



## Pro-oxidant and antioxidant response in the kidney of an endemic Mexican fish (*Goodea gracilis*) exposed to $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , $\text{CHCl}_3$ and $\text{BrCHCl}_2$ .

## Respuesta pro-oxidante y antioxidante en el riñón de un pez endémico mexicano (*Goodea gracilis*) expuesto a $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , $\text{CHCl}_3$ y $\text{BrCHCl}_2$ .

Olivares-Rubio, H.F. and Vega-López, A.\*

Instituto Politecnico Nacional, Laboratorio de Toxicología Ambiental, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Av. Wilfrido Massieu s/n, Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", México D.F., México. CP 07738.

### ABSTRACT

It has been shown that the isoform 2E1 of CYP 450 (CYP 2E1) and theta isoform of glutathione S-transferase (GSTT) are involved in the biotransformation of halomethanes (HMs) in mammals, which are disinfection by-products of water. In this study, a set of biomarkers related to exposure to these toxicants in the kidney of *Goodea gracilis* (a Mexican endemic fish) treated with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.006, 0.03, 0.06, 0.06 and 6 mg L<sup>-1</sup>),  $\text{CHCl}_3$  (0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mg L<sup>-1</sup>) and  $\text{BrCHCl}_2$  (0.002, 0.01, 0.1, 1, 10 mg L<sup>-1</sup>) were evaluated. Only activity of CYP 2E1 induced by  $\text{BrCHCl}_2$  and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was higher than controls. GSTT metabolism and pro-oxidant forces ( $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{CH}_2\text{O}$ ) were irregular regarding treatments and controls. Damage to cell membranes (ROOH and SRATB) showed a similar trend among the HMs. Protein oxidation was lower than controls except the one caused by the  $\text{CHCl}_3$ . The  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  stimulated the enzymes involved in the

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: August 12<sup>th</sup> 2016.

Accepted/Aceptado: December 14<sup>th</sup> 2016.

### RESUMEN

En mamíferos se ha demostrado que la isoforma 2E1 del citocromo P450 (CYP 2E1) y la isoforma theta de la glutatión S-transferasa (GSTT) participan en la biotransformación de halometanos (HM) que son subproductos de la cloración del agua. En este estudio se evaluó un conjunto de biomarcadores relacionados con la exposición a estos tóxicos en el riñón de *Goodea gracilis* (un pez endémico mexicano) tratado con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.006, 0.03, 0.06, 0.06 y 6 mg L<sup>-1</sup>),  $\text{CHCl}_3$  (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 mg L<sup>-1</sup>) y  $\text{BrCHCl}_2$  (0.002, 0.01, 0.1, 1 y 10 mg L<sup>-1</sup>). Se encontró que únicamente la actividad del CYP 2E1 estuvo inducida por  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{BrCHCl}_2$ . El metabolismo de GSTT y las fuerzas pro-oxidantes ( $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{CH}_2\text{O}$ ) fueron irregulares respecto a los tratamientos y controles. Los daños en membranas celulares (ROOH y SRATB) presentaron una tendencia similar entre los tres HM. La oxidación de proteínas estuvo por debajo de los niveles basales con excepción de la producida por  $\text{CHCl}_3$ . Solamente el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  estimuló a las enzimas involucradas en la defensa antioxidante (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) como también ocurrió con la glutatión S-transferasa total, mientras que el resto de los HM produjo una respuesta irregular. Estos

#### \*Corresponding Author:

Vega-López, A., Laboratorio de Toxicología Ambiental, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politecnico Nacional, Av Wilfrido Massieu s/n, Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", México D.F. CP 07738, México. Phone: +52(55) 5729-6300 Ext. 52320.

antioxidant defense (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase), as also occurred with total glutathione S-transferase, while the others HM elicited an irregular response. These findings suggest that toxic effects elicited by HM on the kidney of fish are complex and more studies are needed to expand knowledge on the subject.

---

## KEY WORDS

---

Oxidative stress, CYP 2E1, GSTT, halomethanes.

---

### Introduction

In optimum conditions, many toxics can be formed in water bodies, as the case of halomethanes (HM) (Senem-Uyguner *et al.*, 2004). These compounds are highly fat-soluble, present elevated electronegativity and low boiling point, as well as high steam pressure (ATSDR, 2016). The isoform 2E1 of cytochrome P450 (CYP 2E1) is able to biotransform HM in mammals and fishes (Melnick *et al.*, 1998; Dzul-Caamal *et al.*, 2013), and the isoform theta from the glutathione S-transferase (GSTT) (Dekant and Vamvakas, 1993; Vega-López *et al.*, 2012; Dzul-Caamal *et al.*, 2013; Uraga-Tovar *et al.*, 2014). In mammals, it has been shown that biotransformation of HM can generate highly reactive and oxidant metabolites, as formaldehyde, nitrosamines and phosgene, among others (Dekant and Vamvakas, 1993; Melnick *et al.*, 1998; Dzul-Caamal *et al.*, 2013). Nevertheless, organisms can have different mechanisms to counteract such damage. In a balanced metabolic state, the activity of the antioxidant defenses such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and the glutathione peroxidase (GPx) reduce the oxidant capability of reactive species of oxygen (ROS), but in pathological states, they can oxidize different biomolecules (Hermes-Lima, 2004).

For Mexican authorities, vulnerable and endangered species are priority for their study (Olivares-Rubio *et al.*, 2013). *Goodea gracilis* (Hubbs and Turner, 1939) is a vulnerable species (IUCN Red List Status Ref. 84930) and typical of the ichthyofauna of central Mexico. It is a freshwater, demersal and mild climate species, with preference for alkaline or neutral waters, whose feeding occurs by filtration (Dzul-Caamal *et al.*, 2013). Its fertilization is internal, they present viviparity and

hallazgos sugieren que los efectos tóxicos de los HM en el riñón son complejos y se requieren más estudios para ampliar el conocimiento sobre el tema.

---

## PALABRAS CLAVE

---

Estrés oxidativo, CYP 2E1, GSTT, halometanos.

---

### Introducción

En condiciones óptimas muchos tóxicos pueden formarse en los cuerpos de agua como es el caso de los halometanos (HM) (Senem-Uyguner *et al.*, 2004). Estos compuestos son altamente liposolubles, presentan elevada electronegatividad y bajo punto de ebullición, así como alta presión de vapor (ATSDR, 2016). La isoforma 2E1 del citocromo P450 (CYP 2E1) es capaz de biotransformar a los HM en mamíferos y peces (Melnick *et al.*, 1998; Dzul-Caamal *et al.*, 2013), así como la isoforma theta de la glutatión S-transferasa (GSTT) (Dekant y Vamvakas, 1993; Vega-López *et al.*, 2012; Dzul-Caamal *et al.*, 2013; Uraga-Tovar *et al.*, 2014). En mamíferos se ha demostrado que la biotransformación de los HM puede generar metabolitos altamente reactivos y oxidantes como el formaldehído, nitrosaminas y fosgeno, entre otros (Dekant y Vamvakas, 1993; Melnick *et al.*, 1998; Dzul-Caamal *et al.*, 2013). No obstante, los organismos tienen diferentes mecanismos para contrarrestar este daño. En un estado metabólico en equilibrio, la actividad de las defensas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) reducen la capacidad oxidante de las especies reactivas del oxígeno, ROS por sus siglas en inglés "Reactive Oxygen Species", pero en estados patológicos pueden oxidar diferentes biomoléculas (Hermes-Lima, 2004).

Para las autoridades mexicanas las especies vulnerables y en peligro de extinción son prioritarias para su estudio (Olivares-Rubio *et al.*, 2013). El tiro oscuro *Goodea gracilis* (Hubbs y Turner, 1939) es una especie vulnerable (IUCN Red List Status Ref. 84930) y típica de la ictiofauna del centro de México. Es una especie dulceacuícola, demersal y de climas templados, con preferencia por aguas alcalinas o neutras, cuya alimentación ocurre por filtración (Dzul-Caamal *et al.*, 2013). Su fertilización es interna, presentan viviparidad y matrotrofia (Doadrio y Domínguez, 2004). En algunos casos habita ambientes alimentados por plantas de tratamiento de aguas residuales que contienen materia

matrotrophy (Doadrio and Domínguez, 2004). In some cases, it inhabits environments fed by treatment plants of residual waters that contain organic matter and precursors of HM (Vega-Lopez *et al.*, 2012; Olivares-Rubio *et al.*, 2013). In liver and kidney of *G. gracilis*, inhabitant of three lakes from central Mexico, it was found that the presence of HM was able to inhibit the metabolic response of these fishes (Olivares-Rubio *et al.*, 2013), which suggests the generation of reactive metabolites (Parkinson and Ogilvie, 2008), particularly those derived from the GST tetha isophorm. In addition, in the liver of *Chirostoma riojai*, inhabitant of the Zumpango Lagoon, located in the Estado de Mexico, Mexico; coupling of CYP 2E1 and GSTT was present, and they were related with the environmental concentrations of HM (Vega-López *et al.*, 2012). The study of renal response in fishes, both in basal conditions and wild specimens, is fundamental since the negative and positive selection of hematopoietic progenitor cells occurs in the pronephros (kidney head) (Janeway and Medzhitov, 2002; Davidson and Zon, 2004), in addition to the renal filtration processes in the mesonephros and metanephros (kidney body) (Schnellmann, 2008). The objective of this study was to evaluate the pro-oxidant and antioxidant response of three different HM: dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), trichloromethane ( $\text{CHCl}_3$ ) and bromodichloromethane ( $\text{BrCHCl}_2$ ) in the kidney of *Goodea gracilis* to proposed concentrations in the previous report by Dzúl-Caamal *et al.*, (2013), based on the maximum allowed limit in potable water of each HMs, which was selected as central point of treatments. The activity of the responsible enzymes of the biotransformation of HM, pro-oxidant forces, oxidative damage, and the activity of involved enzymes in the antioxidant defense and the conjugation with glutathione was measured.

## Materials and Methods

### Species under study and experimental procedure

The progenitors were received from donation and were kept in the lab for their reproduction under conditions described by Dzúl-Caamal *et al.*, (2013). Juveniles of indistinct sex aged eight months ( $50.40 \pm 0.65$  mm and  $0.94 \pm 0.06$  g) in non-reproductive state born in the lab were used for the tests.

orgánica y precursores de HM (Vega-López *et al.*, 2012; Olivares-Rubio *et al.*, 2013). En el hígado y el riñón de *G. gracilis* "habitante de tres lagos del centro de México" se encontró que la presencia de HM fue capaz de inhibir la respuesta metabólica de estos peces (Olivares-Rubio *et al.*, 2013), lo que sugiere la generación de metabolitos reactivos (Parkinson y Ogilvie, 2008) particularmente los derivados de la GST isoforma tetha. En adición, en el hígado de *Chirostoma riojai* "habitante de la Laguna de Zumpango ubicada en el Estado de México"; se presentó acoplamiento del CYP 2E1 y de la GSTT y estuvieron relacionados con las concentraciones ambientales de HM (Vega-López *et al.*, 2012). El estudio de la respuesta renal en los peces, tanto en condiciones basales como en especímenes silvestres, es fundamental ya que en el pronephros (cabeza del riñón) ocurre la selección negativa y positiva de las células progenitoras hematopoyéticas (Janeway y Medzhitov, 2002; Davidson y Zon, 2004) además de los procesos de filtración renal en el mesonephros y metanephros (cuerpo del riñón) (Schnellmann, 2008). El objetivo de este estudio fue conocer la respuesta pro-oxidante y antioxidante de tres diferentes HM: diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), triclorometano ( $\text{CHCl}_3$ ) y bromodichlorometano ( $\text{BrCHCl}_2$ ) en el riñón del *Goodea gracilis* a las concentraciones propuestas en el reporte previo de Dzúl-Caamal *et al.*, (2013), basadas en el límite máximo permitido en el agua potable de cada HM, que fue seleccionado como punto central de los tratamientos. Se midió la actividad de las enzimas responsables de la biotransformación de HM, fuerzas pro-oxidantes, daño oxidativo, así como la actividad de las enzimas involucradas en la defensa antioxidante y la conjugación con glutatión.

## Materiales y Métodos

### Especie bajo estudio y procedimiento experimental

Los progenitores fueron recibidos de donación y se mantuvieron en el laboratorio para su reproducción bajo las condiciones descritas por Dzúl-Caamal *et al.*, (2013). Para las pruebas se usaron juveniles de sexo indistinto de ocho meses ( $50.40 \pm 0.65$  mm y  $0.94 \pm 0.06$  g) en estado no reproductivo nacidos en el laboratorio.

Se realizó una exposición a 96 h (6 especímenes por tratamiento) a diferentes concentraciones de HM [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (grado HPLC,  $\geq 99.8$  %, Sigma-Aldrich) a 0.006, 0.03, 0.06, 0.6, 6 mg L<sup>-1</sup>,  $\text{CHCl}_3$  (grado HPLC,  $\geq 99$  %, Sigma-Aldrich) a 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg L<sup>-1</sup> y  $\text{BrCHCl}_2$  (grado HPLC,  $\geq 97$  %, Sigma-

A 96 h exposure (6 specimens per treatment) was made at different concentrations of HM [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (grade HPLC,  $\geq 99.8\%$ , Sigma-Aldrich) at 0.006, 0.03, 0.06, 0.6, 6  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$  (grade HPLC,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich) at 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\text{mg L}^{-1}$  and  $\text{BrCHCl}_2$  (grade HPLC,  $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich) at 0.002, 0.01, 0.1, 1, 10  $\text{mg L}^{-1}$ ]. Dilutions of HM were prepared in absolute ethanol. In all cases, the concentration of ethanol in dissolvent control was 0.001 % in synthetic semi-hard water. Assays were made by triplicate in glass bottle of 20 L at  $24 \pm 1$  °C with a volume of 10 L, according to Dzul-Caamal *et al.*, (2013). Given that these are volatile toxics, treatment was renewed every 24 h and aeration was retired during 1 h after the application. Aeration was constant and supplied by air bombs branch Elite, model 800.

### Biomarkers

Necropsy was made immediately to obtain the kidney, which was weighed with a 0.1 mg precision and homogenized at 1:5 (w/v) with buffer solution of phosphate using Teflon micropistoles. A portion was centrifuged at 9,000 X g and at 4 °C during 15 minutes to obtain fraction S9. Non-centrifuged fractions and S9 were stored at -80 °C until the assay of biomarkers (less than two weeks), with exception of ROS quantification, such analysis was immediate. The fraction S9 was used to measure the pro-oxidant forces and to perform enzymatic assays, while the non-centrifuged fraction for the measurement of oxidative damage biomarkers. Results were expressed according to the sort of each biomarker; nevertheless, in all cases, they were normalized per g of fish as in Dzul-Caamal *et al.*, (2013).

### Biotransformation of HM

Activity of CYP 2E1 (EC 1.14.14.1) was evaluated according to the method of Cannady *et al.*, (2003). An aliquot of 100  $\mu\text{L}$  of fraction S9 was taken, and 400  $\mu\text{L}$  of phosphates buffer (100 mM pH 6.8),  $\mu\text{L}$  of NADPH (50 mM) and 10  $\mu\text{L}$  of *p*-nitrophenol at 50 mM were added. The reaction was incubated during one hour at 25 °C, and the reaction was stopped with the addition of 100  $\mu\text{L}$  of trichloroacetic acid (TCA) 2 mM. The reaction was cooled in ice bath and 100  $\mu\text{L}$  of NaOH at 2 mM were added, and it was centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes. The formation of *p*-nitrocatechol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_4$ ) was measured through absorbance at 520 nm, comparing against a calibration curve of 0.5

Aldrich) a 0.002, 0.01, 0.1, 1, 10  $\text{mg L}^{-1}$ ]. Las diluciones de HM se prepararon en etanol absoluto. En todos los casos, la concentración de etanol en el control de disolvente fue 0.001 % en agua sintética semidura. Los ensayos fueron realizados por triplicado en garrafrones de vidrio de 20 L a  $24 \pm 1$  °C con un volumen de 10 L de acuerdo con Dzul-Caamal *et al.*, (2013). Dado que estos tóxicos son volátiles cada 24 h se renovó el tratamiento y se retiró la aireación durante 1 h posterior a la aplicación. La aireación fue constante y se suministró mediante bombas de aire de la Marca Elite modelo 800.

### Biomarcadores

La necropsia se realizó inmediatamente para obtener el riñón que fue pesado con una precisión de 0.1 mg y homogenizado a 1:5 (p/v) con solución buffer de fosfato usando micropistilos de teflón. Una porción fue centrifugada a 9,000 X g y a 4 °C por 15 minutos para obtener la fracción S9. Las fracciones no centrifugadas y S9 fueron almacenadas a -80 °C hasta el ensayo de biomarcadores (menos de dos semanas) con excepción de la cuantificación de ROS cuyo análisis fue inmediato. La fracción S9 se usó para medir las fuerzas pro-oxidantes así como para realizar los ensayos enzimáticos mientras que la fracción no centrifugada para la medición de biomarcadores de daño oxidativo. Los resultados se expresaron de acuerdo con la naturaleza de cada biomarcador; sin embargo, todos los casos se normalizaron por g de pez como en Dzul-Caamal *et al.*, (2013).

### Biotransformación de HM

La actividad del CYP 2E1 (EC 1.14.14.1) se evaluó de acuerdo con el método de Cannady *et al.*, (2003). Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de fracción S9 y se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos (100 mM pH 6.8), se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de NADPH (50 mM) y 10  $\mu\text{L}$  de *p*-nitrofenol a 50 mM. La reacción se incubó una hora a 25 °C y la reacción se detuvo con la adición de 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 2 mM. La reacción se enfrió en baño de hielo y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de NaOH a 2 mM y se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos. La formación de *p*-nitrocatecol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_4$ ) se midió a través de la absorbancia a 520 nm, comparando contra una curva de calibración de 0.5 a 5 mM de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_4$ . Los resultados se reportaron como  $\mu\text{mol C}_6\text{H}_5\text{NO}_4/\text{min}/\text{mg proteína}/\text{g pez}$ .

El metabolismo de la GST isoforma tetha (GSTT) (EC 2.5.1.18) fue determinado de acuerdo con el método de Warholm *et al.*, (1994). Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de fracción S9,

to 5 mM of  $C_6H_5NO_4$ . Results were reported as  $\mu\text{mol } C_6H_5NO_4/\text{min/mg protein/g fish}$ .

The metabolism of GST tetha isoform (GSTT) (EC 2.5.1.18) was determined according to the method of Warholm *et al.*, (1994). 100  $\mu\text{L}$  of fraction S9, 150  $\mu\text{L}$  of TRIS-HCl (0.5 mM pH 7.4), 20  $\mu\text{L}$  of glutathione reduced (GSH) 100 mM and 5  $\mu\text{L}$  of  $CH_2Cl_2$  (grade HPLC,  $\geq 99.8\%$ , Sigma-Aldrich) were added. It was incubated at room temperature for three hours. 165  $\mu\text{L}$  of TCA 2 mM were added, agitated in vortex for 30 seconds and left to stand during 10 min at room temperature. 200  $\mu\text{L}$  of the supernatant were taken and poured in another tube and 600  $\mu\text{L}$  of bi-distilled water and 200  $\mu\text{L}$  of Nash reactive [3.892 M of ammonium acetate, 0.105 M of acetic acid, 0.019 M of 2,4-pentanedione (acetyl-acetone)] were added (Kleeberg and Klinger 1982).

The mix was incubated at 60 °C for 30 minutes; after, it was cooled in ice bath and concentration of formaldehyde ( $CH_2O$ ) was estimated at an absorbance of 414 nm using a standard curve of 0.01 to 0.1 mM. Results were expressed as  $\text{mmol } CH_2O/\text{min/mg protein/g fish}$ .

#### Pro-oxidant species

The quantification of ROS was made as in the previous report of Olivares-Rubio *et al.*, (2013). 160  $\mu\text{L}$  of fluorochromes solution [Take 1 mL of stock solution of diacetate of dichlorodihydrofluorescein (DFH-DA, 625  $\mu\text{M}$ ) (prepare 10 mL of DFH-DA 1:10 = 62.5  $\mu\text{M}$  in methanol), take 1 mL of dihydroethidium (DHE, 625  $\mu\text{M}$ ) 1:10 and dissolve in 8 mL of Hanks solution (120 mM of NaCl, 2.5 mM of KCl, 5.0 mM of  $NaHCO_3$ , 1.2 mM of  $NaH_2PO_4$ , 0.1 mM of  $MgCl_2$ , 6.0 mM of glucose, 1.0 mM of  $CaCl_2$ , 10 mM of HEPES)] in 96-well polystyrene plate were added. 20  $\mu\text{L}$  of fraction S9 and 20  $\mu\text{L}$  of NADH 1.4 mM were added and the concentration of  $H_2O_2$  at a excitation of 785 nm was immediately evaluated, and an emission of 525 nm with the molar extinction coefficient of 3,800  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and the concentration of  $O_2\bullet$  at an excitation of 530 nm and an emission of 624 nm with a molar extinction coefficient of 7,000  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , results are presented as  $\text{mol } g^{-1} \text{ fish}$ .

The content of  $CH_2O$  was measured in 200  $\mu\text{L}$  of fraction S9, 600  $\mu\text{L}$  of water and 200  $\mu\text{L}$  of Nash reactive (Kleeberg and Klinger, 1982) were added. The mix was incubated at 60 °C per 30 minutes and the absorbance

se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de TRIS-HCl (0.5 mM pH 7.4), 20  $\mu\text{L}$  de glutatión reducido (GSH) 100 mM y 5  $\mu\text{L}$  de  $CH_2Cl_2$  (grado HPLC,  $\geq 99.8\%$ , Sigma-Aldrich). Se incubó a temperatura ambiente por tres horas. Se adicionaron 165  $\mu\text{L}$  de TCA 2 mM, se agitó en vortex por 30 segundos y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se vertieron en otro tubo y se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Nash [3.892 M de acetato de amonio, 0.105 M de ácido acético, 0.019 M de 2,4-pentanediona (acetyl-acetona)] (Kleeberg y Klinger 1982).

La mezcla se incubó a 60 °C por 30 minutos, posteriormente se enfrió en baño de hielo y se estimó la concentración de formaldehído ( $CH_2O$ ) a una absorbancia de 414 nm empleando una curva estándar de 0.01 a 0.1 mM. Los resultados se expresaron como  $\text{mmol } CH_2O/\text{min/mg proteína/g pez}$ .

#### Especies pro-oxidantes

La cuantificación de ROS se realizó como en el reporte previo de Olivares-Rubio *et al.*, (2013). Se agregaron 160  $\mu\text{L}$  de solución de fluorocromos [Tomar 1 mL de solución madre de diacetato de diclorodihydrofluoresceina (DFH-DA, 625  $\mu\text{M}$ ) (preparar 10 mL de DFH-DA 1:10 = 62.5  $\mu\text{M}$  en metanol), tomar 1 mL de dihidroetidio (DHE, 625  $\mu\text{M}$ ) 1:10 y disolverlos en 8 mL de solución de Hanks (120 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 5.0 mM de  $NaHCO_3$ , 1.2 mM de  $NaH_2PO_4$ , 0.1 mM de  $MgCl_2$ , 6.0 mM de glucosa, 1.0 mM de  $CaCl_2$ , 10 mM de HEPES)] en placa de 96 pozos de poliestireno. Se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de la fracción S9 y 20  $\mu\text{L}$  de NADH 1.4 mM y se evaluó inmediatamente la concentración de  $H_2O_2$  a una excitación 785 nm y a una emisión de 525 nm con el coeficiente de extinción molar de 3,800  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y la concentración de  $O_2\bullet$  a una excitación de 530 nm y a una emisión de 624 nm con un coeficiente de extinción molar de 7,000  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , los resultados se presentan como  $\text{mol } g^{-1} \text{ pez}$ .

El contenido de  $CH_2O$  fue medido en 200  $\mu\text{L}$  de fracción S9, se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de agua y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Nash (Kleeberg y Klinger, 1982). La mezcla se incubó a 60 °C por 30 minutos y la absorbancia se evaluó a 414 nm para estimar el contenido de formaldehído contra una curva estándar (0.01 a 0.1 mM). Estos resultados se expresaron como  $\text{mmol } CH_2O/\text{g pez}$ .

#### Daño oxidativo

El contenido de ROOH se evaluó en la fracción no centrifugada como una medida de daños intermedios

was evaluated at 414 nm to estimate the content of formaldehyde using a standard curve (0.01 at 0.1 mM). These results are expressed as mmol CH<sub>2</sub>O/g fish.

#### Oxidative damage

The content of ROOH was evaluated in the non-centrifuged fraction as a measurement for intermediate damages in the polyunsaturated fatty acids of the cell membranes (Hermes-Lima, 2004) following the technique of Jiang *et al.*, (1991). 200 µL of the non-centrifuged homogenized were taken and added with 200 µL of cold methanol, agitated in vortex (approximately 30 seconds). They were centrifuged during 5 minutes at 10,000 g, the supernatant was withdrawn and cooled in ice bath. On the other hand, a solution was prepared as follows: 250 µL of FeSO<sub>4</sub> 2.5 mM, 500 µL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM and 250 µL of orange of xylene 100 mM (dissolved in methanol). The mix was incubated at 25 °C during 30 minutes, an aliquot of 60 µL of the supernatant (homogenized and methanol) was added and incubated at 25 °C for 12 hours. After that time, 5 µL of the solution of cumene hydroperoxide (1 mM dissolved in methanol) were added, incubated at 25 °C for 30 minutes and it was read at 580 against reagent blank without cumene hydroperoxide, to monitor oxidation of iron produced by the ROO• that generated ferric ion capable of reacting with the orange of xylene forming a colorful complex Fe<sup>+3</sup>- orange of xylene. The estimation of ROOH is calculated using a cumene hydroperoxide curve (0 to 10 nmol).

Evaluated lipid peroxidation as reactive substances to thiobarbituric acid (SRATB) was estimated in the non-centrifuged fraction with the technique of Buege and Aust (1978). 200 µL of the non-centrifuged fraction were taken and added with 500 µL of buffer solution TRIS-HCl 150 mM (pH 7.4) and incubated at 37 °C for 30 minutes. 1 mL of thiobarbituric acid (0.375 % p/v in TCA at 15 % v/v) was added and the reaction was boiled for 45 minutes. It was cooled in ice bath and centrifuged at 2,500 rpm for 5 minutes; absorbance was read at 535 nm to quantify the malondialdehyde by its molar extinction coefficient of (156,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Results were expressed as mmol ROOH/g fish and µmol SRATB/g fish for lipid hydroperoxide and lipid peroxidation, respectively.

Protein oxidation was determined by protocol of Levine *et al.*, (1994), based in the reaction of protein carbonyls (RC=O) with 2,4-dinitrophenil hydrazine (DNPH) in acid

en los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares (Hermes-Lima, 2004) siguiendo la técnica de Jiang *et al.*, (1991). Se tomaron 200 µL del homogenado sin centrifugar y se mezclaron con 200 µL de metanol frío, agitado en vórtex (aprox. 30 seg). Se centrifugaron 5 minutos a 10,000 g, se retiró el sobrenadante y se enfrió en baño de hielo. Por otra parte, se preparó una solución como sigue: 250 µL de FeSO<sub>4</sub> 2.5 mM, 500 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM y 250 µL de naranja de xilenol 100 mM (disuelto en metanol). La mezcla se dejó incubar a 25° C durante 30 minutos, se agrega una alícuota de 60 µL del sobrenadante (homogenado y metanol) y se incubó a 25° C por 12 horas. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 5 µL de la solución de hidropéroxido cumeno (1 mM disuelto en metanol), se incubó a 25 °C por 30 min y se lee a 580 nm contra blanco de reactivos sin hidropéroxido cumeno, para monitorear la oxidación del hierro producida por el ROO• que genera ión férrico capaz de reaccionar con el naranja de xilenol formando un complejo colorido Fe<sup>+3</sup>- naranja de xilenol. La estimación de ROOH se calcula usando una curva de hidropéroxido cumeno (0 a 10 nmol).

La peroxidación lipídica evaluada como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB) se estimó en la fracción no centrifugada con la técnica de Buege y Aust (1978). Se tomaron 200 µL de la fracción no centrifugada y se agregaron 500 µL de solución reguladora de TRIS-HCl 150 mM (pH 7.4) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Se añadió 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0.375 % p/v en TCA al 15 % v/v) y la reacción se llevó a ebullición por 45 minutos. Se enfrió en baño de hielo y se centrifugó a 2,500 rpm por 5 minutos y la absorbancia se leyó a 535 nm para cuantificar el malondialdehído mediante su coeficiente de extinción molar de (156,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Los resultados se expresaron como mmol ROOH/g pez y µmol SRATB/g pez para hidropéroxidos lipídicos y peroxidación lipídica, respectivamente.

La oxidación de proteínas se determinó mediante el protocolo de Levine *et al.*, (1994), basado en la reacción de carbonilos en proteínas (RC=O) con la 2,4-dinitrophenil hidrazina (DNPH) en medio ácido para generar dinitrofenilhidrazonas con absorbancia máxima a 366 nm. Se tomaron 500 µL de la fracción no centrifugada y se precipitaron con 100 µL de TCA al 30 % v/v en agitación lenta, se centrifugó a 3,000 rpm/ 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Se agregó al precipitado 500 µL de 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH 20 mM en HCl 2N), se agitó y se guardó a la oscuridad por 1 hora, agitando cada 10 min. Se preparó un blanco de reactivos solo con PBS y 500

mean to generate dinitrophenylhydrazines with maximum absorbance at 366 nm. 500  $\mu\text{L}$  of the non-centrifuged fraction were taken and precipitated with 100  $\mu\text{L}$  of TCA at 30 % v/v in slow agitation, centrifuged at 3,000 rpm/5 minutes and the supernatant was discharged. 500  $\mu\text{L}$  of 2,4 -dinitrophenyl hydrazine (DNPH 20 mM in HCl 2N) were added to the precipitated, and was agitated and kept in the dark for 1 hour, agitating every 10 min. A reagent blank was prepared only with PBS and 500  $\mu\text{L}$  of HCl 2N. After standing time, it was precipitated again with 500  $\mu\text{L}$  of TCA at 30 %, centrifuged at 3,000 rpm/5 min and the supernatant was disregarded. The precipitated was washed three times with 1 mL of ethanol-ethyl acetate (1:1 v/v) to eliminate the excess of DNPH and every wash was centrifuged at 3,000 rpm every 5 minutes. The supernatant was discharged and the precipitated was dissolved with 1.0 mL of urea (6 M in potassium phosphate 20 mM pH 2.5). It was incubated 1 hour at 37 °C previous agitation in vortex. The absorbance was evaluated at 366 nm and oxidation of proteins was calculated by CEM through the formation of dinitrophenylhydrazones (22  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Results are presented as  $\text{mmol RC=O/mg protein/g fish}$ .

#### Enzymes involved in the antioxidant defense

The activity of the superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) was evaluated according to the method of Misra and Fridovich (1972) with modifications: 20  $\mu\text{L}$  of fraction S9 were added to the quartz cell of 1  $\text{cm}^3$  and 800  $\mu\text{L}$  of test buffer (50 mM de  $\text{NaCO}_3$  and 0.1 mM of EDTA) were added; after, 10  $\mu\text{L}$  of NADH 0.03 mM were added and the absorbance was determined at 340 nm every 30 sec during 5 min against a reagent blank. The activity of the enzyme was calculated by consumption of NADH through its molar extinction coefficient (6.22  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). The catalase activity (CAT; EC 1.11.1.6) was evaluated using the method by Radi *et al.*, (1991): 20  $\mu\text{L}$  of the fraction S9 were taken and 800  $\mu\text{L}$  of the padding buffer solution (0.3 M sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES and 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) were added in quartz cell and 200  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM and the absorbance was recorded at 240 nm at 0, 30 and 60 seconds to evaluate the consumption of  $\text{H}_2\text{O}_2$  using its molar extinction coefficient of 0.043  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . The metabolism of the glutathione peroxidase dependent on selenium (GPx; EC 1.11.1.9) was quantified according to Lei *et al.*, (1995) with modifications: 20  $\mu\text{L}$  of fraction S9 were taken, 800  $\mu\text{L}$  of reaction buffer (0.5 M of TRIS-HCl, 25 mM of EDTA, 5 mM  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4) were added,

$\mu\text{L}$  de HCl 2N. Transcurrido el tiempo de reposo, se volvió a precipitar con 500  $\mu\text{L}$  de TCA al 30 %, se centrifugó a 3,000 rpm/5 min y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó tres veces con 1 mL de etanol-etil acetato (1:1 v/v) para eliminar el exceso de DNPH y se centrifugó cada lavado a 3,000 rpm cada 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el precipitado se disolvió con 1.0 mL de urea (6 M en fosfato de potasio 20 mM pH 2.5). Se incubó 1 hora a 37° C previa agitación en vortex. La absorbancia se evaluó a 366 nm y se calculó la oxidación de proteínas por el CEM por medio de la formación de dinitrofenilhidrazonas (22  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Los resultados se presentan como  $\text{mmol RC=O/mg proteína/g pez}$ .

#### Enzimas involucradas en la defensa antioxidante

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) se evaluó de acuerdo al método de Misra y Fridovich (1972) con modificaciones: se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de fracción S9 a la celda de cuarzo de 1  $\text{cm}^3$  y se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de buffer de prueba (50 mM de  $\text{NaCO}_3$  y 0.1 mM de EDTA); posteriormente, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de NADH 0.03 mM y la absorbancia se determinó a 340 nm cada 30 seg durante 5 min contra un blanco de reactivos. La actividad de la enzima se calculó mediante el consumo del NADH a través de su coeficiente de extinción molar (6.22  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). La actividad de la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) se evaluó por el método de Radi *et al.*, (1991): se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de fracción S9 y se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de aislamiento (0.3 M sucrosa, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en celda de cuarzo y 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM y se registró la absorbancia a 240 nm a los 0, 30 y 60 segundos para evaluar el consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  empleando su coeficiente de extinción molar de 0.043  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . El metabolismo de la glutatión peroxidasa dependiente de selenio (GPx; EC 1.11.1.9) se cuantificó de acuerdo a Lei *et al.*, (1995) con modificaciones: se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de fracción S9, se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción (0.5 M de TRIS-HCl, 25 mM de EDTA, 5 mM  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4), 10  $\mu\text{L}$  de glutatión reductasa a  $1.2 \times 10^{-5}$  U/L, 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 10  $\mu\text{L}$  de NADH a 0.03 mM y la absorbancia se monitoreo a 340 nm cada 30 segundos por 5 minutos para evaluar el consumo de NADH.

La actividad total de la glutatión S-transferasa (GST) se evaluó por el método espectrofotométrico de Boryslawskij *et al.*, (1988) con modificaciones: se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de fracción S9, se añadieron a la celda 800  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción (100 mM de fosfato de potasio, pH 6.5), 5  $\mu\text{L}$  de glutatión reducido a 1 mM.; posteriormente, se midió la

10  $\mu\text{L}$  of glutathione reductase at  $1.2 \times 10^{-5}$  U/L, 20  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 10  $\mu\text{L}$  of NADH at 0.03 mM were added, and the absorbance was monitored at 340 nm every 30 seconds per 5 minutes to evaluate the consumption of NADH.

The total activity of the glutathione S-transferase (GST) was evaluated using the spectrophotometric method of Boryslawskyj *et al.*, (1988) with modifications: 20  $\mu\text{L}$  of fraction S9 were taken, 800  $\mu\text{L}$  of reaction buffer (100 mM of potassium phosphate, pH 6.5) were added, 5  $\mu\text{L}$  of glutathione reduced at 1 mM; after, absorbance was measured at 430 nm every 30 seconds for 5 minutes to evaluate the formation of the complex 2,4-dichloronitrobenzene-glutathione using a molar extinction coefficient of  $8.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Habig *et al.*, 1974). The content of total proteins was determined using the kit Thermo Scientific Pierce® 660nm protein assay. The activities of SOD, CAT, GPx and GST are expressed in mmol/min/mg of protein/g of fish.

#### Statistical analysis

The response of the biomarkers of the test specimens regarding control was compared with one way posterior test ANOVA of Dunnett using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California. Results are considered significant to values of  $p \leq 0.05$ .

## Results and Discussion

#### Activity of CYP 2E1 and GSTT Activity

Renal activity of CYP 2E1 presented a pattern of similar response amongst the fishes exposed to  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{BrCHCl}_2$ . The maximum activity was detected in treatments of 0.03 mg  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{L}$  and 0.01 mg  $\text{BrCHCl}_2/\text{L}$ , which was significant ( $p < 0.01$ ). Nevertheless, this enzyme was tumbled at the higher concentration in a non-significant form (Figures 1A and 1C). In fishes exposed to  $\text{CHCl}_3$  in all treatments, the metabolism of CYP 2E1 was lower than control, not representing a significant finding (Figure 1B). On the other hand, renal activity of GSTT resulted similar between the HM under study, with a peak of activity at low concentrations, and at higher concentrations, there were reductions with no significant differences (Figures 1D, 1E and 1F). In this regard, there have been dependencies in the hepatic activity of CYP 2E1 in the common carp exposed to water treated with precursors of HM in controlled conditions

absorbancia a 430 nm cada 30 segundos por 5 minutos para evaluar la formación del complejo 2,4-dicloronitrobenzoglutathión empleando un coeficiente de extinción molar de  $8.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Habig *et al.*, 1974). El contenido de proteínas totales se determinó utilizando el kit Thermo Scientific Pierce® 660nm protein assay. Las actividades de SOD, CAT, GPx y GST se expresaron en mmol/min/mg de proteína/g de pez.

#### Análisis estadísticos

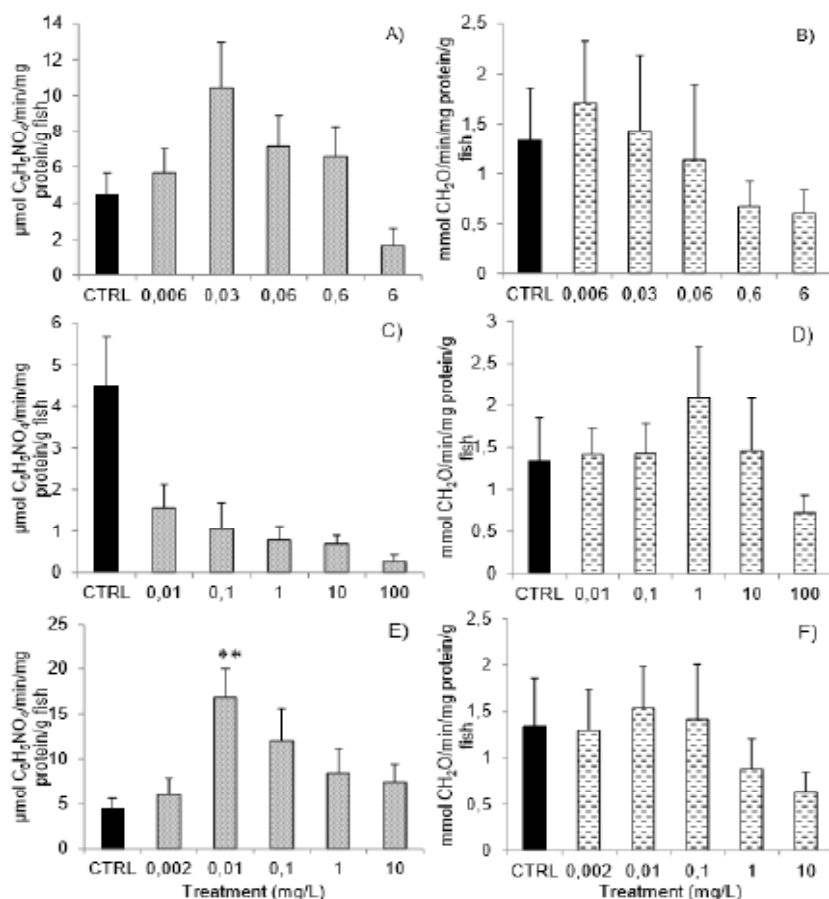
La respuesta de los biomarcadores de los especímenes de prueba con respecto al control se comparó con un ANOVA de una vía con prueba posterior de Dunnett utilizando GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California. Los resultados se consideraron significativos a valores de  $p \leq 0.05$ .

## Resultados y Discusión

#### Actividad del CYP 2E1 y de la GSTT

La actividad renal de CYP 2E1 presentó un patrón de respuesta similar entre los peces expuestos a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{BrCHCl}_2$ . La actividad máxima se detectó en los tratamientos de 0.03 mg  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{L}$  y de 0.01 mg  $\text{BrCHCl}_2/\text{L}$ , la cual fue significativa ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, esta enzima se abatió a la mayor concentración de manera no significativa (Figuras 1A y 1C). En los peces expuestos a  $\text{CHCl}_3$  en todos los tratamientos el metabolismo de CYP 2E1 fue menor que el control sin ser un hallazgo significativo (Figura 1B). Por otro lado, la actividad renal de GSTT resultó ser similar entre los HM bajo estudio con un pico de actividad a bajas concentraciones y, a mayores concentraciones hubo reducciones sin diferencias significativas (Figuras 1D, 1E y 1F). Al respecto, se han reportado abatimientos en la actividad hepática del CYP 2E1 en la carpa común expuesta al agua tratada con precursores de HM en condiciones controladas (Sapone *et al.*, 2007). En estudios previos de Olivares-Rubio *et al.*, (2013) se reportaron abatimientos en la actividad de estas enzimas (CYP 2E1 y GSTT) responsables de la biotransformación de HM en el hígado y en el riñón del tiro oscuro habitante de tres lagos del centro de México donde se estimaron contenidos de HM en el orden de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . En el hígado y en las vísceras de charal (*Chirostoma riojai*) de la Laguna de Zumpango, Estado de México, México, se encontraron incrementos únicamente en la actividad de CYP 2E1, mientras que la GSTT presentó abatimientos (Vega-López *et al.*, 2012). Las diferencias registradas





**Figure 1. Renal activity of CYP 2E1 and GSTT in *G. gracilis* exposed to  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  and  $\text{BrCHCl}_2$  under laboratory conditions during 96 hours.** A) CYP 2E1 by  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , B) CYP 2E1 by  $\text{CHCl}_3$ , C) CYP 2E1 by  $\text{BrCHCl}_2$ , D) GSTT by  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , E) GSTT by  $\text{CHCl}_3$ , and F) GSTT by  $\text{BrCHCl}_2$ . Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. CTRL = control of dissolvente (semi-hard water with ethanol to 0.001 %). Asterisks denote significant difference regarding control by one-way ANOVA with Dunnett test; \*\*,  $p < 0.01$ .

**Figura 1. Actividad renal de CYP 2E1 y GSTT en *G. gracilis* expuesta a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{BrCHCl}_2$  en condiciones de laboratorio por 96 h.** A) CYP 2E1 por  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , B) CYP 2E1 por  $\text{CHCl}_3$ , C) CYP 2E1 por  $\text{BrCHCl}_2$ , D) GSTT por  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , E) GSTT por  $\text{CHCl}_3$  y F) GSTT por  $\text{BrCHCl}_2$ . Datos expresados como promedio  $\pm$  error estándar de la media. CTRL = control de disolvente (agua semidura con etanol a 0.001 %). Los asteriscos denotan diferencia significativa respecto al control por ANOVA de una vía con prueba posterior de Dunnett; \*\*,  $p < 0.01$ .

(Sapone *et al.*, 2007). In previous studies from Olivares-Rubio *et al.*, (2013), despondencies in the activity of these enzymes (CYP 2E1 and GSTT) responsible for the biotransformation of HM in liver and kidney of dusky splitfin, inhabitant of three lakes in central Mexico, were content of HM were estimated in the order of  $\mu\text{g L}^{-1}$ . In liver and guts of charal fish (*Chirostoma riojai*) from the Laguna of Zumpango, Estado de Mexico, Mexico, increase only in the activity of CYP 2E1 were found, while GSST presented despondencies (Vega-López *et al.*, 2012). The recorded differences in the metabolisms of these enzymes can be due to the physiology of these species, and the state of pollution in the environments they inhabit, but mostly, they indicate dysregulations in the bioactivation processes (Parkinson and Ogilvie, 2008). Besides, in natural conditions there is a great variety of inductors and suppressors of these enzymes, where the response of the biomarkers is complex and multifactorial. These gathering of findings suggests that HM are able to induce oxidative damage even in the enzymes that biotransform them (CYP 2E1 and GSTT) by production of species extremely reactive to phosgene, N-(2-oxothiazolidine-4-carbonyl)-glycine and HCl (Uraga-Tovar *et al.*, 2014). A detailed scheme on the formation of reactive and oxidative species, as the production of ROS, product of the biotransformation of HMs under study, can be consulted in Uraga-Tovar *et al.*, (2014). On the other hand, Dzul Caamal *et al.*, (2013) reported increases in the hepatic activity of these enzymes in *G. gracillis* exposed to these toxics; while in this work, the renal response was related with the type of HM. These differences can be due to the functionality of both organs; for its corporal volume, liver is the main site of biotransformation (Kleinow *et al.*, 1987) and kidney is the main hematopoietic organ of fishes (Davidson and Zon, 2004), but in the latter, biotransformation also occurs (Schnellmann, 2008).

#### Pro-oxidant forces ( $\text{O}_2\cdot$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ and $\text{CH}_2\text{O}$ )

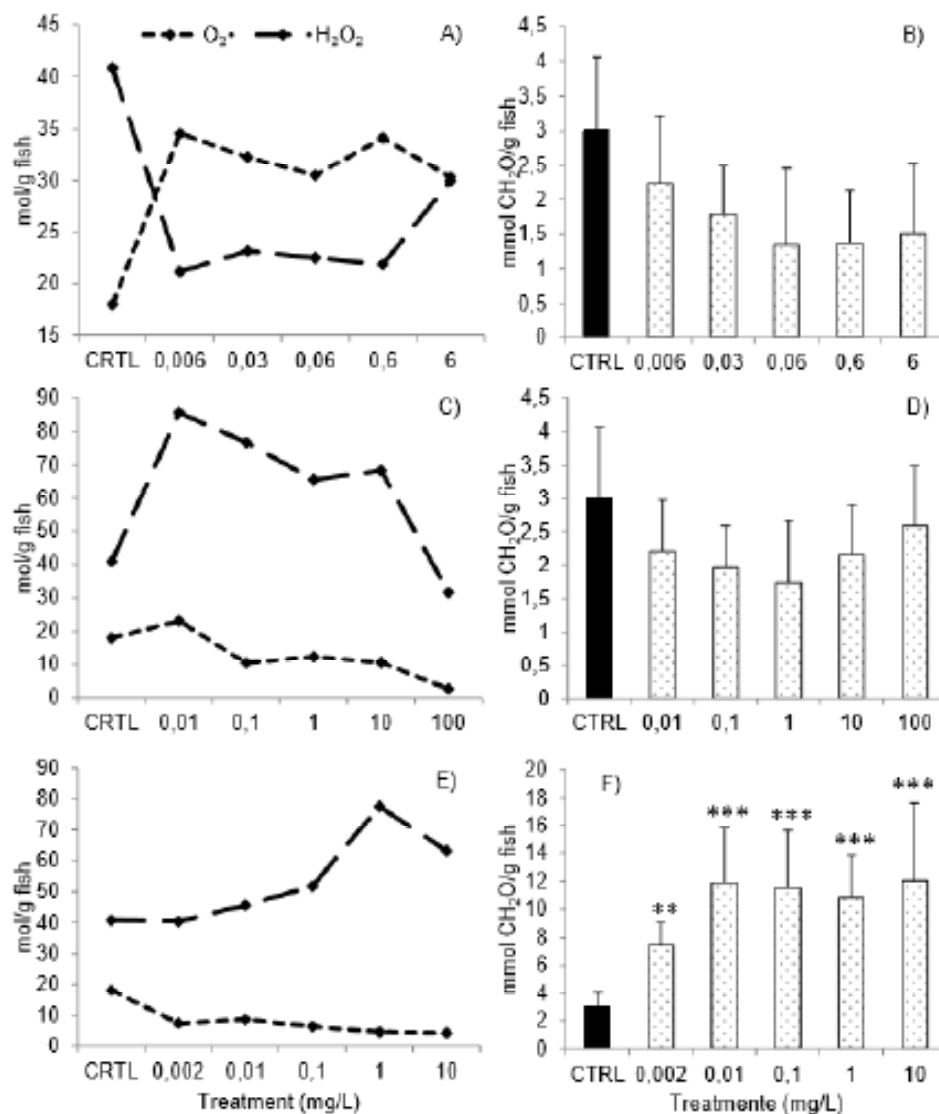
Concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was higher than  $\text{O}_2\cdot$  in the kidney of control specimens. In fishes treated with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , in all treatments, the content of  $\text{O}_2\cdot$  was higher than in control, and also comparatively with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 2A). However, in the kidney of dusky splitfin exposed to  $\text{CHCl}_3$ , concentration of  $\text{O}_2\cdot$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  had an inverse response with the concentration (Figure 2B) overall. By effect of  $\text{BrCHCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  increased and  $\text{O}_2\cdot$  was deflated regarding control, almost proportionally (Figure 2C).

en los metabolismos de estas enzimas pueden deberse a la fisiología de estas especies de peces, así como del estado de contaminación de los ambientes que habitan, pero sobre todo indican desregulaciones en los procesos de bioactivación (Parkinson y Ogilvie, 2008). Además, en condiciones naturales existe una gran variedad de inductores y supresores de estas enzimas, donde la respuesta de los biomarcadores es compleja y multifactorial. Este conjunto de hallazgos sugiere que los HM son capaces de inducir daño oxidativo inclusive en las enzimas que los biotransforman (CYP 2E1 y GSTT) mediante la producción de especies extremadamente reactivas como el fosgeno, N-(2-oxotiazolodina-4-carbonil)-glicina y HCl (Uraga-Tovar *et al.*, 2014). Un detallado esquema sobre la formación de especies reactivas y oxidantes, así como de la producción de ROS producto de la biotransformación de los HM bajo estudio, puede ser consultado en Uraga-Tovar *et al.*, (2014). Por otro lado, Dzul Caamal *et al.*, (2013) reportaron incrementos en la actividad hepática de estas enzimas en *G. gracillis* expuesto a estos tóxicos; mientras que en el presente trabajo la respuesta renal tuvo relación con el tipo de HM. Estas diferencias pueden deberse a la funcionalidad de ambos órganos, el hígado por su volumen corporal es el sitio principal de biotransformación (Kleinow *et al.*, 1987) y el riñón es el principal órgano hematopoyético de los peces (Davidson y Zon, 2004), pero en éste también ocurre la biotransformación (Schnellmann, 2008).

#### Fuerzas pro-oxidantes ( $\text{O}_2\cdot$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ y $\text{CH}_2\text{O}$ )

En el riñón de los ejemplares control, la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue mayor que el  $\text{O}_2\cdot$ . En los peces tratados con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , en todos los tratamientos el contenido de  $\text{O}_2\cdot$  estuvo mas elevado que en controles y también comparativamente con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 2A). Sin embargo, y de manera general, en el riñón del tiro oscuro expuesto a  $\text{CHCl}_3$ , la concentración de  $\text{O}_2\cdot$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  tuvo una respuesta inversa con la concentración (Figura 2B). Por efecto del  $\text{BrCHCl}_2$ , el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se incrementó y el  $\text{O}_2\cdot$  se abatió respecto al control, casi de manera proporcional (Figura 2C).

El  $\text{O}_2$  participa en la selección negativa y positiva de las células progenitoras hematopoyéticas que ocurre en la cabeza del riñón; en adición, las células inmunocompetentes producen ROS como mecanismo de defensa (Janeway y Medzhitov 2002; Davidson y Zon, 2004). Además, la generación de estas especies químicas son producto de un conjunto de enzimas con actividad oxido-reductasa (Lushchak, 2011). El contenido renal de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue más elevado que el de  $\text{O}_2\cdot$  en los peces control,



**Figure 2.** Levels of pro-oxidant forces ( $O_2\cdot$ ,  $H_2O_2$  and  $CH_2O$ ) in the kidney of *G. gracilis* treated with  $CH_2Cl_2$ ,  $CHCl_3$  and  $BrCHCl_2$  under laboratory conditions by 96 hours. A)  $O_2\cdot$  and  $H_2O_2$  by  $CH_2Cl_2$ , B)  $O_2\cdot$  and  $H_2O_2$  by  $CHCl_3$ , C)  $O_2\cdot$  and  $H_2O_2$  by  $BrCHCl_2$ , D)  $CH_2O$  by  $CH_2Cl_2$ , E)  $CH_2O$  by  $CHCl_3$ , and F)  $CH_2O$  by  $BrCHCl_2$ . Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. CTRL = control of dissolvent (semi-hard water with ethanol to 0.001 %). Asterisks denote significant difference regarding to control by one-way ANOVA with Dunnet test; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001.

**Figura 2.** Niveles de fuerzas pro-oxidantes ( $O_2\cdot$ ,  $H_2O_2$  y  $CH_2O$ ) en el riñón de *G. gracilis* tratado con  $CH_2Cl_2$ ,  $CHCl_3$  y  $BrCHCl_2$  en condiciones de laboratorio por 96 h. A)  $O_2\cdot$  y  $H_2O_2$  por  $CH_2Cl_2$ , B)  $O_2\cdot$  y  $H_2O_2$  por  $CHCl_3$ , C)  $O_2\cdot$  y  $H_2O_2$  por  $BrCHCl_2$ , D)  $CH_2O$  por  $CH_2Cl_2$ , E)  $CH_2O$  por  $CHCl_3$  y F)  $CH_2O$  por  $BrCHCl_2$ . Datos expresados como promedio  $\pm$  error estándar de la media. CTRL = control de disolvente (agua semi dura con etanol a 0.001 %). Los asteriscos denotan diferencia significativa respecto al control por ANOVA de una vía con prueba posterior de Dunnett; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 y \*\*\* $p$ <0.001.

O<sub>2</sub> participates in the negative and positive selection of hematopoietic progenitor cells that occurs in the head of the kidney; in addition, immunocompetent cells produce ROS as defense mechanism (Janeway and Medzhitov 2002; Davidson and Zon, 2004). Besides, the generation of these chemical species are product of a group of enzymes with oxidoreductase activity (Lushchak, 2011). The renal content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was more elevated than O<sub>2</sub><sup>•</sup> in control, which can be explained by the autodismutation of the superoxide anion to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hermes-Lima, 2004), besides HO<sup>•</sup> and peroxidases of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that can also oxidize diacetate of dihydrofluorescein (Gutteridge and Halliwell, 2010). Vega-López *et al.*, (2009a) suggest that through the activity of CYP 450 ROS can be generated, by the decoupling in the flux of electrons during its catalysis. It has been shown that the activity of the isoform 2E1 of CYP 450 is involving the generation of ROS, particularly O<sub>2</sub><sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyethyl radicals (Linhart *et al.*, 2014). This indicates that at a higher renal activity of CYP 2E1 in *G. gracilis* exposed to CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and BrCHCl<sub>2</sub>, ROS are generated. In the water bodies where dusky splitfin inhabits, HMs were detected, and in these specimens a decrease in the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in liver and kidney was presented, whilst O<sub>2</sub><sup>•</sup> was higher in non-exposed fishes (Olivares-Rubio *et al.*, 2013). Despite the toxic effects of the HM, the contribution of selection of immunocompetent cells in the pronephros with the variations detected in ROS in this study is not disregarded. In addition, activated cells by immune response of the kidney's head of fishes induce these chemical species, contributing to its high dynamism in the cellular environment.

The levels of formaldehyde induced by CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and CHCl<sub>3</sub> were under basal; nevertheless, CHCl<sub>3</sub> to 1, 10 y 100 mg L<sup>-1</sup> caused an increase in the concentration of CH<sub>2</sub>O depending on the treatment but without reaching the levels of controls (Figures 2D and 2E). This response can be due to the autoregulation of CYP 2E1, mainly in the specimens exposed to chlorinated HM. In this sense, it is plausible that the metabolism of the GSTT, CH<sub>2</sub>O also contributed as one of its metabolites; however, there was no evident relationship as observed with the CYP 2E1. Dzul-Caamal *et al.*, (2013) recorded significant increases of formaldehyde in the liver of dusky splitfin treated in the same conditions as this study; besides, a higher catalysis of CYP 2E1 and GSTT regarding control was estimated. In contrast, the BrCHCl<sub>2</sub> induced a noticeable increase in the renal concentration of CH<sub>2</sub>O ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ; Figures 2F) which coincides with the increases in the

el cual puede explicarse por la autodismutación del anión superóxido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hermes-Lima, 2004), además del HO<sup>•</sup> y peroxidases de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que pueden también oxidar al diacetato de dihidrofluoresceína (Gutteridge y Halliwell, 2010). Vega-López *et al.*, (2009a) sugieren que a través de la actividad del CYP 450 se pueden generar ROS, mediante el desacoplamiento en el flujo de electrones durante su catálisis. De manera contundente se ha demostrado que la actividad de la isoforma 2E1 del CYP 450 está involucrado en la generación de ROS, particularmente del O<sub>2</sub><sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de radicales hidroxietilados (Linhart *et al.*, 2014). Esto indica que a mayor actividad renal del CYP 2E1 en *G. gracilis* expuesta a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y BrCHCl<sub>2</sub> se generan ROS. En los cuerpos de agua donde habita el tiburón oscuro se detectaron HM y en estos ejemplares se presentó un abatimiento en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el hígado y en el riñón, mientras que el O<sub>2</sub><sup>•</sup> fue mayor en los peces no expuestos (Olivares-Rubio *et al.*, 2013). A pesar de los efectos tóxicos de los HM, no se descarta que la selección de células inmunocompetentes en el pronefros contribuyera también con las variaciones detectadas de ROS en el estudio actual. En adición, las células activadas por respuesta inmune de la cabeza del riñón de los peces inducen a estas especies químicas, contribuyendo a su alto dinamismo en el ambiente celular.

Los niveles de formaldehído inducidos por CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CHCl<sub>3</sub> estuvieron por debajo del basal; no obstante, el CHCl<sub>3</sub> a 1, 10 y 100 mg L<sup>-1</sup> causó un incremento en la concentración de CH<sub>2</sub>O dependiente del tratamiento pero sin alcanzar los niveles de los controles (Figuras 2D y 2E). Esta respuesta puede deberse a la autorregulación del CYP 2E1, principalmente en los especímenes expuestos a HM clorados. En el mismo sentido es plausible que el metabolismo de la GSTT aportara también CH<sub>2</sub>O como uno de sus metabolitos; sin embargo, no hubo relación evidente como se observó con el CYP 2E1. Dzul-Caamal *et al.*, (2013) registraron incrementos significativos de formaldehído en el hígado del tiburón oscuro tratado en las mismas condiciones del presente estudio; además en este órgano se estimó una mayor catálisis del CYP 2E1 y de la GSTT respecto al control. En contraste, el BrCHCl<sub>2</sub> indujo un notable incremento en la concentración renal de CH<sub>2</sub>O ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ ; Figuras 2F) que coincide con incrementos en la actividad CYP 2E1. Este hallazgo está en concordancia con reportes previos donde se ha demostrado que este citocromo puede producir compuestos como el CH<sub>2</sub>O (Dekant y Vamvakas, 1993). Sin embargo, en peces estos mecanismos de toxicidad han sido poco estudiados (Teuschler *et al.*, 2000; Sapone *et al.*, 2007; Dzul-Caamal *et*

activity CYP 2E1. This finding is in accordance to previous reports where it has been shown that this cytochrome can produce compounds as  $\text{CH}_2\text{O}$  (Dekant and Vamvakas, 1993). However, these mechanisms of toxicity have been poorly studied in studied fishes (Teuschler *et al.*, 2000; Sapone *et al.*, 2007; Dzul-Caamal *et al.*, 2013; Uraga-Tovar *et al.*, 2014). The group of events observed in this study and previous findings suggest that the activity of the enzymes involved in the biotransformation of HM is an important source of  $\text{CH}_2\text{O}$ , in particular, the isoform 2E1 del CYP 450.

#### Oxidative damage (ROOH, SRATB and RC=O)

Only  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was capable of increasing damages in the cellular membranes (ROOH and SRATB) dependently from the concentration (Figure 3A). The latter indicates that the oxidation in phospholipids of the membrane occurred in both intermediate (ROOH) and terminal (SRATB) stages. On the other hand,  $\text{CHCl}_3$  provoked maximum damage at low concentrations (0.01 mg  $\text{L}^{-1}$  for ROOH and 0.1 mg  $\text{L}^{-1}$  for SRATB) and after, there were dejections regarding non-exposed fish (Figure 3B). Renal levels of ROOH of dusky splitfin treated with  $\text{BrCHCl}_2$  were slightly higher than control. In contrast, SRATB had an inversely proportional decrease with the test concentrations (Figure 3C), phenomena that can be linked to the low contents of  $\text{O}_2\cdot$ . Previous reports from Dzul-Caamal *et al.*, (2013) indicate that lipid peroxidation in liver of *G. gracilis* was higher than in controls. Probably, the induction of reactive and oxidant compounds generated by CYP 2E1 and GSTT participate in the oxidative process. In addition, the GPx can neutralize  $\text{ROO}\cdot$  to form alcohols (Thomas *et al.*, 1990), or by radical reactions, the formation of polymers with low biological activity is feasible (Gregus, 2008).

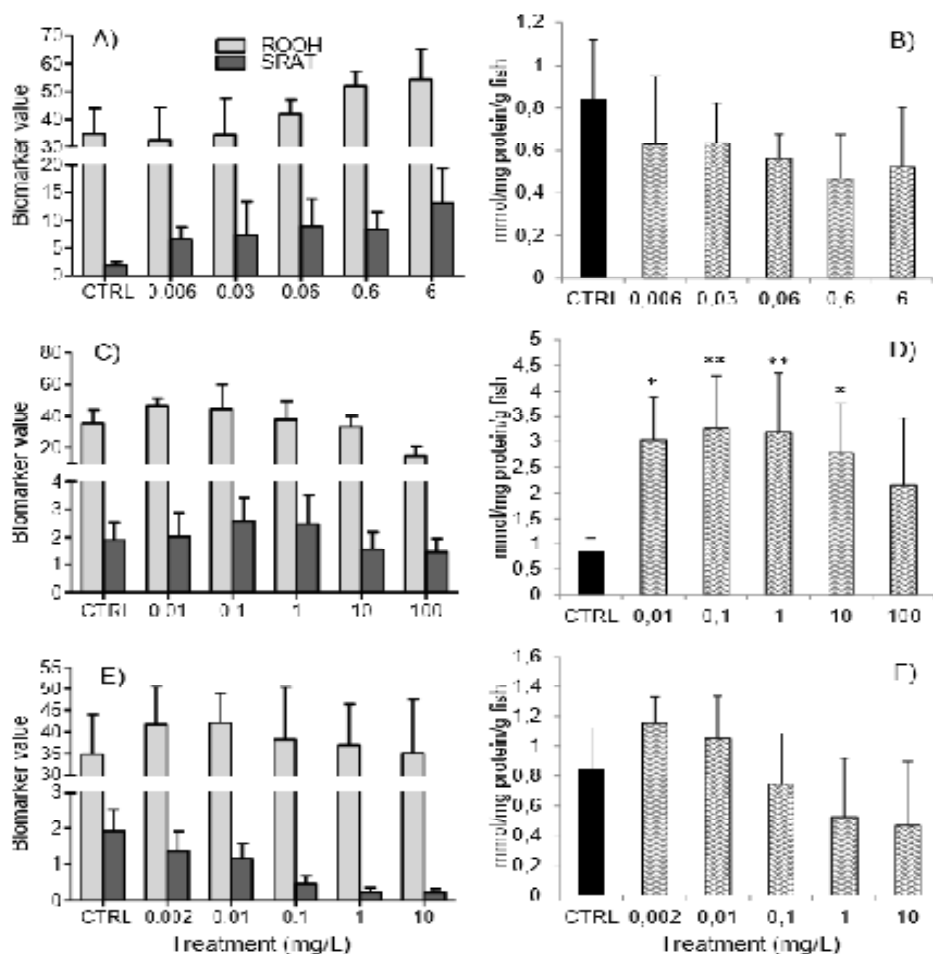
The content of RC=O was minor in the kidneys of fishes treated with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  respect to control (Figure 3D). Only at low concentrations of  $\text{BrCHCl}_2$  (0.002 and 0.01 mg  $\text{L}^{-1}$ ) oxidation of proteins was above controls, while in the rest of treatments, levels of RC=O were lower (Figure 3F). In contrast, in specimens of dusky splitfin exposed to  $\text{CHCl}_3$  levels of RC=O were above controls ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ; Figure 3E). In some water bodies, the renal content of RC=O in *G. gracilis* was below controls (Olivares-Rubio *et al.*, 2013), as it was also observed in fishes exposed to  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{BrCHCl}_2$ . It is probable that in both the aquatic environment and controlled

*al.*, 2013; Uraga-Tovar *et al.*, 2014). El conjunto de eventos observados en el presente estudio y hallazgos previos sugieren que la actividad de las enzimas involucradas en la biotransformación de HM es una fuente importante de  $\text{CH}_2\text{O}$ , en particular la isoforma 2E1 del CYP 450.

#### Daño oxidativo (ROOH, SRATB and RC=O)

Solo el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fue capaz de incrementar daños en las membranas celulares (ROOH y SRATB) de manera dependiente de la concentración (Figura 3A). Lo anterior indica que la oxidación de fosfolípidos de membrana ocurrió tanto en estadios intermedios (ROOH) como terminales (SRATB). Por otra parte, el  $\text{CHCl}_3$  provocó un daño máximo a concentraciones bajas (0.01 mg  $\text{L}^{-1}$  para ROOH y 0.1 mg  $\text{L}^{-1}$  para SRATB) y posteriormente hubo abatimientos con respecto a los peces no expuestos (Figura 3B). Los niveles renales de ROOH del tiro oscuro tratado con  $\text{BrCHCl}_2$  fueron ligeramente mayores que en el control. En contraste, las SRATB tuvieron un decremento inversamente proporcional con las concentraciones de prueba (Figura 3C) fenómeno que se puede vincular con los bajos contenidos de  $\text{O}_2\cdot$ . Reportes previos de Dzul-Caamal *et al.*, (2013) indican que la peroxidación lipídica en el hígado de *G. gracilis* fue mayor que en los controles. Probablemente la inducción de compuestos reactivos y oxidantes generados por CYP 2E1 y GSTT participan en el proceso oxidativo. Además la GPx puede neutralizar al  $\text{ROO}\cdot$  para formar alcoholes (Thomas *et al.*, 1990) o por reacciones radicalarias es factible la formación de polímeros con baja actividad biológica (Gregus, 2008).

El contenido de RC=O fue menor en los riñones de los peces tratados con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  respecto al control (Figura 3D). Solamente a concentraciones bajas de  $\text{BrCHCl}_2$  (0.002 y 0.01 mg  $\text{L}^{-1}$ ) la oxidación de proteínas estuvo por arriba de los controles, mientras que en el resto de los tratamientos los niveles de RC=O fueron menores (Figura 3F). En contraste, en los ejemplares de tiro oscuro expuestos a  $\text{CHCl}_3$  los niveles de RC=O estuvieron por arriba de los controles ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ ; Figura 3E). En algunos cuerpos de agua el contenido renal de RC=O en *G. gracilis* estuvo por debajo de los controles (Olivares-Rubio *et al.*, 2013) como fue observado también en los peces expuestos a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{BrCHCl}_2$ . Es probable que tanto en el ambiente acuático como en condiciones controladas, la oxidación de proteínas halla disminuido debido a los procesos de ubiquitinación dependiente de ATP por la vía de proteasas endógenas como la cathepsina c, calpaina y tripsina así como por acción del proteasoma como una medida de autorregulación (Hermes-Lima, 2004).



**Figure 3.** Lipid peroxidation evaluated as tiobarbituric acid reactive substances (TBARS), content of lipidic hydroperoxides (ROOH) and protein oxidation (RC=O) in the kidney of *G. gracilis* treated with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub> and BrCHCl<sub>2</sub> under laboratory conditions by 96 hours. A) TBARS and ROOH by CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B) TBARS and ROOH by CHCl<sub>3</sub>, C) TBARS and ROOH by BrCHCl<sub>2</sub>, D) RC=O by CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, E) RC=O by CHCl<sub>3</sub>, and F) RC=O by BrCHCl<sub>2</sub>. Data were expressed as mean ± standard error of the mean. CTRL = control of dissolvent (semi-hard water with ethanol to 0.001 %). Asterisks denote significant difference regarding to control by one-way ANOVA with Dunnett test; \**p*<0.05 and \*\**p*<0.01.

**Figura 3.** Peroxidación lipídica evaluada como SRATB, contenido de hidroperóxidos lipídicos (ROOH) y oxidación de proteínas (RC=O) en el riñón de *G. gracilis* tratado con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub> y BrCHCl<sub>2</sub> en condiciones de laboratorio por 96 h. A) TBARS y ROOH por CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, B) TBARS y ROOH por CHCl<sub>3</sub>, C) TBARS y ROOH por BrCHCl<sub>2</sub>, D) RC=O por CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, E) RC=O por CHCl<sub>3</sub> y F) RC=O por BrCHCl<sub>2</sub>. Datos expresados como promedio ± error estándar de la media. CTRL = control de disolvente (agua semidura con etanol a 0.001 %). Los asteriscos denotan diferencia significativa respecto al control por ANOVA de una vía con prueba posterior de Dunnett; \**p*<0.05 y \*\**p*<0.01.

conditions, oxidation of proteins has decreased due to processes of ubiquitination depending of ATP through endogenous proteases, as the cathepsin c, calpain and trypsin, and by action of the proteasome as a mechanism of autoregulation (Hermes-Lima, 2004).

#### Enzymes involved in the antioxidant defense (SOD, CAT and GPx) and GST

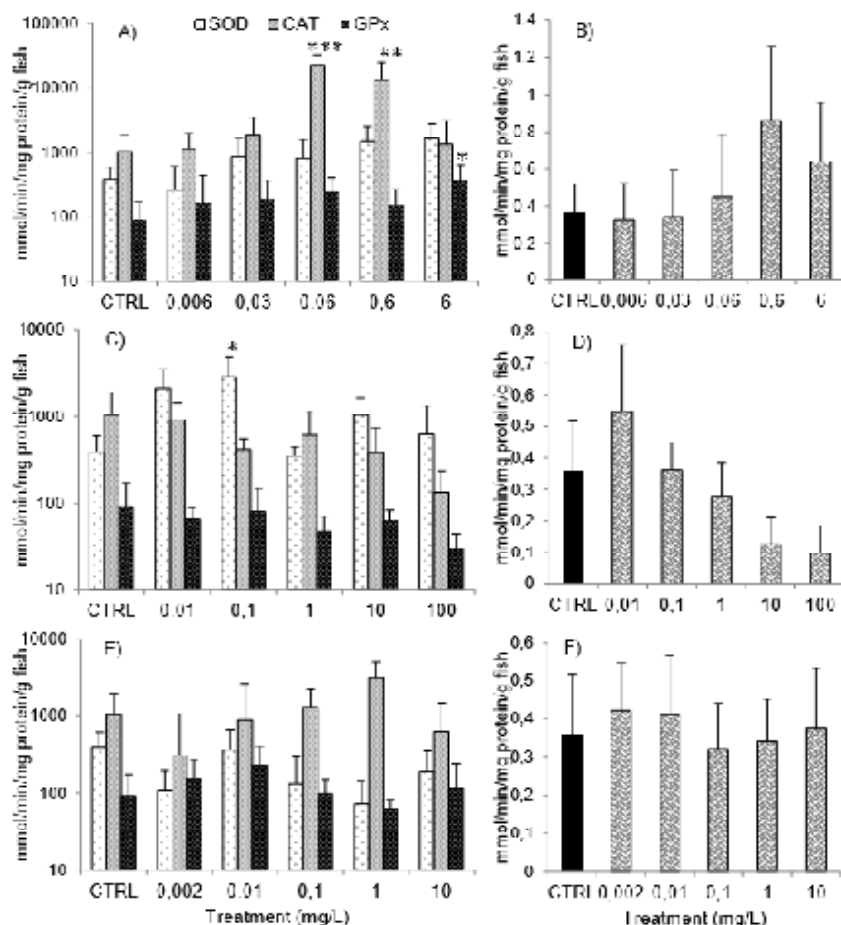
Overall, renal activity SOD of fishes treated with chlorinated HM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{CHCl}_3$ ) was higher with respect to the response of controls ( $p < 0.05$ ;  $\text{CHCl}_3$  to  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ); while in those exposed to  $\text{BrCHCl}_2$ , the metabolism of this enzyme was lower in relation to control group (Figures 4A, 4B and 4C). The participation of SOD catalysis in homeostatic maintenance of  $\text{O}_2^\bullet$  in the kidney of dusky splitfin is not disregarded. Probably, because this tissue is the main hematopoietic organ and production of  $\text{O}_2^\bullet$  is a defense mechanism in the innate immunity. Similar results were found in the liver of *G. gracilis* exposed in the same conditions in this study (Dzul-Caamal *et al.*, 2013). Nevertheless, the  $\text{BrCHCl}_2$  reduced the SOD activity in the kidney of *G. gracilis*, probably by damages in the active site of this enzyme or by an unbalance in the oxidation of  $\text{NADP}^+$  (Olivares-Rubio *et al.*, 2013).

In *G. gracilis* treated with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  renal activity of CAT was higher than in controls ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ) in contrast to fishes exposed to  $\text{CHCl}_3$ . But with  $\text{BrCHCl}_2$  catalysis of this enzyme was irregular (Figures 4A, 4B and 4C). Generally, renal activity of GPx in *G. gracilis* exposed to  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{BrCHCl}_2$  was higher with controls, contrary to  $\text{CHCl}_3$ , where an inverse relation with the concentration of treatments was detected (Figures 4A, 4B and 4C). CAT and GPx participate in the reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to  $\text{H}_2\text{O}$  (Hermes-Lima, 2004). In the case of increases in both enzymes, it is likely that  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced by the catalysis of SOD or by auto-dismutation of  $\text{O}_2^\bullet$  contributed to the induction of CAT and GPx by increases in the concentration of their substrate. Nevertheless, in the case of dejections, it is feasible that other oxidative and reactive forces derived from biotransformation of HM provoked damages to the active site of these enzymes, altering their catalysis, as it has been suggested for CAT of *Ameca splendens* exposed to polychlorinated biphenyls (Vega-López *et al.*, 2009b). It was not possible to clearly observe relations between the activity of these antioxidant defenses (SOD, CAT and GPx) and the content of ROS ( $\text{O}_2^\bullet$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). The previous phenomena suggest that the activity of the antioxidant

#### Enzymas involucradas en la defensa antioxidante (SOD, CAT y GPx) y GST

De manera general, la actividad renal SOD de los peces tratados con HM clorados ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{CHCl}_3$ ) fue mayor respecto a la respuesta de los controles ( $p < 0.05$ ;  $\text{CHCl}_3$  a  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ); mientras que en los expuestos a  $\text{BrCHCl}_2$  el metabolismo de esta enzima fue menor con relación al grupo control (Figuras 4A, 4B y 4C). No se descarta que la catálisis de SOD halla participado en mantenimiento homeostático de  $\text{O}_2^\bullet$  en el riñón del tiro oscuro. Posiblemente porque este tejido es el principal órgano hematopoyético y la producción de  $\text{O}_2^\bullet$  es un mecanismo de defensa de la inmunidad innata. Resultados similares fueron encontrados en el hígado de *G. gracilis* expuesto en las mismas condiciones del presente estudio (Dzul-Caamal *et al.*, 2013). No obstante, el  $\text{BrCHCl}_2$  redujo la actividad de SOD en el riñón de *G. gracilis* probablemente por daños en el sitio activo de esta enzima o por un desequilibrio en la oxidación de  $\text{NADP}^+$  (Olivares-Rubio *et al.*, 2013).

En *G. gracilis* tratada con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  la actividad renal de CAT fue mayor que en los controles ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ ) en contraste con los peces expuestos a  $\text{CHCl}_3$ . Pero con  $\text{BrCHCl}_2$  la catálisis de esta enzima estuvo irregular (Figuras 4A, 4B y 4C). De manera general, la actividad renal de GPx en *G. gracilis* expuesto a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{BrCHCl}_2$  fue mayor que los controles, caso contrario con el  $\text{CHCl}_3$  donde se detectó una relación inversa con la concentración de los tratamientos (Figuras 4A, 4B y 4C). La CAT y GPx participan en la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (Hermes-Lima, 2004). En el caso de incrementos de ambas enzimas es probable que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido por la catálisis de SOD o por la autodismutación de  $\text{O}_2^\bullet$  contribuyeran con la inducción de CAT y GPx mediante incrementos en la concentración de su sustrato. Sin embargo, en el caso de abatimientos es factible que otras fuerzas oxidantes y reactivas derivadas de la biotransformación de HM provocaron daños al sitio activo de estas enzimas alterando su catálisis como se ha sugerido para la CAT de *Ameca splendens* expuesta a bifenilos policlorados (Vega-López *et al.*, 2009b). No fue posible observar de manera clara relaciones entre la actividad de estas defensas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) y el contenido de ROS ( $\text{O}_2^\bullet$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Los fenómenos anteriores sugieren que la actividad de la defensa antioxidante en el riñón de *G. gracilis* es compleja y puede alterarse por varios factores intrínsecos y medioambientales.



**Figure 4. Activity of the enzymes involved in the antioxidant defense (SOD, CAT and GPx) and conjugation (GST) in the kidney of *G. gracilis* treated with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  and  $\text{BrCHCl}_2$  under laboratory conditions by 96 hours.** A) SOD, CAT and GPx by  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , B) SOD, CAT and GPx by  $\text{CHCl}_3$ , C) SOD, CAT and GPx by  $\text{BrCHCl}_2$ , D) GST by  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , E) GST by  $\text{CHCl}_3$ , and F) GST by  $\text{BrCHCl}_2$ . Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. CTRL = control of dissolvent (semi-hard water with ethanol to 0.001 %). Asterisks denote significant difference regarding to control by one-way ANOVA with Dunnet test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figura 4. Actividad de las enzimas involucradas en la defensa antioxidante (SOD, CAT y GPx) y de conjugación (GST) en el riñón de *G. gracilis* tratado con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{BrCHCl}_2$  en condiciones de laboratorio por 96 h.** A) SOD, CAT y GPx por  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , B) SOD, CAT y GPx por  $\text{CHCl}_3$ , C) SOD, CAT y GPx por  $\text{BrCHCl}_2$ , D) GST por  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , E) GST por  $\text{CHCl}_3$  y F) GST por  $\text{BrCHCl}_2$ . Datos expresados como promedio  $\pm$  error estándar de la media. CTRL = control de disolvente (agua semidura con etanol a 0.001%). Los asteriscos denotan diferencia significativa respecto al control por ANOVA de una vía con prueba posterior de Dunnett; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .



defense in the kidney of *G. gracilis* is complex, and can be altered by several intrinsic and environmental factors.

In specimens of dusky splitfin treated with  $\text{CHCl}_3$  the activity of GST was lower respect to control, with exception of 0.01 and 0.1 mg  $\text{CHCl}_3/\text{L}$  (Figure 4E). On the other hand, the activity of this enzyme was similar and irregular with respect to control, and between treatments in fishes exposed to  $\text{BrCHCl}_2$  (Figure 4F). These findings are similar to those found in the kidney of this species inhabiting in three lakes in Central Mexico, where the metabolism of GST was lower than controls. A phenomena that can be explained through the disruption of the conjugation routes with glutathione (Olivares-Rubio *et al.*, 2013). In contrast, the renal activity of GST presented a concentration-dependent response of 0.006 to 0.6 mg  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{L}$  (Figure 4D). The observed response agrees with the hepatic catalysis of GST of common carp exposed for 10 and 20 days to  $\text{ClO}_2$ ,  $\text{NaClO}$  and paracetic acid (Elia *et al.*, 2006), probably by the high stereo-selectivity of GST for several electrophilic substrates (Mannervik *et al.*, 1988).

Due to its functions in the immune response and the filtration, the kidney seems to be a low sensible tissue to the effects of HM in controlled conditions. Further studies are required to determine if the presence of HM in the bodies of water represents a significant risk for the ichthyofauna and other aquatic organisms.

En los ejemplares de tiro oscuro tratados con  $\text{CHCl}_3$  la actividad de GST fue menor respecto al grupo control, con excepción de 0.01 y 0.1 mg  $\text{CHCl}_3/\text{L}$  (Figura 4E). Por otra parte, la actividad de esta enzima fue similar e irregular respecto al control y entre tratamientos en los peces expuestos a  $\text{BrCHCl}_2$  (Figura 4F). Estos hallazgos son similares a los encontrados en el riñón de esta especie habitante de tres lagos en el Centro de México, donde el metabolismo de GST fue menor a los controles. Un fenómeno que puede explicarse a través de la disrupción de las rutas de conjugación con glutatión (Olivares-Rubio *et al.*, 2013). En contraste, la actividad renal de GST presentó una respuesta concentración-dependiente de 0.006 a 0.6 mg  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{L}$  (Figura 4D). La respuesta observada concuerda con la catálisis hepática de GST de la carpa común expuesta por 10 y 20 días al  $\text{ClO}_2$ ,  $\text{NaClO}$  y al ácido paracético (Elia *et al.*, 2006) probablemente por la alta estereoselectividad de la GST para varios sustratos electrofílicos (Mannervik *et al.*, 1988).

Debido a sus funciones en la respuesta inmune y en la filtración, el riñón parece ser un tejido poco sensible a los efectos de los HM en condiciones controladas. Más estudios son requeridos para determinar si la presencia de los HM en los cuerpos de agua representa un riesgo significativo para la ictiofauna y otros organismos acuáticos.

## References

- ATSDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. 2016. In: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=708&tid=127>, last checked: August 21<sup>st</sup> 2016.
- Boryslawskyj, M., Garrod, A.C., Pearson, J.T. and Woodhead, D. 1988. Elevation of glutathione-S-transferase activity as a stress response to organochlorine compounds, in the freshwater mussel, *Sphaerium corneum*. *Marine Environmental Research* 24: 101-104. [https://www.researchgate.net/publication/248458824\\_Elevation\\_of\\_glutathione-S-transferase\\_activity\\_as\\_a\\_stress\\_response\\_to\\_organochlorine\\_compounds\\_in\\_the\\_freshwater\\_mussel\\_Sphaerium\\_corneum](https://www.researchgate.net/publication/248458824_Elevation_of_glutathione-S-transferase_activity_as_a_stress_response_to_organochlorine_compounds_in_the_freshwater_mussel_Sphaerium_corneum)
- Buege, J.A. and Aust, S.D. 1978;.Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52: 302-310. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687978520326>
- Cannady, E.A., Dyer, C.A., Christian, P.J., Sipes, G. and Hoyer, P.B. 2003. Expression and activity of cytochromes P450E1, 2A, and 2B in the mouse ovary: the effects of 4-vinylcyclohexane and its diepoxide metabolite. *Toxicological Sciences* 73: 423-430. <https://academic.oup.com/toxsci/article/73/2/423/1674370/Expression-and-Activity-of-Cytochromes-P450-2E1-2A>
- Davidson, A.J. and Zon, L.I. 2004. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene* 23: 7233-7246. <http://www.nature.com/onc/journal/v23/n43/full/1207943a.html>
- Dekant, W. and Vamvakas, S. 1993. Glutathione-dependent bioactivation of xenobiotics. *Xenobiotica* 23(8): 373-887.
- Doadrio, I. and Domínguez, O. 2004. Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31(2): 416-430. <http://europemc.org/abstract/med/15062784>

- Dzul-Caamal, R., Olivares-Rubio, H.F., López-Tapia, P. and Vega-López, A. 2013. Pro-oxidant and antioxidant response elicited by  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  and  $\text{BrCHCl}_2$  in *Goodea gracilis* using non-invasive methods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 165(4): 515-527. [https://www.researchgate.net/publication/236055030\\_Pro-oxidant\\_and\\_antioxidant\\_response\\_elicited\\_by\\_CH2Cl2\\_CHCl3\\_and\\_BrCHCl2\\_in\\_Goodea\\_gracilis\\_using\\_non-invasive\\_methods](https://www.researchgate.net/publication/236055030_Pro-oxidant_and_antioxidant_response_elicited_by_CH2Cl2_CHCl3_and_BrCHCl2_in_Goodea_gracilis_using_non-invasive_methods)
- Elia, A.C., Anastasi, V. and Dörr, A.J. 2006. Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid, for superficial water potabilization. *Chemosphere* 64(10): 1633-1641. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653506000853>
- Gregus, Z. 2008. Mechanims of toxicity. pp. 45-106 In: Klaassen CD, comp. Casarett & Doull's Toxicology. The Basicence of Poisons. 7th edition. New York: Mc-Graw Hill Professional. <https://www.amazon.com.mx/Casarett-DoullS-Toxicology-Klaassen/dp/0071769234>
- Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393(4): 561-564 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10002913>
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249(22): 7130-7139. <http://www.jbc.org/content/249/22/7130.long>
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. pp. 319-351. In: Storey KB, comp. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. New Jersey, Wiley-Liss, Inc. Hoboken <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-047141090X.html>
- Kleeberg, U. and Klinger, W. 1982. Sensitive formaldehyde determination with Nash's reagent and a 'tryptophan reaction'. *Journal of Pharmacological Methods* 8(1): 19-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7121014>
- Kleinow, K.M., Melancon, M.J. and Lech, J.J. 1987. Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environmental Health Perspectives* 71: 105-119. [https://www.jstor.org/stable/3430418?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/3430418?seq=1#page_scan_tab_contents)
- Lei, X.G., Evenson, J.K., Thompson, K.M. and Sunde, R.A. 1995. Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *The Journal of Nutrition* 125(6): 1438-1446. <http://jn.nutrition.org/content/125/6/1438.long>
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., and Shacter, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 233: 346-357. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687994330409>
- Linhart, K., Bartsch, H. and Seitz, H.K. 2014. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biology* 3, 56-62. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231714000998>
- Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101(1): 13-30. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X1000411X>
- Janeway CA Jr., and Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual review of Immunology* 20: 197-216. <http://annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C. and Wolff, S.P. 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26(10): 853-856. <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02536169?LI=true>
- Mannervik, B., Danielson, U.H. and Ketterer, B. 1988. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *Critical Reviews in Biochemistry* 23(3): 283-337. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10409238809088226?journalCode=ibmg19>
- Melnick, R.L., Kohn, M.C., Dunnick, J.K. and Leininger, J.R. 1998. Regenerative hyperplasia is not required for liver tumor induction in female B6C3F1 mice exposed to trihalomethanes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 148(1): 137-147. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X97983022>

- Misra, H.P. and Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* 247: 3170-3175. <http://www.jbc.org/content/247/10/3170.short>
- Olivares-Rubio, H.F., Martínez-Torres, M.L., Domínguez-López, M.L., García-Latorre, E. and Vega-López, A. 2013. Prooxidant and antioxidant responses in the liver and kidney of wild *Goodea gracilis* and their relation with halomethanes bioactivation. *Fish Physiology and Biochemistry* 39(6): 1603-1617. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-013-9812-8>
- Parkinson, A. and Ogilvie BW. 2008. Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Pp. 161-304. In: Klaassen CD, comp. 7th edition. New York: Mc-Graw Hill Professional. <http://opac1.lib.ubu.ac.th/medias/pdf/book1/contents/b23030.pdf>
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D. and Freeman, B.A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 22028-22034. <http://www.jbc.org/content/266/32/22028.short>
- Sapone, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Canistro, D., Broccoli, M., Pozzetti, L. et al. 2007. Perturbation of cytochrome P450, generation of oxidative stress and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed in situ to potable surface water. *Mutation Research* 626(1-2): 143-154. [https://www.researchgate.net/publication/6656552\\_Perturbation\\_of\\_cytochrome\\_P450\\_generation\\_of\\_oxidative\\_stress\\_and\\_induction\\_of\\_DNA\\_damage\\_in\\_Cyprinus\\_carpio\\_exposed\\_in\\_situ\\_to\\_potable\\_surface\\_water](https://www.researchgate.net/publication/6656552_Perturbation_of_cytochrome_P450_generation_of_oxidative_stress_and_induction_of_DNA_damage_in_Cyprinus_carpio_exposed_in_situ_to_potable_surface_water)
- Schnellmann, R.G. 2008. Toxic responses of the kidney. The Basic Science of Poisons. pp. 583-608. In: Klaassen CD, comp. Casarett & Doull's Toxicology. 7th edition. New York: Mc-Graw Hill Professional. <https://www.amazon.com.mx/Casarett-Doulls-Toxicology-Klaassen/dp/0071769234>
- Senem-Uyguner, C., Hellriegel, C., Otto, W. and Larive, C.K. 2004. Characterization of humic substances: implications for trihalomethane formation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378: 1579-1586. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-003-2451-7>
- Teuschler, L.K., Gennings, C., Stiteler, W.M., Hertberg, R.C., Colman, J.T., Thiyagarajah, A., et al. 2000. A multiple-purpose design approach to the evaluation of risks from mixtures of disinfection by-products. *Journal Drug and Chemical Toxicology* 23(1): 307-321. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DCT-100100117>
- Thomas, J.P., Maiorino, M., Ursini, F. and Girotti, A.W. 1990. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *The Journal of Biological Chemistry* 265(1): 454-461 <http://www.jbc.org/content/265/1/454.short>
- Uraga-Tovar, D.I., Domínguez-López, M.L., Madera-Sandoval, R.L., Nájera-Martínez, M., García-Latorre, E. and Vega-López, A. 2014. Generation of oxyradicals (O<sub>2</sub><sup>•</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), mitochondrial activity and induction of apoptosis of PBMC of *Cyprinus carpio carpio* treated in vivo with halomethanes and with recombinant HSP60 kDa and with LPS of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 36(5): 329-340. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/08923973.2014.947034>
- Vega-López, A., Jiménez-Orozco, F.A., Jiménez-Zamudio, L.A., García-Latorre, E. and Domínguez-López, M.L. 2009a. Phase I enzyme induction in *Girardinichthys viviparus*, an endangered goodeid fish, exposed to water from native localities enriched with polychlorinated biphenyls. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57(3): 561-570. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-009-9289-8>
- Vega-López, A., Jiménez-Orozco, F.A., Jiménez-Zamudio, L.A., García-Latorre, E. and Domínguez-López, M.L. 2009b. Prooxidant and antioxidant sex-linked response and its relationship to mixed oxidase function enzymes in liver of *Ameioba splendens*, an endangered goodeid fish exposed to PCBs. *Toxicological and Environmental Chemistry* 91(2): 315-330. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02772240802075329>
- Vega-López, A., Carrillo-Morales, C.I., Olivares-Rubio, H.F., Domínguez-López, M. and García-Latorre, E.A. 2012. Evidence of bioactivation of halomethanes and its relation to oxidative stress response in *Chirostoma riojai*, an endangered fish from a polluted lake in Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62(3): 479-493. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-011-9708-5>

Warholm, M., Alexandre, A-K., Höberg, J., Sigvardsson, K. and Rannung, A. 1994. Polymorphic distribution of glutathione transferase activity with methyl chloride in human blood. *Pharmacogenetics* 4: 307-311. [http://journals.lww.com/jpharmacogenetics/abstract/1994/12000/polymorphic\\_distribution\\_of\\_glutathione.3.aspx](http://journals.lww.com/jpharmacogenetics/abstract/1994/12000/polymorphic_distribution_of_glutathione.3.aspx)

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Olivares-Rubio, H.F; Vega López, A. (2017). Pro-oxidant and antioxidant response in the kidney of an endemic mexican fish (*Goodea gracilis*) exposed to CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub> and BrCHCl<sub>2</sub>. *Revista Bio Ciencias* 4(4), 20 pages, Article ID: 04.04.01. <http://editorial.uan.edu.mx/BIOCIENCIAS/article/view/ID%2004.04.04/285>

