

## Estrés oxidativo en cefalópodos: I. Determinación de TBARS

### Oxidative stress in cephalopods: I. TBARS determination

Fassiano, Anabella Victoria<sup>1\*</sup>; Ortiz, Nicolás<sup>2,3</sup>; Ríos de Molina, María del Carmen<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo, Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA, Ciudad Universitaria pabellón II 4to. piso., Int. Güiraldes 2620 CP1428, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Área de Biología y Manejo de Recursos Acuáticos, Centro Nacional Patagónico (CONICET), Bvd. Brown 2915, CP9120, Puerto Madryn, Argentina. <sup>3</sup>CONICET, Av. Rivadavia 1917, CP1033, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

\*afassiano@qb.fcen.uba.ar

Recibido: 17 de mayo de 2012

Aceptado: 2 de septiembre de 2012

**Resumen.** El estrés oxidativo se produce cuando se genera un desbalance desfavorable entre las especies reactivas del oxígeno y las defensas antioxidantes, provocando daño oxidativo a macromoléculas. Varios estudios han resaltado la importancia del estrés oxidativo en el campo de la ecotoxicología, particularmente su relación con el impacto que generan los contaminantes que alcanzan los cuerpos de agua. El cuantificar los parámetros de estrés oxidativo ha permitido el uso de los mismos como herramienta de diagnóstico (biomarcadores), con capacidad predictiva del impacto de los contaminantes sobre los organismos. Uno de los índices más frecuentemente utilizados para estimar el daño oxidativo a lípidos es la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), producto final de la peroxidación lipídica. *Octopus tehuelchus* es un importante recurso pesquero en la costa patagónica, expuesto en algunas áreas a contaminación antrópica. Dado que el estudio de parámetros de estrés oxidativo aún no ha sido abordado en esta Clase de moluscos y que en muchos modelos biológicos, los contaminantes ambientales actúan generando estrés oxidativo, es clave encontrar sus blancos de acción, para empezar a caracterizar las alteraciones metabólicas y fisiológicas asociadas a su mecanismo de acción. El objetivo de este trabajo fue la puesta a punto del método de determinación de daño oxidativo a lípidos en distintos tejidos del pulpo *Octopus tehuelchus* desde modelos previamente ensayados en el laboratorio.

**Palabras clave:** Estrés oxidativo; Malondialdehído; *Octopus tehuelchus*; Cefalópodos.

**Abstract.** Oxidative stress occurs when there is an unfavorable imbalance between reactive oxygen species and antioxidant defenses, causing oxidative damage to macromolecules. Several studies have highlighted the importance of oxidative stress in the ecology field related to the impact generated by pollutants reaching water bodies. The quantification of oxidative stress parameters led to their use as diagnostic tools (biomarkers) with predictive capability of showing the impact of pollutants on organisms. One of the most frequently used indexes to estimate the oxidative damage to lipids is the determination of reactive thiobarbituric acid substances (TBARS) (final product of lipid peroxidation). *Octopus tehuelchus* is an important fishery resource in the Patagonian coast exposed to anthropogenic pollution. The study of oxidative stress parameters has not been yet tackled in this class of molluscs. Taking into account that, in many biological models, environmental pollutants generate oxidative stress, it is important to find their targets of action, to start to characterize metabolic and physiological alterations associated to their mechanisms of action. The aim of this work was to adjust the method of determination of oxidative damage to lipids in various tissues of the octopus, *Octopus tehuelchus*, from models previously tested in the laboratory.

**Keywords:** Oxidative stress; *Octopus tehuelchus*; Malondialdehyde; Cephalopods.

## INTRODUCCIÓN

Vivir en un ambiente oxigenado implica estar expuesto a metabolitos intermedios en la vía de reducción de oxígeno, conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO). Estas moléculas, en ciertas condiciones, pueden resultar tóxicas y lesionar a los componentes celulares.

Existen varios trabajos publicados que relacionan la expectativa de vida de los organismos con el grado de daño oxidativo en su sistema, entre otros parámetros de estrés oxidativo (Orr y Sohal 1994; Sohal y col. 2002; Turrens 2003; Abele y Puntarulo 2004; Halliwell 2007; Monaghan y col. 2009). Asimismo, se sabe en la actualidad, que muchos factores ambientales

como la contaminación por metales pesados o pesticidas, pueden inducir estrés oxidativo (Watanabe y Suzuki 2002; Rocchetta 2006; Ochoa y González 2008; Sabatini y col. 2009a, 2009b).

Los factores ambientales pueden modificar la tasa metabólica de organismos y, consecuentemente, la tasa de producción de ERO. En los invertebrados marinos expuestos a contaminantes de origen antrópico puede aumentar la formación intracelular de ERO y pueden presentar modificaciones en la actividad de sus defensas antioxidantes, niveles de producción de ERO y su vulnerabilidad a éstas (Regoli 2000; Abele y Puntarulo 2004; Borković y col. 2005). Por otra parte, existen numerosas evidencias de que los animales acuáticos acumulan y transfieren distintos tipos de contaminantes, tales como metales y xenobióticos (Amiard 1988; Chaufan y col. 2006; Sabatini y col. 2009b). Los pulpos en particular, poseen una notable capacidad para almacenar grandes cantidades de metales pesados y otros contaminantes, siendo una importante ruta de transferencia hacia los predadores tope, incluido el hombre (Seixas y Pierce 2005; Raimundo y col. 2008).

El pulpito, *Octopus tehuelchus*, es un importante recurso pesquero en varias localidades rurales y urbanas de la costa patagónica (Ré y Ortiz 2008) en el que el estudio de parámetros de estrés oxidativo no ha sido, aún, abordado. Considerando que, en muchos modelos biológicos, los contaminantes ambientales actúan generando estrés oxidativo y que, como otros pulpos, *O. tehuelchus* sería un importante bioacumulador, es clave establecer los valores basales de los parámetros de estrés para encontrar los blancos de acción de los contaminantes y comenzar a caracterizar las alteraciones metabólicas y fisiológicas asociadas. Existen distintas determinaciones que dan indicios del grado de estrés oxidativo que sufren diversos organismos marinos (Sukhotin y col. 2002; Abele y Puntarulo 2004), entre ellos los cefalópodos decápodos (Zielinski y Pörter 2000). Uno de los índices más frecuentemente utilizados para estimar el daño oxidativo a lípidos es la determinación de la peroxidación lipídica mediante la técnica de TBARS (sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico). Como producto final de la peroxidación lipídica predomina el malondialdehído (MDA), principal sustrato de esta reacción. El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido en caliente para dar un comple-

jo coloreado, cuyo máximo de absorción es a 535 nm (Ohkawa y col. 1978).

El objetivo de este trabajo fue la puesta a punto del método de determinación de daño oxidativo a lípidos en distintos tejidos del pulpo *O. tehuelchus* basándonos en otros modelos previamente ensayados en el laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El área de muestreo fue una región de la costa atlántica de la provincia de Chubut, en las cercanías del Muelle Almirante Storni, en la zona portuaria Puerto Madryn, Golfo Nuevo (42° 45'S, 65° 01'O). En esta región se instalaron refugios artificiales en el piso submareal, a aproximadamente 10 metros de profundidad, que se controlaron periódicamente por buceo. Los ejemplares se capturaron en los meses de abril y mayo de 2009.

Los ejemplares fueron trasladados en agua de mar al Laboratorio de Peces y Mariscos de Interés Comercial (LAPEMAR) en el CENPAT-CONICET y, previo a la disección, se anestesiaron con alcohol al 5% en agua de mar, en acuerdo con las recomendaciones establecidas por Moltschaniwskyj y col. (2007). Se obtuvieron muestras de manto (M), glándulas oviductales (GO), glándula digestiva (GD), brazo (Br), sifón (Si), sistema nervioso (SN) y branquias (Bq). Estos tejidos fueron almacenados a -20°C hasta ser trasladados a Buenos Aires para realizar las mediciones bioquímicas en el Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo (LEEM), del departamento de Química Biológica, FCEN-UBA.

Cada tejido fue homogeneizado mecánicamente con un rotor Precytec, en KCl 0,154 M (1:5, p/v) conteniendo inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetil sulfonilo -PMSF- 0,5 mM y benzamidina 0,2 mM) según Chaufan y colaboradores (2006). De cada homogenato se fraccionó una alícuota (para hacer las determinaciones en homogenato total) y el resto se centrifugó a 11.000 x g por 20 minutos, obteniéndose un sobrenadante y un precipitado. Todos los preparados se utilizaron inmediatamente o se guardaron a -20°C hasta su uso.

Se trabajó sobre alícuotas de homogenato total, sobrenadante y sedimento de centrifugación de muestras de manto, glándulas oviductales, glándula digestiva, brazo, sifón, sistema nervioso y branquias. Se estimó el índice de peroxidación lipídica mediante la determinación de TBARS (Ohkawa y col. 1978), con ligeras modificaciones. A alícuotas de 50 ml

del homogenato total o del sobrenadante y al sedimento correspondiente (previamente resuspendido en un volumen final de 50 ml en buffer de homogeneización) se les agregó 1 ml de reactivo compuesto por TBA 0,3% p/v, TCA 4% (p/v) y hidroxitolueno butilado (BHT) 0,01% (p/v). Se incubaron a 100°C durante 20 minutos. Luego se dejaron enfriar en hielo y se clarificaron los sobrenadantes por centrifugación a 10.000 x g por 10 min. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 535 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/visible.

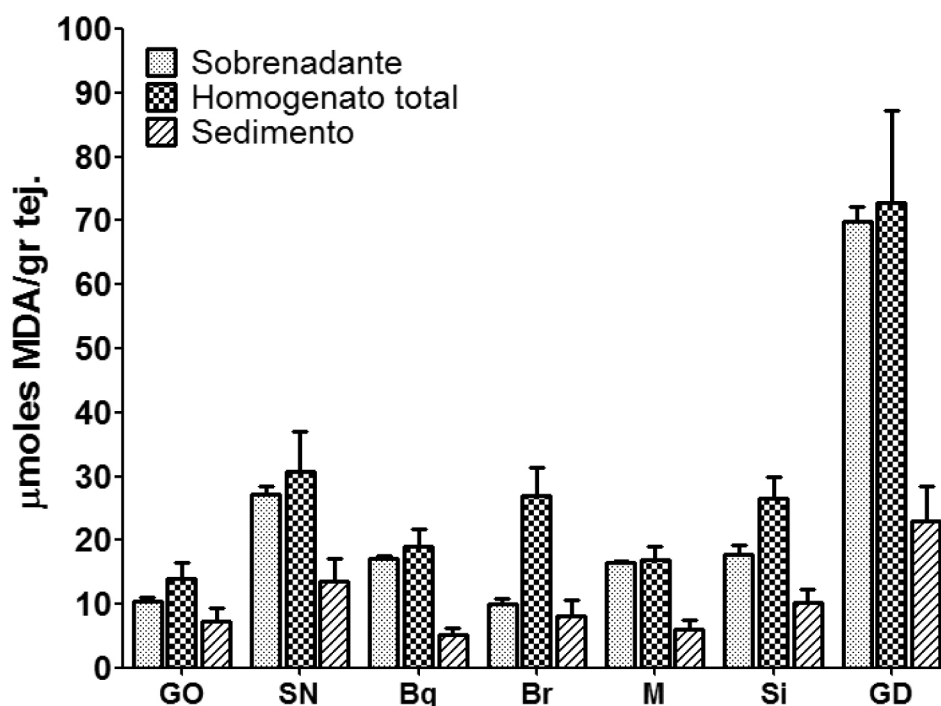
La concentración de complejo coloreado se calculó mediante el empleo del coeficiente de extinción molar del complejo MDA-TBA en las condiciones de trabajo ( $156 \text{ mmoles}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}$ ).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A fin de verificar en qué localización se lograba la mejor determinación de MDA (valores dentro del límite de detección de la técnica y menor dispersión de datos), se aplicó la técnica de TBARS sobre el homogenato total, el sobrenadante de 11.000 x g y sobre el sedimento de la misma centrifugación.

En la *Figura 1* se presentan los datos obtenidos en los distintos tejidos. Se observó que, en la mayoría de los casos (exceptuando el brazo), no hubo diferencias apreciables para la determinación realizada entre los valores obtenidos en el homogenato total y los valores obtenidos en el sobrenadante. Por otra parte, se observó que el valor obtenido para el sobrenadante y el homogenato total indicarían que, durante la homogeneización, el MDA se liberó a la fracción soluble y se recuperó totalmente con el sobrenadante de homogenato tras la centrifugación a 11.000 x g.

Medir una alícuota del homogenato total con precisión resultó dificultoso, dado que se trató una suspensión de alta densidad y no totalmente homogénea, por lo que, desde este punto de vista, resultó más conveniente utilizar el sobrenadante como material de partida para realizar determinaciones cuantitativas y lograr duplicados más precisos y exactos (*Tabla 1*). Esto se aplicó a todos los tejidos analizados, excepto el brazo, para el cual resultó mejor trabajar con el homogenato total, dado que los niveles obtenidos en esta fracción



**Figura 1.** Contenido de MDA ( $\mu\text{moles}$  de MDA/gr de tejido), en los distintos sistemas y órganos ensayados. GO: glándulas oviductales, SN: sistema nervioso, Bq: branquias, Br: brazo, M: manto, Si: sifón, GD: glándula digestiva. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el desvío estándar.

**Tabla 1.** Contenido de MDA ( $\mu$ moles de MDA/gr de tejido), en el homogenato total y en las fracciones obtenidas por centrifugación a 11.000 x g durante 20 minutos. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el desvío estándar.

Tejido	Sobrenadante ( $\mu$ moles MDA/gr tejido)	Homogenato total ( $\mu$ moles MDA/gr tejido)	Precipitado ( $\mu$ moles MDA/gr tejido)
GO	10,51 $\pm$ 1,05	14,01 $\pm$ 4,20	7,22 $\pm$ 3,61
SN	27,22 $\pm$ 2,18	30,77 $\pm$ 10,77	13,61 $\pm$ 6,12
Bq	17,06 $\pm$ 0,85	19,07 $\pm$ 4,77	5,21 $\pm$ 1,82
Br	10,09 $\pm$ 1,21	26,99 $\pm$ 7,56	8,18 $\pm$ 4,17
M	16,45 $\pm$ 0,49	17,00 $\pm$ 3,40	6,01 $\pm$ 2,52
Si	17,75 $\pm$ 2,66	26,48 $\pm$ 5,83	10,15 $\pm$ 3,66
GD	69,85 $\pm$ 4,19	72,92 $\pm$ 24,79	23,09 $\pm$ 9,24

fueron mayores que los obtenidos para el sobrenadante. Esto pudo deberse a que el proceso de homogeneización no fue lo suficientemente efectivo para este tejido y que una parte significativa de los productos de peroxidación lipídica fue retenida en los fragmentos celulares, que luego de la centrifugación sedimentaron. En cuanto al tejido óptimo para la determinación de la peroxidación lipídica en *O. tehuelchus*, los resultados indicaron que los mayores valores para esta determinación se obtuvieron en glándula digestiva, seguido por el sistema nervioso, aunque en todos los tejidos analizados se obtuvieron valores medibles, revelando una gran sensibilidad de la técnica en este organismo. Esto permitió concluir que la técnica es aplicable para cualquiera de los tejidos analizados, partiendo de homogenato total para el caso del brazo o sobrenadante de homogenato en el resto de los tejidos.

A partir de las variables ensayadas en el presente trabajo, se propone que el sobrenadante de homogenato de 11.000 x g, de la glándula digestiva de *O. tehuelchus*, sería la muestra de elección sobre la cual realizar el bioensayo en futuras investigaciones.

#### BIBLIOGRAFÍA CITADA

Abele D., Puntarulo S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine inver-

tebrates and fish. *Comp Biochem Physiol A*. 2004;138(4):405-415.

Amiard J. Les mecanismes de transfer des elements metaliques dans la chaine alimentaires aboutissant à l'huitre et à la moule, mollusques filtreurs, formes chimiques de stockage, consequences ecotoxicologiques. *Oceanus*. 1988;14:283-287.

Borković S., Saponjic S., Pavlovic S., Blegojevic D., Milosevic S., Kovacevic T., Rodojicic R., Spasic M., Zikic R., Saicic Z. The activity of antioxidant defense in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic. *Sea Comp Biochem Physiol C*. 2005;141:366-374.

Chaufan G., Juárez A., Basak S., Ithuralde E., Sabatini S., Genovese G., Oneto M., Kesten E., Ríos de Molina M.C. Toxicity of hexachlorobenzene and its transference from microalgae (*Chlorella kessleri*) to crabs (*Chasmagnathus granulatus*). *Toxicology*. 2006;227:262-270.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc T*. 2007;35 (5):1147-1150.

Moltschaniwskyj N.A., Hall K., Lipinski M.R., Marian J.E.A.R., Nishiguchi M., Sakai M., Shulman D.J., Sinclair B., Sinn D.L., Staudinger M., Gelderen R.V., Villanueva R., Warnke K. Ethical and welfare considerations when using cepha-

lopods as experimental animals. Rev Fish Biol Fisheries. 2007;17:455-476.

Monaghan P., Metcalf N., Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. Ecol Lett. 2009;12:75-92.

Ochoa D., González J. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. Rev Med Vet Zootec. 2008;55:115-126.

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1978;95(2):351-358.

Raimundo J., Vale C., Duarte R., Moura, I. Sub-cellular partitioning of Zn, Cu, Cd and Pb in the digestive gland of native *Octopus vulgaris* exposed to different metal concentrations (Portugal). Sci Total Environ. 2008;390:410-416.

Ré M., Ortiz N. Pesca del pulpito *Octopus tewelchus*. Pesquería de Cefalópodos. Atlas de Sensibilidad [en línea]. Ambiental del Mar y de la Costa. [actualizado en Mayo de 2008; consulta 29 de Junio de 2011]. Disponible en: <http://atlas.ambiente.gov.ar/>

Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. Aquat Toxicol. 2000;50(4):351-361.

Rocchetta I. Estudios de estrés oxidativo y cambios de ultraestructura provocados por el cromo hexavalente en *Euglena gracilis* (Euglenophyta). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, 2006. [www.bl.fcen.uba.ar](http://www.bl.fcen.uba.ar)

Rocchetta I., Ruiz L.B., Magaz G., Conforti V.T.D. Effects of hexavalent chromium in two strains of *Euglena gracilis*. B Environ Contam Tox. 2003;70(5):1045-1051.

Sabatini S.E., Chaufan G., Juárez A.B., Coalova I, Bianchi L., Eppis M.R., Ríos de Molina M.C. Dietary copper effects in the estuarine crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*, maintained at two different salinities. Comp Biochem Physiol C. 2009a;150:521-527.

Sabatini S.E., Juárez A.B., Eppis M.R., Bianchi L., Luquet C.M., Ríos de Molina M.C. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. Ecotox Environ Safe. 2009b;72:1200-1206.

Seixas S., Pierce G. Bioaccumulation of lead, calcium and strontium and their relationship in the octopus *Octopus vulgaris*. Water Air Soil Poll. 2005;163:137-152.

Sohal R. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. Aging. 1993;5(1):3-17.

Sohal R., Mockett R., Orr W. Mechanisms of Aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radical Biol Med. 2002;33(5):575-586.

Sukhotin A., Abele D., Pörtner H.-O. Growth, metabolism and lipid peroxidation in *Mytilus edulis*: age and size effects. Mar Ecol Prog Ser. 2002;226:223-234.

Turrens J. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 2003;522(2):335-344.

Watanabe M., Suzuki T. Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*. Comp Biochem Physiol C. 2002;131(4):491-500.

Zielinski S., Pörtner H.-O. Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age? Comp Biochem Physiol B. 2000;125:147-160.