Las aguas procedentes de la plataforma continental adyacente, entran preferentemente por el sector sur, en que se ubica la playa de Lenga, y salen por el sector norte con un tiempo de residencia menor a un día (Ahumada *et al.* 1989).

La Fig. 2e muestra el espectro diferencial del sistema citocromo obtenido desde microsomas de *S. algosus*, recolectados en la cabeza de la bahía Concepción, cerca de efluentes de plantas procesadoras de pescado y del puerto de Talcahuano. A diferencia de los espectros obtenidos de los otros bivalvos, éste presenta un claro pick en 450 nm. El pick cercano a 420 nm observado en la figura correspondería al cito-

romo degradado e inactivo (Hodgson & Dauterman 1982). La concentración de citocromo P₄₅₀ presente en las muestras se estimó en 0.047 pmol/mg de proteína microsomal, aproximadamente dos veces superior al estimado en los bivalvos mantenidos en laboratorio y los recolectados en la playa de Lenga de la bahía San Vicente y órdenes de magnitud menor que la cantidad presente en hígado de rata estimulado con fenobarbital.

Este aumento significativo en la concentración del sistema citocromo P₄₅₀ en los bivalvos recolectados en la cabeza de bahía Concepción, permite deducir que en estos bivalvos se encuentra inducido el sistema multienzimático al que pertenece el sistema citocromo P₄₅₀ por la presencia de xenobióticos en el área, grasas provenientes de plantas procesadoras de pescado e hidrocarburos producto de la actividad portuaria (Rudolph & Ahumada 1989).

A diferencia de la bahía San Vicente, la bahía Concepción presenta menor profundidad y un tiempo de residencia mayor de sus aguas, estimado entre 2,5 a 3,2 días en verano (Arcos & Wilson 1984, Mesias & Salinas 1986) y 24 días en invierno (Arcos & Wilson 1984). Además esta sujeta a activos procesos de surgencia de sus aguas subsuperficiales (Arcos & Navarro 1986), lo que hace que los organismos que la habitan esten más expuestos a sus contaminantes y deban mantener activo los sistemas enzimáticos que les permitan contrarrestar hasta donde les es posible la acción de tóxicos, en este caso el sistema citocromo P₄₅₀ analizado.

En razón a que en las costas de la

VIII Región la almeja (*Mulinia edulis*) es abundante y de importancia económica y teniendo como objetivo básico este trabajo, reunir información sobre el sistema citocromo en bivalvos, se realizó preparaciones de microsoma de sistema digestivo de almeja. Sin embargo en esta especie, utilizando la metodología descrita para choritos, no fue posible observar en las preparaciones de microsoma de almeja, un pick atribuible a citocromo P₄₅₀ (Fig. 2f), lo que podría indicar que la técnica utilizada no es la adecuada para ésta especie y/o que la concentración del sistema multienzimático es inferior a la escala en que se realizó el análisis.

Este es un estudio preliminar, se hace necesario desarrollar un estudio más amplio sobre la influencia ambiental (i.e., T° cambio estacional y el estado reproductivo y nutricional de los organismos), para estandarizar el método y decidir su posible aplicación como método de diagnóstico de contaminación.

La evidencia encontrada en relación a la inducción de un aumento en la concentración citocromo P₄₅₀ en aquellos organismos recolectados en bahía de

Concepción, cerca del área de descarga de efluentes con altas concentraciones de orgánicos y materia grasa, permitiría inferir que el fenómeno de inducción enzimática, podría ser postulado como un índice de respuesta a la contaminación por xenobióticos existente en el lugar. Pero es indudable que se requiere de información adicional en relación a cómo se regula el sistema citocromo P₄₅₀ en estos organismos y cual o cuales de los xenobióticos presentes en el área, inducen esta respuesta.

CONCLUSION

Se ha postulado que en moluscos, la inducción del sistema multienzimático detectado a través de la medición del citocromo P₄₅₀, podría ser un método rápido y selectivo para identificar contaminación por hidrocarburos en el ambiente acuático. Los resultados presentados, en que se cuantifica la actividad de citocromo P₄₅₀ en bivalvos de dos bahías de la VIII Región, demuestran una estrecha correlación entre la actividad del citocromo P₄₅₀ y el grado de contaminación de la zona desde donde fueron extraídos.

LITERATURA CITADA

- Ahumada, R.; Rudolph, A.; Madariaga, S. & F. Carrasco. 1989. Descripción de las condiciones oceanográficas de la bahía San Vicente y antecedentes de los efectos de la contaminación. *Biología Pesquera* 18: 37-52.
- Ahumada, R. & A. Rudolph. 1989. Residuos líquidos de la industria pesquera: alteraciones ambientales y estrategias de eliminación. *Ambiente y Desarrollo* 1: 147-161.
- Arcos, D. & N. Navarro. 1986. Análisis de un índice de surgencia para la zona de Talcahuano-Chile. *Investigaciones Pesqueras (Chile)* 33: 91-98.
- Arcos, D. & R. Wilson. 1984. Upwelling and the distribution of chlorophyll a within the Bay of Concepción, Chile. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 18: 25-35.

- Bayne B.L.; Moore, M.N.; Widdows, J.; Livingstone, D.R. & P. Salkeld. 1979. Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. *Philosophical Transaction of Royal Society of London B*. 286: 563-581.
- Fossi, M.C.; Leonzio, C.; Focardi, S.; Lari, L. & A. Renzoni. 1991. Modulation of mixed-function oxidase activity in Black-headed gulls living in anthropic environments: Biochemical acclimation or adaptation?. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 1179-1188.
- Haux, C. & L. Forlin. 1988. Biochemical methods for detecting effects of contaminants on fish. *Ambio* 17(6): 376-380.
- Hodgson, E. & C. Dauterman. 1982. Biochemical Toxicology: Definition and Scope. In: Hodgson E. & F. Guthrie (eds), *Introduction to Biochemical Toxicology* 1:1-9. Elsevier Science Publishing Co. Inc, New York.
- Livingstone, D. R. 1985. Responses of the detoxication/toxication Enzyme Systems of molluscs to organic pollutants and xenobiotics. *Marine Pollution Bulletin* 16(4): 158-164.
- Livingstone, D. R. 1988. Cytochrome P₄₅₀ and oxidative metabolism in invertebrates. *Biochemical Society Transaction: Development of mixed-function oxidases* 18: 15-19.
- Livingstone, D. R. 1990. Cytochrome P₄₅₀ and oxidative metabolism in invertebrates. *Biochemical Society Transaction: Development of mixed-function oxidases* 18: 15-19.
- Livingstone, D. R. 1993. Review, Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57: 195-211.
- Livingstone, D. & S. Farrar. 1984. Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo(a)pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L. *Sci. Total Environ.*, 39: 209-235.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Mazel, P. 1971. Experiments illustrating drug metabolism in vitro. In: *Fundamental of drug metabolism and drug disposition*. (The Wichans & Wilkins Company Eds.) Baltimore Md. 31202. USA. 980 p.
- Mesias, J. & S. Salinas. 1986. Corrientes en la bahía de Concepción, Chile. *Biología Pesquera* 15: 55-62.
- Moore, M.N.; Livingstone, D.R.; Donkin, P.; Bayne, B.L.; Widdows, J. & D.M. Lowe. 1980. Mixed function oxygenases and xenobiotic detoxication/toxication systems in bivalve molluscs. *Helgolander Meeresunters* 33: 278-291.
- Omura, T. & R. Sato. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal Biological Chemistry* 239: 2370-2378.
- Rudolph, A. & R. Ahumada. 1989. Intercambio de nutrientes entre una marisma con una fuerte carga de orgánicos y las aguas adyacentes. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción, Chile* 58: 151-169.

- Spry, J.A.; Livingstone, D.R.; Wiseman, A.W.; Gibson, G.G. & P.S. Goldfarb. 1989. Cytochrome P₄₅₀ gene expression in the common mussel *Mytilus edulis*. *Biochemical Society Transactions* 17: 1013-1014.
- Stegeman, J.J.; Woodin, B.R. & R.M. Smolowitz. 1990. Structure, function and regulation of cytochrome P₄₅₀ forms in fish. *Biochemical Society Transaction: Development of mixed-function oxidases* 18: 19-22.
- Yamashita, N.; Shimada, T.; Tanabe, S.; Yamazaki, H. & R. Tatsukawa. 1992. Cytochrome P₄₅₀ forms and its inducibility by PCB isomers in Black-headed gulls and Black-tailed gulls. *Marine Pollution Bulletin* (24) 6: 316-321.