

PROTEÍNA DE ESTRÉS DE 47 kDa EXPRESADA EN EL RIÑÓN DE ALEVINES DE *Colossoma macropomum* EXPUESTOS A CADMIO**STRESS PROTEIN OF 47 kDa EXPRESSED IN THE KIDNEY OF JUVENILES OF *Colossoma macropomum* EXPOSED TO CADMIUM**

RAQUEL SALAZAR-LUGO, MARIA CORDERO, YANET ANTÓN, AMERICA VARGAS, MAIRÍN LEMUS

*Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Postgrado de Biología Aplicada, Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad, Cumaná, Venezuela
E-mail: raquelugove@yahoo.com***RESUMEN**

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del cd, la temperatura de 35°C y la combinación de ambos (cd/35°C) sobre el perfil de proteínas en el riñón de alevines del pez dulce acuícola *Colossoma macropomum*; así como comparar los posibles cambios en el patrón de proteínas del tejido expuesto a estas condiciones. Un grupo de alevines se expuso por 21 días a 0,01 mg/L de Cd, y durante 8 días a 35°C de temperatura; otro grupo se expuso durante 8 días a Cd/35°C. Finalizada la exposición, los peces fueron sacrificados y disecados para obtener el riñón y realizar el perfil de proteínas. La fracción citoplasmática de las células renales se obtuvo por centrifugación diferencial y se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford; los perfiles de proteínas fueron obtenidos por electroforesis SDS-PAGE, reveladas y cuantificadas con el programa QuantityOne. Los resultados indicaron que la exposición a Cd indujo algunos cambios en el comportamiento de los alevines. En términos generales se evidenció disminución del apetito y los peces expuestos a 35°C y a Cd/35°C manifestaron cambios en la respuesta de huida y en forma particular se observaron hambrientos. El perfil electroforético reveló la inducción de una proteína de 47 kDa en los peces expuestos a Cd, mientras que el grupo expuesto a Cd/35°C presentó un aumento significativo en la concentración de proteínas totales. El Cd induce la expresión de una proteína de estrés de 47 kDa en el riñón de alevines de *C. macropomum*.

PALABRAS CLAVE: Toxicidad renal, metales pesados.**ABSTRACT**

The purpose of this study was to evaluate the effect of cadmium, a temperature of 35° C and both Cd and temperature (Cd/35°C), on the kidney protein profile of juveniles of the freshwater fish *Colossoma macropomum*; as well as to compare possible changes in the protein pattern of kidney exposed to these conditions. A group of fish was exposed for 21 days at 0.01 mg/L of Cd and for 8 days at 35°C; another group was exposed for 8 days to Cd/35°C. After exposure, the fishes were sacrificed and dissected to extract the kidney to determine the protein profile. Kidney cytoplasmic fraction was obtained by differential centrifugation and protein concentration was determined by the Bradford method; protein profiles were made by eletrophoresis SDS-PAGE, revealed and quantified using the QuantityOne program. Exposure to Cd induced changes in the behavior of *C. macropomum* juveniles. In general terms, a decreased of appetite was evident and fish exposed to 35° and Cd/35° C showed changes in the escape response and were observed hungry. Electrophoresis profile revealed the induction of 47 kDa protein in fish exposed to Cd, while the group of fish exposed to Cd/35°C showed a significant increase in total protein concentration. Cadmium induces the expression of 47 kDa stress protein in *C. macropomum* kidney.

KEY WORD: Renal toxicity, heavy metals.**INTRODUCCIÓN**

Los peces, al igual que otros organismos, responden a las altas temperaturas sintetizando proteínas de estrés conocidas como proteínas de choque térmico. Otros estresores ambientales como los metales pesados pueden inducir la expresión de estas proteínas (Abdel-Gawad y Khalil 2013). En los ríos venezolanos los metales pesados han sido reportados en cantidades moderadas en peces y otras especies (Salazar 2009). El estudio de los efectos adversos de la acumulación de metales en los peces, está bien documentado (Chowdhury y Wooda 2007). Los principales órganos donde se acumulan son el riñón e hígado; causando cambios importantes en los niveles de proteínas totales (Dautremepuits *et al.* 2009).

La cachama *Colossoma macropomun* (Characidae) es especialmente apetecida por su calidad alimentaria; la acuicultura de ésta se ha desarrollado notablemente en el país mediante la reproducción artificial o inducida, multiplicándose así su comercialización. Este pez es originario de la cuenca del Orinoco, desde donde se distribuyó a la Amazonia (Useche 2000). Estudios sobre las respuestas hematológicas e inmunológicas y bioquímicas de *C. macropomum* a la toxicidad inducida por Cd han sido documentados (Salazar-Lugo *et al.* 2013, Vargas *et al.* 2013). Así, las evaluaciones realizadas en las crías de esta especie en ambientes naturales indican que pueden tolerar concentraciones moderadas de Cd (Salazar-Lugo 2009). Estas observaciones sugieren la activación de sistemas proteicos para contrarrestar el estrés inducido

por la exposición al metal. Por otro lado, la evaluación del efecto de la temperatura sobre algunos tejidos de la cachama determinó que el tejido renal expuesto a la temperatura de 35°C, presentó lesiones severas (Rojas *et al.* 2013). Debido a que uno de los principales tejidos blanco del Cd, en el pez, es el riñón y que este órgano es sensible a temperaturas elevadas; en este trabajo se evaluó la capacidad de inducción de proteínas de estrés en el riñón de alevines de *C. macropomum* expuesto a Cd, a la temperatura de 35°C y a una combinación de estos dos factores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Se emplearon alevines de *C. macropomun*, que fueron provistos por la empresa Alma C.A. (ALMACA), ubicada en la localidad de Campo Mata, estado Anzoátegui. Los peces se trasladaron en bolsas plásticas con agua y oxígeno debidamente sellados hasta el Laboratorio de Proteínas e Inmunotoxicidad, Postgrado de Biología Aplicada, de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre.

Manejo y aclimatación de los peces

En el laboratorio, las bolsas con los peces fueron colocadas en tanques preparados con agua dechlorada y aireada para permitir su ambientación en un medio libre de microorganismos patógenos que pudieran afectar a los organismos. Con este propósito, al agua aireada se le agregó azitromocina (500 mg cada 15 litros) y cloranfenicol (75 mg cada 15 litros) en cada cambio de agua. Durante el tiempo de aclimatación, se realizaron recambios de agua dechlorada entre el 75 y el 80% del volumen total y los organismos fueron alimentados con una dieta correspondiente al 40% de su peso corporal dividida en dos raciones diarias. Finalizado el tiempo de aclimatación de 30 días, los peces fueron considerados aptos para someterse a bioensayos de toxicidad.

Bioensayo subletal

El ensayo subletal se realizó considerando una dosis subletal por debajo del 10% de la concentración letal media (38,47 mg/L de Cd) y que garantizó el 100% de viabilidad (Salazar-Lugo *et al.* 2013):

El protocolo experimental consideró un número total de 42 animales, divididos en los siguientes grupos: 10 peces grupo control; 12 peces expuestos a Cd/21 días;

10 peces expuestos a 35°C/8 días; 10 peces expuestos a Cd/35°C/8 días. Para los ensayos con Cd se empleó una concentración final de 0,01 mg/L que fue colocada en los acuarios correspondientes, y para mantener la temperatura se emplearon equipos calentadores termostatos digitales marca Elite de 150W. Diariamente, se mantuvo un registro de la temperatura del agua, utilizando un termómetro marca Hanna, igualmente se realizaron mediciones de pH del agua que se mantuvo entre 7,0-7,3 y la temperatura entre 29-30°C. Los peces se alimentaron siempre en la mañana. La iluminación artificial se redujo envolviendo los acuarios con bolsas negras para no alterar su comportamiento. Se llevó un registro cualitativo diario del comportamiento de los peces considerando los siguientes aspectos: desplazamiento, respuesta a estímulos externos y apetito.

Obtención de la muestras de tejido

Una vez cumplido el tiempo de exposición, los peces se sacrificaron y se procedió a realizar la disección para extraer el riñón. El tejido se mantuvo refrigerado a -20°C hasta su posterior procesamiento. A 1 g del tejido se agregó 2,5 mL de buffer de lisis (ditiotreitól 0,5 mol/L, ácido etilendiamino tetraacético 1,0 mol/L, hidroximetil aminometano 10,0 mol/L y 100,0 µL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y se procedió a su homogenización con un triturador eléctrico, manteniendo el tejido en un envase con hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas. El homogenizado se centrifugó a 300 g por 15 minutos a 4°C, se tomó el sobrenadante y este se centrifugó a 3.200 rpm por una hora a 4°C en una ultracentrífuga refrigerada marca Hermle Z 383. El sobrenadante resultante se tomó como la fracción citoplásmica.

Cuantificación de proteínas

Las proteínas citoplásmicas fueron cuantificadas mediante el método de Bradford (1976), utilizando como estándar albúmina bovina (10 mg/mL); el resultado se expresó en µg/mL de proteínas de tejido húmedo.

Separación de las proteínas por electroforesis SDS-PAGE

Las proteínas de la fracción citoplásmica se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) al 12% de acuerdo a Laemmli (1970). Se tomaron 20 µg/µL de proteínas para la electroforesis y los marcadores de alta masa molecular de BIO-RAD. Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a colorear el gel con azul brillante de comassie para visualizar las bandas.

La diferentes fracciones de las proteínas visualizadas, una vez reveladas con azul de comassie, en un sistema de documentación de geles “Gel doc XR” (BIO-RAD) y cuantificadas con el programa QuantityOne, que permitió determinar la masa molecular relativa.

RESULTADOS

El comportamiento de los peces fue afectado tanto por la exposición a Cd como por el incremento de la temperatura. Los peces expuestos a Cd se observaron con una disminución del apetito que se hizo más evidente la última semana de exposición (Tabla 1 A-B). A diferencia de esto, los peces expuestos a 35°C y a 35°C/Cd manifestaron cambios en la respuesta de huida y se

observaron hambrientos desde el primer día de exposición. (Tabla 2 A-B), disminuyendo su viabilidad a los 10 días de exposición por lo que se procedió a su análisis hasta los 7 días.

Perfil electroforético de proteínas

El perfil electroforético de las proteínas extraídas de la fracción soluble del riñón de *C. macropomun* revela que la banda de masa molecular aproximada de 50 ± 10 KD sufrió un incremento en el caso de los peces expuestos a Cd (Fig. 1). El análisis de la banda determinó que su incremento fue de 18% por encima de lo observado en el control; para los otros grupos evaluados, este incremento fue de 3,77% en los peces expuestos a Cd/35°C y 35°C.

Tabla 1. Biomarcadores externos observados en los peces en condiciones de laboratorio.

A. Comportamiento de los organismos controles:			
Tiempo (días)	Desplazamiento	Respuesta a estímulos externos	Apetito
7	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas	Reflejo de huida	Normal
15	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas	Movimiento de aletas Reflejo de huida	Normal
21	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas	Movimiento de aletas Reflejo de huida	Normal
B. Comportamiento de los organismos expuestos a cadmio:			
Tiempo (días)	Desplazamiento	Respuesta a estímulos externos	Apetito
7	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas	Reflejo de huida	Normal
15	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas	Movimiento de aletas Reflejo de huida	Normal
21	Nado en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Movimiento de aletas Reflejo de huida	Disminuido

Tabla 2. Biomarcadores externos observados en los peces en condiciones de laboratorio.

A. Comportamiento de los organismos expuestos a 35°C:			
Tiempo (días)	Desplazamiento	Respuesta a estímulos externos	Apetito
3	Nado rápido en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Movimiento de aletas Reflejo de huida	Hambrientos
8	Nado rápido en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Movimiento de aletas Reflejo de huida	Hambrientos
B. Comportamiento de los organismos expuestos a Cd y 35°C:			
Tiempo (días)	Desplazamiento	Respuesta a estímulos externos	Apetito
3	Nado rápido en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Movimiento de aletas Reflejo de huida	Hambrientos
8	Nado rápido en el fondo de la pecera de un extremo a otro y agrupados en las esquinas.	Movimiento de aletas Reflejo de huida	Hambrientos

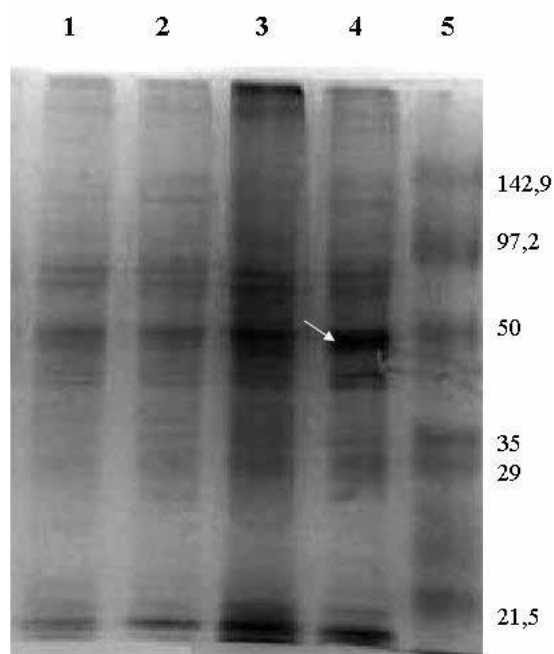


Figura 1. Patrón electroforético de proteínas de la fracción citoplasmática de riñón de alevines de *Colossoma macropomum*. Línea 1: T35°C. Línea 2: Cd/T35°C. Línea 3: Control. Línea 4: Peces expuestos a Cd. Línea 5: Marcador de masa molecular. Los números indican la masa molecular en kiloDalton (kDa).

DISCUSIÓN

La exposición subletal a Cd y a la temperatura de 35°C de alevines de *C. macropomum* afectó el comportamiento del pez siendo el rasgo más resaltante la disminución del apetito, aunque esto se observó la última semana de exposición (Tabla 1A-B). Este comportamiento se ha observado en otros peces expuestos a Cd y puede conducir a la muerte por inanición (McGeer *et al.* 2000, Eissa *et al.* 2010).

Al contrario, los grupos de peces expuestos a 35°C y a 35°C/Cd incrementaron el apetito durante el tiempo de exposición. La temperatura es un factor que afecta directamente el metabolismo de los animales, a medida que esta aumenta, también aumenta la tasa metabólica y la demanda energética, por lo cual, el organismo consume una mayor cantidad de alimento, provocando que la tasa de crecimiento también se vea incrementada (Martínez *et al.* 2009).

El perfil electroforético de las proteínas del riñón excretor de *C. macropomum* indican el incremento de una banda de aproximadamente 47 kDa en los peces expuestos a Cd, Cd/35°C y 35°C (Fig. 1), encontrándose mayormente expresada en el grupo expuesto a Cd, esta misma proteína se sobreexpresa en el riñón excretor.

El Cd ejerce una acción negativa sobre el metabolismo del colágeno. El colágeno constituye una familia de proteínas extracelulares que comienzan su montaje dentro del lumen del retículo endoplasmático y posteriormente son secretadas por la célula. Los colágenos de tipo I al V se unen a una proteína localizada en el retículo endoplasmático, es una chaperona molecular específica de 47 kDa, HSP47 (Hagiwara *et al.* 2007). La proteína de choque térmico 47, una glicoproteína de colágeno que desempeña un papel importante en el tratamiento y la secreción de procolágeno, asimismo están implicadas en el control de la apoptosis y migración celular (Vasques *et al.* 2010, Ishida y Nagata 2011). De ser esta proteína la que se encuentra incrementada en este pez expuesto a Cd podría explicar uno de los mecanismos implicados en el efecto del Cd en órganos como el riñón y el hígado.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la exposición de alevines de *C. macropomum* a Cd indujo cambios en el comportamiento de este organismo, y la expresión de una proteína de choque térmico de 47 kDa en el riñón.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-GAWAD FKH, KHALIL WK. 2013. Modulation of stress related protein genes in the bass (*Epinephelus guaza*) caught from the Gulf of Suez, the Red Sea, Egypt. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 96(1):175-181.
- BRADFORD M. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of proteins-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1):248-254.
- CHOWDHURY J, WOODA C. 2007. Renal function in the fresh water rainbow trout after dietary cadmium acclimation and water borne cadmium challenge. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145(3):321-332.
- DAUTREMEPUITS C, MARCOGLIESE D, GENDRON A, FOURNIER M. 2009. Gill and head kidney antioxidant processes and innate immune system responses of yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to different contaminants in the St. Lawrence River, Canada. *Sci. Total Environ.* 407(3):1055-1064.
- EISSA B, OSSANA N, FERRARI, SALIBIAN A. 2010. Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58(4):1032-1039.

- HAGIWARA S, IWASAKA H, MATSUMOTO S, Y NOGUCHI T. 2007. Introduction of antisense oligonucleotides to heat shock protein 47 prevents pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced pneumopathy of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 564(1-3):174-180.
- ISHIDA Y, NAGATA K. 2011. Hsp47 as a collagen-specific molecular chaperone. *Method. Enzymol.* 499(1):167-182.
- MARTÍNEZ M, MARTÍNEZ L, RAMOS R. 2009. Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. *Rev. Elect. Vet.* 10(10):1-16.
- MCGEER J, Szebiedzky C, McDONALD D, WOOD C. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat. Toxicol.* 50(3):231-243.
- LAEMMLI U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.
- ROJAS LM, MATA C, OLIVEROS A, SALAZAR-LUGO R. 2013. Histología de branquias, hígado y riñón de juveniles del pez neotropical *Colossoma macropomum* (Characiformes, Characidae) expuesto a tres temperaturas. *Rev. Biol. Trop.* 61(2):797-806.
- SALAZAR-LUGO R. 2009. Estado de conocimiento de las concentraciones de cadmio, mercurio y plomo en organismos acuáticos de Venezuela. *Rev. Elect. Vet.* 10(11):1-15.
- SALAZAR-LUGO R, VARGAS A, ROJAS L, LEMUS M. 2013. Histopathological changes in the head kidney induced by cadmium in a neotropical fish *Colossoma macropomum*. *Open Vet. J.* 3(2):145-150.
- USECHE M. 2000. El cultivo de la cachama, manejo y producción. Disponible en línea en: <http://www.unet.edu.ve/frey/varios/dinv/piscicultura/cachama> (Acceso 16.07.2010).
- VASQUES M, ALVES M, DE CERQUEIRA L, CORREA L. 2010. Immunolocalization of heat shock proteins 27 and 47 during repair of induced oral ulcers. *J. Oral Scie.* 52(4):623-631.
- VARGAS A, BLANCO Y, SALAZAR-LUGO R. 2012. Efecto del cobre y del cadmio sobre la respuesta inmune innata del pez *Colossoma macropomum*. *Rev. Toxicol.* 29(1):10-14.