

## NOTA BREVE/BRIEF NOTE

# MELANOMACRÓFAGOS HEPÁTICOS Y ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATION S-TRANSFERASA EN *Leptodactylus chaquensis* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE) COMO BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO POR LA EXPOSICIÓN A CLORPIRIFOS

## Liver Melanomacrophages and Glutathione S-Transferase Activity in *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) as Biomarkers of Oxidative Stress Due to Chlorpyrifos Exposition

Ivan HUESPE<sup>1</sup>, Mariana CABAGNA-ZENKLUSEN<sup>2</sup>, Lucila Marilén CURI<sup>3</sup>, Paola PELTZER<sup>3</sup>, Maximiliano Andrés ATTADEMO<sup>3</sup>, Noelia VILLAFañE<sup>2</sup>, Rafael LAJMANOVICH<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Litoral (UNL). Paraje El Pozo S/N, (3000). Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup> Cátedra de Morfología Normal, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Paraje El Pozo S/N, (3000), Santa Fe, Argentina.

<sup>3</sup> Cátedra de Ecotoxicología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Paraje El Pozo S/N, (3000). Santa Fe, Argentina.

**For correspondence.** [lucilacuri@gmail.com](mailto:lucilacuri@gmail.com)

**Received:** 1<sup>st</sup> November 2016, **Returned for revision:** 4<sup>th</sup> April 2017, **Accepted:** 26<sup>th</sup> April 2017.

**Associate Editor:** John Charles Donato Rondón.

**Citation/Citar este artículo como:** Huespe I, Cabagna-Zenkhusen M, Curi LM, Peltzer P, Attademo MA, Villafañe N, Lajmanovich R. Melanomacrófagos hepáticos y actividad de la enzima Glutathione S-Transferasa en *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) como biomarcadores de estrés oxidativo por la exposición a clorpirifos. Acta biol. Colomb. 2017;22(2):234-237. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n2.60823>

### RESUMEN

Se cuantificaron y compararon los melanomacrófagos (MM) y la actividad de la enzima Glutathione S-Transferasa (GST) en hígados de ejemplares adultos de *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) colectados en un cultivo de arroz (CA) (siete días posteriores a la aplicación de clorpirifos, CPF) y en un sitio de referencia (SR) en el departamento San Javier, provincia de Santa Fe (Argentina). El análisis histológico reveló una mayor cantidad ( $p = 0.028$ ) y área ocupada por MM ( $p = 0.017$ ) y se registró una inhibición en la actividad de la GST ( $p = 0.030$ ) en individuos del CA respecto a los del SR. Los efectos descriptos evidencian el riesgo ecotoxicológico para los anuros en los cultivos de arroz con aplicaciones de CPF.

**Palabras clave:** anuros, biomarcadores, cultivos de arroz, hígados.

### ABSTRACT

We quantified and compared the hepatic melanomacrophage (MM) and glutathione S-transferase (GST) enzyme activity (two oxidative stress biomarkers) in the liver of *Leptodactylus chaquensis* adults (Anura, Leptodactylidae) collected in a rice field (CA) in San Javier department, Santa Fe (Argentina), seven days after the application of chlorpyrifos and in a reference site (SR). The histological analysis revealed a significant amount ( $p = 0.028$ ) and area occupied by MM ( $p = 0.017$ ) in livers of CA compared to SR. Furthermore, a significant inhibition of GST activity was recorded in the CA frogs compared to the SR ( $p = 0.030$ ). The histopathological and enzymatic effects provide evidences of ecotoxicological risk for anurans in rice field with CPF application.

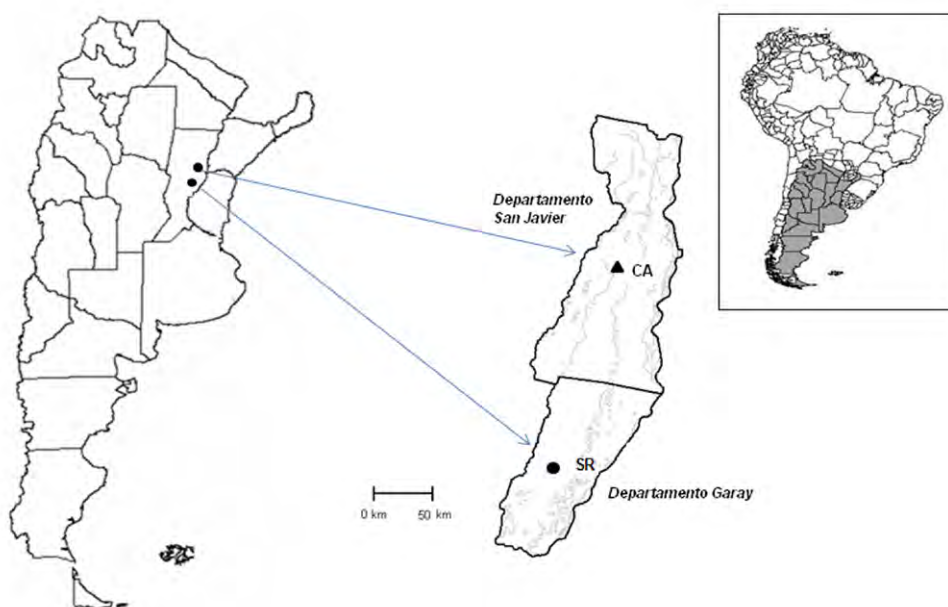
**Keywords:** anurans, biomarkers, liver, rice field.



El objetivo del presente trabajo fue cuantificar dos biomarcadores de estrés oxidativo (a. inmunohistológico, melanomacrófagos-MM y b. bioquímico, Glutathion S-transferasa-GST) implicados en la detoxificación en el hígado de *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) provenientes de un cultivo de arroz, luego de la aplicación de clorpirifos (CPF), y contrastarlos con ejemplares de un sitio de referencia en la provincia de Santa Fe (Argentina). El cultivo de arroz (CA) se localizó en el departamento San Javier, provincia de Santa Fe, Argentina (30°05'S-59°53' W), en donde en un trabajo previo se ha registrado mortalidad de anuros adultos de forma casi inmediata luego de la aplicación de este insecticida, como así también se ha descartado mediante análisis de muestra de agua la presencia de otros agroquímicos (Attademo *et al.*, 2015). Y el sitio de referencia (SR) (libre de aplicación de plaguicidas), a una distancia de 50 km del anterior, en humedales asociados al río Paraná (31°10'S- 60°15'W) en el departamento de Garay (Fig. 1). En el CA, siete días previos al muestreo, se aplicó el insecticida organofosforado CPF (48 %, Terminator®, AGROS soluciones, Argentina), en una dosis de de 800 ml/hectárea. *Leptodactylus chaquensis*, por su abundancia y representatividad en los arrozales es considerada una especie centinela (Attademo *et al.*, 2011) de amplia distribución en Argentina y se encuentra categorizada como “no amenazada” (Vaira *et al.*, 2012). Se recolectaron individuos adultos machos de *L. chaquensis* (n=nueve, en cada sitio) que fueron trasladados al laboratorio. Los ejemplares fueron pesados (P) y se midió la longitud hocico-cloaca (LHC). Con el P y LHC

se calculó el Factor de condición animal (FCA), según la ecuación de Bagenal y Tesch (1978):  $FCA = P(g) * 100 / LHC(mm)$ . Posteriormente fueron eutanizados siguiendo el protocolo de la ASIH *et al.* (2004) y la aprobación del comité de ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-UNL). A cada espécimen se le extrajo el lóbulo hepático derecho y se fijó con formaldehído al 10 %. Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo estándar de deshidratación, inclusión en parafina y luego se realizaron cortes seriados de 5  $\mu$ m de espesor que fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina (H/E), para evaluar las alteraciones hepatocitarias. Para cuantificar los MMS se siguió con modificaciones la metodología de Sayed y Jounes (2016). Para la determinación de parámetros morfométricos (área total, diámetros máximos y mínimos de los MM), se fotografiaron 30 campos al azar (N = 15 campos del primer corte y N = 15 del último corte de la serie). Este análisis se realizó utilizando el software Image Pro Plus (Media-Cybernetics Inc., version 4.5). Los fragmentos restantes del hígado se homogeneizaron para analizar la actividad de la enzima Glutathion S-Trasferasa siguiendo el método de Habig *et al.* (1974). Para evaluar las diferencias en los diferentes biomarcadores histológicos y enzimáticos entre SR y CA, se realizaron pruebas de *t* de Student considerando un  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. Lotes de referencia de *L. chaquensis* se depositaron en la colección de anfibios de la FBCB-UNL (números PL-FBCB N° 3819; SR y PL-FBCB N° 3820; CA).

Los valores promedios de P (g) y LHC (mm) para CA fueron  $51.9 \pm 1.3$  y  $13.02 \pm 2.7$ ; y para SR fueron  $52.3 \pm 1.13$



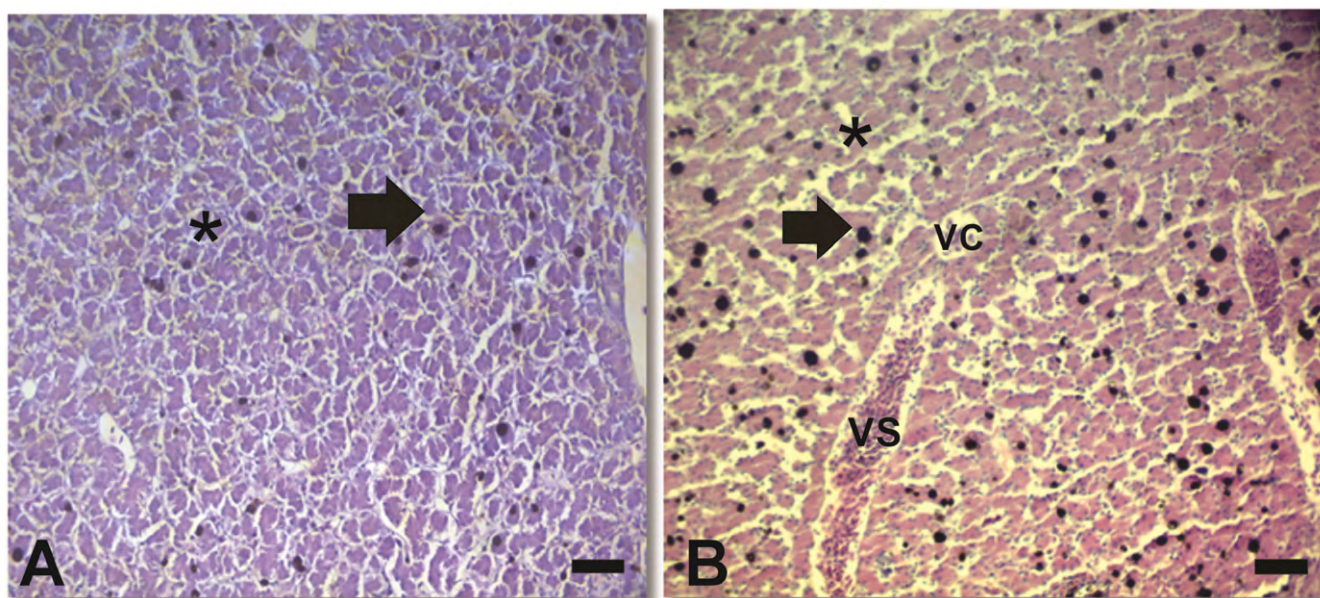
**Figura 1.** Áreas de muestreo en la provincia de Santa Fe (Argentina). CA: Cultivo de arroz, SR: sitio de referencia.

y  $14.31 \pm 2.9$  respectivamente. Los individuos de CA ( $10.50 \pm 0.70$ ), no presentaron diferencias significativas en el FCA con respecto a los individuos del SR ( $11.91 \pm 1.08$ ) ( $t = 0.96$ ,  $p = 0.202$ ). Los MM en hígados de *L. chaquensis* provenientes del SR presentaron una distribución aleatoria en el parénquima hepático, con un promedio de 92 ( $\pm 1.62$ ) MM, y un área total promedio de  $15649 (\pm 366.3) \mu\text{m}^2$  por campo de  $20 \times$  (Fig. 2A). El tamaño medio de los MM fue de  $160 \mu\text{m}^2$  con un máximo de  $2484.62 \mu\text{m}^2$  y un mínimo de  $43.25 \mu\text{m}^2$ . En el CA, los MM fueron significativamente mayores en número ( $t = 4.49$ ;  $p = 0.028$ ), con una media de 128 ( $\pm 3.4$ ). Y el área ocupada fue mayor por campo de  $20 \times$  ( $t = 3.66$ ;  $p = 0.017$ ), con un promedio de  $23725 (\pm 728.53) \mu\text{m}^2$  (Fig. 2B). El tamaño medio de los MM de CA fue de  $173.3 \mu\text{m}^2$  con un máximo de  $3506.34 \mu\text{m}^2$  y un mínimo de  $43.25 \mu\text{m}^2$ . Un similar aumento en los MM, fue observado por Fenoglio *et al.* (2005) en hígados de *Rana esculenta* provenientes de arrozceras. Además, Pérez-Iglesias *et al.* (2016) cuantificaron los niveles de melanina en los MM y hallaron una correlación con la concentración del herbicida glifosato a la que fueron expuestos individuos de *Leptodactylus latinasus*. También se ha hallado la misma correlación luego de la exposición al insecticida organofosforado Reldan 40EC (Paunescu *et al.*, 2010), y al cadmio (Loumbourdis y Vogiatzis, 2002). El incremento en el número y área ocupado por los MM puede explicarse por su rol en los procesos de detoxificación de agentes oxidantes, y su relación con la inmunidad innata o adaptativa debido a su actividad fagocítica (van der Oost *et al.*, 2003; Franco-Belussi *et al.*, 2013). De esta manera diferentes autores consideran a estos como biomarcadores

inmunohistológicos de contaminación ambiental (Wolke, 1992).

La glutatión-S-transferasa (GST) hepática, es utilizada como biomarcador bioquímico, relacionada con la detoxificación de agroquímicos y el stress oxidativo (Haratym-Maj, 2002). Los niveles de actividad de la GST variaron entre los dos sitios, observándose una inhibición significativa en los individuos de *L. chaquensis* del CA ( $t = 2.165$ ,  $p = 0.030$ ), con un promedio de  $417.72 (\pm 28.28) \text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteínas totales (PT), respecto de los individuos del SR cuyo promedio fue mayor  $521.83 (\pm 40.36) \text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de PT. La inhibición de esta enzima sugiere que podría haber una mayor desintoxicación de contaminantes (o compuestos endógenos) susceptibles de interactuar con la GST. Attademo *et al.* (2015) al exponer individuos adultos de *Lysapsus limellus* a dosis de uso agronómico de CPF en las arrozceras, observaron una inhibición de la GST en estómagos e hígados. La sensibilidad de las diversas especies acuáticas al CPF es variable (Giesy *et al.*, 1999). Los diversos estudios realizados se han enfocado en el efecto sobre larvas de anuros (Dimitrie y Sparling, 2014; Liendo *et al.*, 2015; Sotomayor *et al.*, 2015). No contándose con antecedentes sobre los efectos hepáticos en adultos de anfibios producidos por dosis reales de aplicación de CPF.

El aumento de los melanomacrófagos y la inhibición de la actividad enzimática de la GST en el hígado de adultos de *Leptodactylus chaquensis*, evidencian el estrés oxidativo y en consecuencia el riesgo ecotoxicológico al que están expuestos estos organismos debido principalmente al intenso uso de CPF en estas arrozceras.



**Figura 2.** Melanomacrófagos (MM, flechas negras) en hígados de *L. chaquensis* del SR (A) y de CA (B), obsérvese la mayor cantidad de MM en el CA. Asteriscos: hepatocitos, VS: vascularización, VC: vena central. Tinción: HE, aumento: 20 x, escala: 10 $\mu\text{m}$ .



**AGRADECIMIENTOS**

Los autores de este trabajo agradecemos a los proyectos ANPCyT, FONCyT, PICT N° 470, SECTeI-ASaCTely CAI+D-UNL, a Fernanda Izaguirre y a Gabriel Janney por sus contribuciones.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflict of interest.

**REFERENCIAS**

- ASIH HL, SSAR. Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research. Herpetological Animal Care and Use Committee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists: Washington DC, USA; 2004. p. 1-43. Available in: <http://www.asih.org/sites/default/files/documents/resources/guidelinesherpsresearch2004.pdf>
- Attademo AM, Cabagna-Zenklusen M, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Junges C, Bassó A. B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). *Ecotoxicology*. 2011;20:274-282. Doi:10.1007/s10646-010-0579-8.
- Attademo AM, Peltzer PM, Lajmanovich RC, Cabagna M, Junges CM, Lorenzatti E, *et al.* Biochemical changes in certain enzymes of *Lysapsus limellum* (Anura: Hylidae) exposed to chlorpyrifos. *Ecotox Environ Safe*. 2015;113:287-294. Doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.021.
- Bagenal TB, Tesch FW. Age and growth. In: Bagenal T, Editor). *Methods for assessment of fish production in fresh water*. Blackwell Scientific Publication: Oxford; 1978. p. 101-136.
- Dimitrie DA, Sparling, DW. Joint toxicity of chlorpyrifos and endosulfan to Pacific treefrog (*Pseudacris regilla*) tadpoles. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2014;67(3):444-452.
- Fenoglio C, Boncompagni E, Fasola M, Gandini C, Comizzoli S, Milanesi G. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotox Environ Safe*. 2005;60(3):259-268. Doi:10.1016/j.ecoenv.2004.06.006.
- Franco-Belussi L, Castrucci AM, Oliveira C. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7- $\alpha$ melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zool*. 2013;116:316-324. Doi:10.1016/j.zool.2013.06.003.
- Giesy JP, Solomon KR, Coates JR, Dixon KR, Giddings JM, Kenaga EE. Chlorpyrifos: ecological risk assessment in North American aquatic environments. *Rev Environ Contam Toxicol*. 1999;160:1-129.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby W. GlutathioneS-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974;249:7130-7139.
- Haratym-Maj A. Hematological alterations after pyrethroid poisoning in mice. *Ann Agric Environ Med*. 2002;9:199-206.
- Liendro N, Ferrari A, Mardirosian M, Lascano CI, Venturino A. Toxicity of the insecticide chlorpyrifos to the South American toad *Rhinella arenarum* at larval developmental stage. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;39(2): 525-553. Doi:10.1016/j.etap.2014.12.022
- Loumbourdis NS, Vogiatzis AK. Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2002;53(1):52-58. Doi:10.1006/eesa.2002.2153.
- Paunescu A, Ponopal CM, Drghici O, Marinescu AG. Liver histopathologic alterations in the frog *Rana* (Pelophylax) *ridibunda* induce by the action of Reldan 40EC insecticide. *An Univ Oradea Fasc Biol*. 2010;17(1):166-169.
- Pérez-Iglesias, JM, Franco-Belussi L, Moreno L, Tripole S, Claussius de Oliveira M, Natale GS. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environ Sci Pollut R*. 2016;23:9852-9861. Doi:10.1007/s11356-016-6153-z.
- Sayed AH, Younes HAM. Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. *J Microsc Ultrastruct*. 2016. Doi:10.1016/j.jmau.2016.07.003
- Sotomayor V, Chiriotto TS, Pechen de D'Angelo AM, Venturino A. Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pestic Biochem Physiol*. 2015;119:48-53. Doi:10.1016/j.pestbp.2015.02.006.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2003;13:57-149.
- Vaira M, Akmentins M, Attademo A, Baldo D, Barrasso D, Barrionuevo S, *et al.* Categorización del estado de conservación de los Anfibios de la República Argentina. *Cuad Herpetol*. 2012;26(1):131-159.
- Wolke RE. Piscine macrophage aggregates: a review. *Ann Rev Fish Dis*. 1992;2:91-108.