

BUSQUEDA DE BIOMARCADORES TEMPRANOS DE
CONTAMINACION AMBIENTAL. ANALISIS *IN VITRO*
DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA EN
DIPLODON CHILENSIS CHILENSIS (GRAY, 1828)
(BIVALVIA, HYRIIDAE). EFECTO DEL CLORPYRIFOS*

In search of early biological markers of environmental pollution. *In vitro*
analysis of cholinesterasic activity on *Diplodon chilensis* (Gray, 1982).
effet of chlorpyrifos.

RICARDO BARRA¹, MARCELA TORREJON², KARIN REINICKE³, M. ISOLDE RUDOLPH⁴.

RESUMEN

Se presenta un estudio bioquímico sobre la actividad colinesterásica en *Diplodon chilensis chilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia, Hyriidae). Mediante un procedimiento de extracción que permite obtener las diferentes formas moleculares de la enzima, seguido de una identificación con inhibidores específicos para acetilcolinesterasa y de butirilcolinesterasa, se determinó que la enzima predominante es la acetilcolinesterasa en sus formas hidrofílicas y anfífilas. Estos resultados se han complementado con estudios histoquímicos que permitieron determinar que la acetilcolinesterasa delimita las células musculares del músculo aductor y el epitelio de revestimiento del pie, gónada e intestino.

Puesto que la actividad colinesterásica del *Diplodon chilensis chilensis* es altamente resistente a la inhibición por el insecticida organofosforado clorpirifos, se descarta la posibilidad que la medida de este sistema enzimático en la especie estudiada pudiera servir como biomarcador de la presencia de concentraciones tóxicas de este compuesto en el sistema acuático.

Palabras claves: Colinesterasa, biomarcador, contaminación, clorpirifos, *Diplodon Chilensis Chilensis*.

SUMMARY

A biochemical study of cholinesterasic activity in *Diplodon chilensis chilensis* (Bivalvia, Hyriidae) is presented. The predominant enzyme was acetylcholinesterase in both hydrophilic and amphiphilic molecular forms. The above was determined through a standard extraction procedure to obtain the different molecular forms of the enzymes, followed by the use of specific inhibitors to identify both acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. These results were complemented with histochemistry, showing that acetylcholinesterase is surrounding muscle cells in the adductor muscle and epithelial cells in foot, gonads and intestine.

Since acetylcholinesterase of *Diplodon chilensis chilensis* was highly resistant to the organophosphorus pesticide Chlorpyrifos in aquatic system, we discarded the possibility that this enzyme activity could be adequate as biomarker for the presence of possible toxic concentrations of this organophosphorate.

KEYWORDS: Cholinesterase, biomarker, chlorpyrifos, *Diplodon chilensis chilensis*.

¹ Doctorando Centro EULA

² Alumna de Bioquímica

³ Departamento de Histología y Embriología

⁴ Departamento de Farmacología, a quien debe dirigirse la correspondencia.
Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción, casilla 2407, Fax 56-41-240260, Concepción.

*Trabajo financiado con fondos de proyectos 20.33.56 y 91-3605 de la Dirección de Investigación, Universidad de Concepción.

INTRODUCCION

Las colinesterasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en la mayoría de las especies se presenta fundamentalmente en dos formas, la acetilcolinesterasa (AChE) (E.C.3.1.1.7) y la butirilcolinesterasa (BChE) (E.C.3.1.1.8). La AChE se encuentra principalmente en neuronas, en cambio la BChE tiene una distribución más amplia, encontrándose incluso en plasma e hígado. Aunque con diferente Km, ambas enzimas pueden hidrolizar a la Acetilcolina (ACh) y otras esterasas y son inhibidas por fisostigmina. Experimentalmente se pueden distinguir usando inhibidores específicos: Bw 284c51 (1,5-bis-4-alil-dimetil-aminofenil-pentano3-ona) e iso-OMPA (tetraisopropilpirofosforamida), que inhiben de preferencia a BChE y AChE, respectivamente. Ambas enzimas están presentes en una variedad de formas moleculares difiriendo en sus estructuras cuaternarias, en su anclaje a la superficie de la membrana celular y por lo tanto en sus propiedades de solubilización (Brimjoin, 1983).

La medida de la actividad colinesterásica en aves y peces ha demostrado ser un indicador bioquímico adecuado para determinar la presencia de compuestos organofosforados, carbamatos y xenobióticos neurotóxicos en el ambiente (Ludke *et al.* 1975, Van der Wel y Welling, 1989).

El *Diplodon chilensis chilensis* es una especie endémica, ampliamente distribuida en esteros y lagunas que potencialmente pueden recibir compuestos organofosforados de uso agrícola (Parada y cols. 1989). En la perspectiva de utilizar esta especie como bioindicador en el monitoreo de contaminación acuática a través de la medida de su actividad colinesterásica, realizamos un análisis bioquímico sobre la presencia de esta actividad enzimática utilizando los procedimientos descritos por Younkin y cols. (1982) y determinando además su distribución anatómica en diferentes tejidos.

Dado que el clorpirifos tiene un amplio uso como insecticida en los terrenos de uso agrícola en la VIII Región (Barra, 1992) y se acumula preferentemente en los sedimentos y material particulado en el sistema acuático (Howard, 1991), este trabajo también presenta los resultados de estudios realizados con el fin de analizar el efecto de este compuesto sobre la actividad colinesterásica obtenida del músculo aductor de este organismo filtrador, el *Diplodon chilensis chilensis*.

MATERIAL Y METODOS

El material biológico (*Diplodon chilensis chilensis*, Bivalvia, Hyriidae) fue obtenido de la Laguna Chica de San Pedro (Concepción, Chile). Los organismos fueron acondicionados durante 1 mes en el laboratorio y mantenidos con aireación constante y a temperatura ambiente para permitir la eventual detoxificación de clorpirifos, en un sistema sedimentoagua de la misma laguna, (concentración de clorpirifos < 0.001 µg/l).

Localización histoquímica de la actividad colinesterásica

Se tomaron pequeños trozos de órganos de *Diplodon chilensis chilensis* correspondientes a pie, músculo aductor, gónada, intestino y branquias y se fijaron en 4% paraformaldehído (pH 7.4 en tampón fosfato 0.1 M) por 12 hr a 4°C. Luego se lavaron en el mismo tampón que contenía sacarosa 5%, se impregnaron en concentraciones crecientes (desde 10 hasta 30%) y se congelaron bajo un chorro de nieve carbónica. Se recogieron cortes de 20 µm en cubreobjetos cubiertos con gelatina cromoalumbre y se incubaron por 60 minutos a 37°C en el medio de incubación descrito por Andrä y Lojda (1986). Como inhibidores específicos de AChE y BChE, se utilizaron iso-OMPA y BW284c51, respectivamente. Con el fin de intensificar la reacción, se trataron los cortes con azul de toluidina 0.1% en HCl 0.7% por 10 min. Finalmente, éstos se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol y se montaron en bálsamo de Canadá.

Extracción de actividad colinesterásica

Para extraer la actividad colinesterásica se utilizó el procedimiento ideado por Younkin y cols. (1982) que permite obtener diferentes formas de esta enzima mediante su extracción sucesiva con solventes hidrosolubles (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 y bacitracina 0.1 mg/ml), anfífilicos (agregando al anterior Tritón X-100 0.5% v/v) y con alta fuerza iónica (agregando NaCl 1M), que extraen del tejido formas colinesterásicas hidrosolubles, anfífilicas y unidas por uniones iónicas a matriz extracelular, respectivamente.

Ensayos bioquímicos de actividad colinesterásica

Se realizó por el método colorimétrico de Ellman

y cols. (1961), el cual utiliza como sustrato acetiltiocolina iodada 0.75 mM, disuelta en Tritón X-100 0.5% v/v. Como inhibidores específicos de BChE y de AChE se utilizó iso-OMPA 1 mM y BW 284c51 1 mM respectivamente. La actividad enzimática fue expresada en μ moles de colinesterasa hidrolizada por min (U).

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y cols. (1951), utilizando albúmina de suero de bovino como estándar.

RESULTADOS

Localización histoquímica de la actividad colinesterásica

En *Diplodon chilensis chilensis* la actividad colinesterásica se localiza en relación con el epitelio de revestimiento en el pie, gónada e intestino como una banda continua intensamente teñida que delimita la superficie celular basal (Fig. 1a, flecha). Pre-

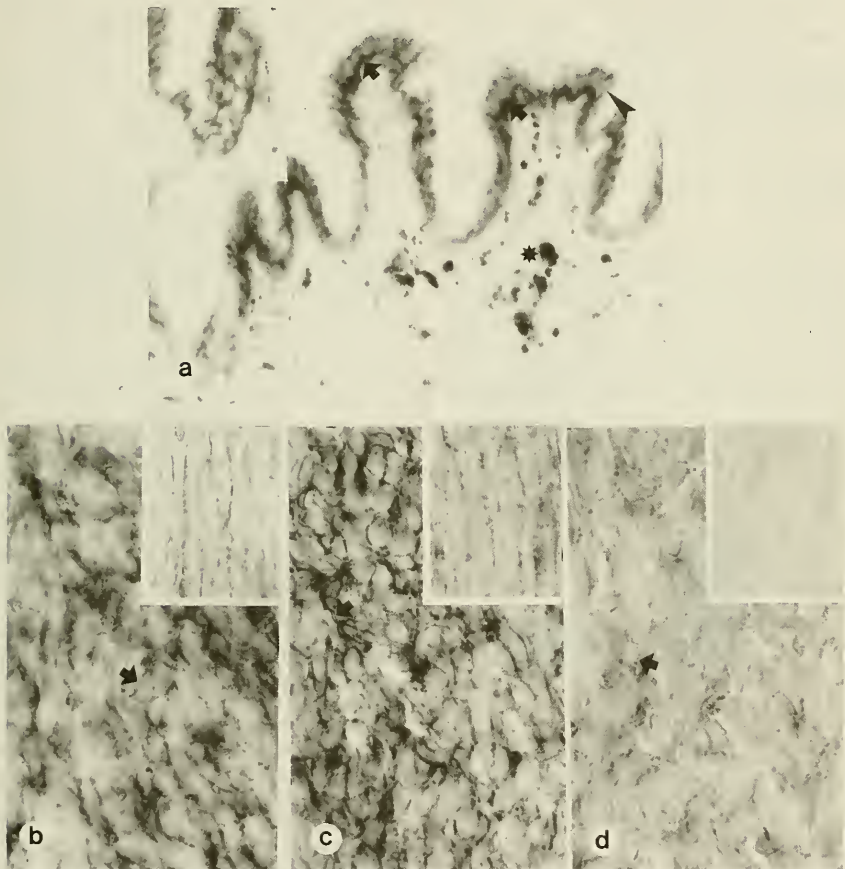


Fig. 1. Distribución histoquímica de colinesterasa en pie (a) y músculo aductor (b, c y d) de *Diplodon chilensis chilensis*. La actividad colinesterásica del pie marca la superficie basal (flecha) y membranas plasmáticas laterales (punta de flecha). Se observan además células conjuntivas (asterisco) con reacción azul de toluidina positiva. En b, c y d se muestra la reacción enzimática del músculo aductor en ausencia del inhibidor (b), incubado con 10 μ M iso-OMPA (c) e incubado con 40 μ M Bw 284c51 (d). La reacción delimita las células musculares (flechas b y c) y es inhibida solamente en presencia de 40 μ M de Bw 284c51. (X422).

senta además, una reacción importante en la membrana plasmática (Fig. 1a, cabeza de flecha) que en cortes transversales aparece como un reticulado (Fig. 1a, recuadro). La actividad colinesterasa presente en estos epitelios no se inhibió significativamente por iso-OMPA ni por Bw 284c51.

La actividad enzimática del músculo aductor, en cambio, se localiza en íntima relación con las membranas plasmáticas de las células musculares (flecha en 1b y 1c), destacándose áreas intensamente teñidas seguidas de zonas con reacción débil o ausencia de reacción. Lo anterior se observó tanto en cortes transversales como longitudinales (Fig. 1b y 1c). Esta actividad sólo fue inhibida significativamente por Bw 284c51 (40 µM) persistiendo algo de reacción en zonas puntuales (flecha Fig. 1c). Iso-OMPA (1-10µM) fue inefectivo (Fig. 1b).

Extracción y ensayos bioquímicos de actividad colinesterásica

Debido a que por histoquímica se demostró que el músculo aductor contenía actividad colinesterasa sensible a Bw 284c51 (lo que refleja la presencia de AChE), se eligió este tejido para estudiar sus diferentes formas moleculares y analizar su actividad *in vitro* y la capacidad inhibitoria del clorpirifos. Como se muestra en la fig. 2, la actividad colinesterásica

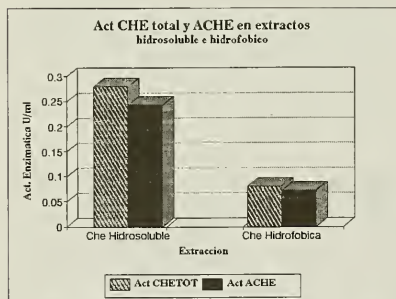


Fig. 2. Actividad colinesterasa en *Diplodon chilensis chilensis*. Las formas hidrofílicas y anfífilicas se obtuvieron por extracción diferencial de acuerdo a Younkin y cols. (1982). La actividad AChE corresponde a aquella inhibida con 1 mM Bw 284c51.

del *Diplodon chilensis chilensis* se presenta principalmente en dos formas: hidrosoluble y anfífilica. De ambas formas, el mayor porcentaje (<80%) correspondió a AChE puesto que fue inhibida por Bw

284c51 (1 mM), no se encontró inhibición con iso-OMPA (1 mM). El efecto inhibitorio del clorpirifos fue dependiente de la concentración entre 10 y 100 ppm para ambas formas de colinesterasas (Fig. 3), no se observó inhibición a concentraciones menores (0.1-1.0 ppm).

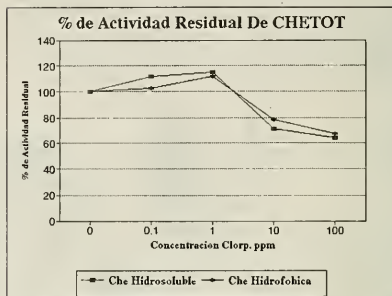


Fig. 3. Efecto de clorpirifos sobre la actividad colinesterasa hidrofílica y anfífilica en *Diplodon chilensis chilensis*, ésta se expresa como el porcentaje de actividad colinesterasa residual después de incubar los homogenizados con la concentración correspondiente de clorpirifos.

DISCUSION

El estudio de la actividad colinesterasa en el músculo aductor de *Diplodon chilensis chilensis*, demostró la presencia de AChE hidrosoluble y anfífilica cuya actividad correspondía a más del 80% de la actividad total de colinesterasa, estos resultados fueron corroborados mediante estudios histoquímicos que mostraron una significativa disminución de la actividad enzimática frente al inhibidor específico Bw 284c51. En el epitelio de revestimiento del pie, de las gónadas y del intestino se observó una colinesterasa resistente a Bw 284c51 e iso-OMPA, lo que permite postular que podría tratarse de una forma enzimática distinta a las descritas en la actualidad.

La concentración de clorpirifos requerida para inhibir la colinesterasa de *Diplodon chilensis chilensis in vitro* es muy elevada y, por su baja solubilidad, difícil de encontrar en el ambiente acuático (Canton y cols., 1991). Los resultados de este trabajo demuestran que el sistema de colinesterasas de la especie *Diplodon chilensis chilensis* estaría resguardada de ser afectada en forma significativa por el clorpirifos utilizado en la agricultura. Sin

embargo, ello no significa que otros sistemas enzimáticos del *Diplodon chilensis chilensis* pudieran ser afectadas por la presencia de este compuesto en nuestras aguas continentales.

Los resultados de este trabajo descartan la posi-

bilidad que la actividad colinesterásica del *Diplodon chilensis chilensis* pudiera ser considerada como biomarcador cuando se estudie la eventual presencia de clorpirifos en los sistemas acuáticos de nuestra región.

BIBLIOGRAFIA

- Andrä, J., Lojda, Z. (1986). A histochemical method for the demonstration of acetylcholinesterase activity using semipermeable membranes. *Histochemistry* 84:575-579.
- Barra, R. (1992). Bases para la selección de pesticidas potencialmente peligrosos para los recursos hídricos. Ponencia 4º Encuentro Científico sobre el Medio Ambiente. CIPMA. Tomo I, pp. 39-46.
- Brimijoin, S. (1983). Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. *Prog. Neurobiol.* 21:291-322.
- Canton, J., Linders J., Luttick, R., Mensink, B., Panam, E., Van de Plassche, E., Sparenburg, P., and Tuinstra, J. (1990) Catch-up operation on old pesticides an integration. National Institute of Public Health and Environmental Protection. Netherlands. 139 pp.
- Howard, P. (1991). Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. Chlorpyrifos. Volume III, pp. 133-144.
- Ellman, G., Courtney, D., Andres, V., Featherstone, R., (1961). A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Ludke, J., Hill, E., and Dieter, M. (1992). Bioconcentration kinetics of the organophosphorus insecticide Chlorpyrifos in Guppies (*Poecilia reticulata*) *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 23: 64-75.
- Parada, E., Peredo, S., Lara, G., Antonin, F. (1989). Contribución al conocimiento de los hiriidae chilenos. *Bol. Soc. Biol. Concepción.* 60: 173-182.
- Van der Well, H., Welling, W. (1989). Inhibition of acetylcholinesterase in guppies (*poecillia reticulata*) by chlorpyrifos at sublethal concentration. *Methodological aspects. Ecotoxicol. Saf.* 17: 205-215.
- Worthing, Ch., Hance, R., (1991). The pesticide Manual. A world compendium. IX The british crop protection council. UK. 1141 pp.
- Younkin, S., Rosestein, G., Collins, P., Roseberry, T. (1982). Cellular localization of the molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm. *J. Biol. Chem.* 257: 13630-13637.