

LOS CITOCROMOS P-450. DISTRIBUCIÓN TISULAR E INDUCCION XENOBIÓTICA DE CYP1A EN LA BIOTA ACUÁTICA

Carmen Sarasquete (*) y Helmut Segner (**)

(*) Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía. CSIC. Polígono Rio San Pedro. Apdo. oficial. 11510. Puerto Real. Cádiz (España)

(**) Laboratory of Cell Toxicology. Department of Environmental Chemistry & Ecology. Center for Environmental Research. Permoser Str. 15 D-04318. Leipzig. Alemania.

INTRODUCCION

Los problemas de contaminación/polución causados por el aumento de la incorporación de sustancias químicas en el medio-ambiente/biota han recibido gran atención durante las dos últimas décadas, debido a su gran impacto ecológico y al daño potencial que diferentes tóxicos producen en la biota y, en consecuencia, en la salud de los consumidores. Los avances socio-económicos en determinadas zonas (desarrollo industrial y agrícola, transportes e industrias navales, efluentes y residuos urbanos e industriales, etc.) pueden ir acompañados de un incremento de contaminación medio-ambiental (hidrocarburos, organoclorados, pesticidas, tensioactivos, metales pesados, etc.).

Para determinar el riesgo potencial que los contaminantes inorgánicos y orgánicos ejercen en la biota, se han realizado numerosos ensayos de toxicidad utilizando, inicialmente, organismos vivos como sistemas modelo. Durante los últimos años, sin embargo, para valorar la toxicidad de los compuestos químicos, se realizan además ensayos de citotoxicidad con líneas celulares y/o cultivos celulares de mamíferos y peces. A pesar de sus considerables ventajas (sensibilidad, pequeñas muestras, condiciones controladas, problemas éticos, etc.), el uso de ensayos de toxicidad "in vitro" presenta el inconveniente de que muchos de los procesos fisiológicos que se manifiestan en la naturaleza y/o en los ensayos de toxicidad *in vivo* no

son reproducidos en los experimentos *in vitro*, siendo conveniente, por tanto, establecer correlaciones *in vivo/in vitro* (Segner et al., 1997 y 1998).

Para la identificación y diagnosis de los efectos subletales de diferentes compuestos químicos, como "biomarcadores de alarma", inicialmente, fueron propuestas las variaciones de diferentes parámetros histofisiológicos y bioquímicos. Actualmente, y desde hace varios años, entre otros "biomarcadores ecotoxicológicos" se utilizan "metalotioneinas" para metales pesados y el complejo enzimático "Citocromo P450s (CYP)" para compuestos orgánicos lipofílicos (en Blasco, 1998; en Segner et al., 1998). El complejo enzimático P-450, particularmente la isoenzima -CYP1A- es ampliamente utilizada en un gran número de programas de biomonitorización ambiental, tales como Master North Sea Task Force Monitoring Master Plan, the National Status y Trends Program (EEUU); German Wadden Sea, North American Puget Sound y en programas de vigilancia biológica del Mediterráneo (Segner et al., 1998).

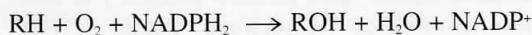
La respuesta de inducción del sistema citocromo P450s (CYP1A) monooxigenasas en peces, es bastante específica para diferentes contaminantes orgánicos (aceites, hidrocarburos poliaromáticos, organoclorados, pesticidas, etc.) y, en consecuencia, su cuantificación (inmunoensayo enzimático) o la medida de diferentes actividades enzimáticas como 7-etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD) o aril hidrocarburo hidrolasa (AHH) catalizadas por el complejo CYP1A, han sido consideradas como excelentes biomarcadores ecotoxicológicos, ya que permiten determinar la presencia, biodisponibilidad y los efectos de diferentes compuestos orgánicos extraños a los organismos -compuestos xenobióticos-, en numerosos ambientes acuáticos.

Por otro lado, los estudios sobre distribución celular e inducción xenobiótica de citocromo P-450s (CYP1A) en peces, usando técnicas inmunohistoquímicas, constituyen un excelente com-

plemento para los marcadores biotxicológicos, ya que permiten obtener una información detallada de cuales son los principales órganos/tejidos/células diana para diferentes compuestos xenobióticos (incorporación/desintoxicación y/o bioactivación).

CITOCROMOS P-450

Los citocromos P450s comprenden una gran superfamilia de hemoproteínas. Su nombre -P450- se debe a que estas enzimas, cuando se reducen y se unen al monóxido de carbono, presentan un máximo de absorción a 450 nm (Pigmento 450). Estas enzimas catalizan, en presencia de oxígeno molecular, diferentes reacciones oxidativas como hidroxilaciones, epoxidaciones o dealquilaciones. El mecanismo básico de la oxigenación del sustrato es idéntico para todas las isoenzimas de la superfamilia CYP:



El sustrato lipofílico RH es convertido en un producto -ROH- más polar y soluble en agua después de la incorporación de un átomo de oxígeno del oxígeno molecular. Esta reacción constituye un proceso clave en la biotransformación de los compuestos xenobióticos lipofílicos; ya que permite provocar la desintoxicación de determinados compuestos orgánicos, debido a que su conversión en productos más polares facilita su excreción, produciendo una disminución de la carga tóxica corporal. Sin embargo, esta reacción puede producir también una "bioactivación", es decir, la formación de intermediarios reactivos capaces de interactuar con macromoléculas celulares vitales, tales como el DNA, produciendo efectos mutagénicos y carcinógenos (en Segner et al., 1998).

Una función característica de los citocromos P450s es su amplio rango para sustratos específicos (funciones oxidasas mezcladas -MFOs-). Entre sus sustratos endógenos se encuentran: testosterona, estradiol, prostaglandinas, ácido araquidónico, etc., los sustratos exógenos incluyen: bifenilos, dioxinas, etanol, ptalatos, etc. Intracelularmente, los citocromos P450s están localizados en el retículo endoplásmico (microsomal), principalmente, y en las mitocondrias, en asociación con diferentes enzimas, especialmente con el enzima flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa, que suministra electrones a la reacción catalizada por los

citocromos P-450 (en Mesnil et al., 1984; Braunbeck et al., 1995; en Segner et al., 1998).

Entre las diferentes familias del sistema P450, es la subfamilia CYP1A la que está particularmente implicada en el metabolismo de los productos químicos (dioxinas, PCBs, PAHs, pesticidas, etc.) incorporados al medio ambiente/biota. En mamíferos, la subfamilia CYP1A incluye dos isoenzimas: CYP1A1 y CYP1A2, sin embargo en peces teleosteos y hasta la fecha, sólo ha sido demostrada una isoenzima -CYP1A- (revisado por Segner et al., 1998). Estudios recientes han demostrado la existencia de dos genes diferentes de CYP1A en peces (Gooneratne et al., 1997), sin embargo su significado fisiológico es desconocido. En peces, como se describirá posteriormente, los órganos que muestran mayores concentraciones de CYP1A, son hígado, corazón, branquias, riñón, etc. y especialmente el sistema vascular (Stegeman et al., 1991; Husoy et al., 1994; Van Veld et al., 1997; Guiney et al., 1997; Reinecke & Segner, 1998; Sarasquete et al., 1999; Sarasquete & Segner, 1999).

CUANTIFICACIÓN ANALÍTICA DE CYP1A

Todas las reacciones moleculares intermedias que se producen durante la inducción de CYP1A, RNAm, proteína y actividad catalítica, pueden ser usadas como medidas adecuadas para detectar la inducción de CYP1A en peces. Los niveles de RNAm pueden ser medidos usando cDNA en *Northern Blot*, y los niveles de proteínas pueden ser cuantificados por medio de inmunoensayos enzimáticos (*Western Blot* o ELISA). Finalmente, la actividad catalítica puede ser medida por espectrofotometría u observación fluorométrica de la conversión de sustratos CYP1A. Frecuentemente, la actividad catalítica CYP1A es medida como actividad etoxiresorufin-O-detilasa (EROD), es decir, la dealquilación del 7-etoxiresorufin -no fluorescente a resorufin- fluorescente. Convencionalmente, este ensayo se realiza con microsomas preparados por ultracentrifugación de homogeneizados de tejidos (Burke & Mayer, 1974). Recientemente, se ha establecido una nueva metodología basada en el uso de discos giratorios fluorescentes; este método es igual de sensible y preciso que el anterior, pero es más rápido y eficiente (Kennedy et al., 1995; Behrens et al., 1998).

Las curvas dosis-respuesta de la actividad EROD inducida por xenobióticos pueden ser de

forma acampanada. Se ha sugerido que el descenso de la actividad EROD producida por las concentraciones más elevadas de los tóxicos, podría estar relacionada con un efecto tóxico del inductor. Sin embargo, existen evidencias de que los xenobióticos pueden reducir los niveles de EROD, actuando como inhibidores competitivos de la actividad catalítica CYP1A (Segner et al., 1998).

INDUCCIÓN XENOBIÓTICA DE CYP1A

Un rasgo característico de la CYP1A es su inducción, esto es la síntesis *de novo*, después de la exposición de los peces a diferentes compuestos xenobióticos. La inducción de CYP1A es un proceso mediado por receptores, mediante el cual un producto químico estimula el grado de transcripción de genes, produciendo un incremento de los niveles del RNAm de CYP1A, nueva síntesis de proteínas CYP1A y, en consecuencia, un incremento de la actividad catalítica CYP1A.

Los hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs), tales como 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) como el 3-metilcolantreno (MC), se unen reversiblemente a un receptor citosólico, el llamado receptor Ah (Arihidrocarburo). Después de la unión del ligando al receptor de la proteína, una unidad de la "heat shock protein 90" se disocia, y el complejo ligando-receptor sufre un proceso de transformación en un heterodímero; constituido por la subunidad del receptor Ah unido al ligando, y por la proteína nuclear translocadora del receptor Ah (Ah: receptor nuclear translocator, ARNT). El dímero es translocado en el núcleo donde interactúa con elementos específicos del DNA, responsables del aumento de respuesta al receptor del Ah (Ah: receptor-responsive enhancer elements, AHRE); estos elementos se localizan en la región que precede al gen CYP1A regulando su expresión. La unión a los AHRE produce un incremento de la transcripción, a continuación de transcripción y, finalmente, un incremento de la actividad catalítica CYP1A. Los ligandos para el receptor Ah son hidrofóbicos, moléculas planas que se adaptan al sitio de unión del receptor rectangular de aproximadamente 3×10 Angstrom. El ligando prototipo para el receptor Ah es el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD) que es uno de los inductores más potentes de CYP1A (en Segner et al., 1998).

La existencia del receptor Ah ha sido demostrada en diferentes especies de peces. El tamaño del receptor de la proteína varía de 116 kDa en *Fundulus heteroclitus* a 145 kDa en la trucha, lo que sugiere una gran heterogeneidad en la estructura de esta proteína (Stegeman & Hahn, 1994). Estas diferencias podrían determinar la susceptibilidad de las especies frente a inductores de CYP1A.

CYP1A Y BIOMONITORIZACIÓN AMBIENTAL

La inducción xenobiótica de CYP1A en peces sirvió de base para considerar que estas respuestas bioquímicas podían ser usadas como biomarcadores ecotoxicológicos en programas de monitorización ambiental (Payne, 1976). Hoy en día, el medio ambiente está cargado con más de 70.000 productos químicos diferentes, para los cuales sólo se dispone de una limitada capacidad analítica. La relación entre niveles de contaminantes y sus efectos biológicos sólo se conoce en un limitado número de casos. La inducción xenobiótica de enzimas de biotransformación, debe dar una señal integrada de la concentración de contaminantes, su biodisponibilidad, mezcla de efectos y las respuestas de defensa de los organismos (Goksoyr & Förlin, 1992).

En base a un gran número de estudios de campo realizados en los últimos 15 años, se ha demostrado, claramente, que la CYP1A está, a menudo, elevada en peces procedentes de aguas contaminadas con xenobióticos inductores de isoenzimas catalizadas por CYPs. En algunos casos, en peces, la actividad EROD o los niveles de proteínas CYP1A pueden estar directamente correlacionados con la distribución medio-ambiental y con los gradientes de los productos químicos inductores de CYP1A, tales como PAHs o PCBs. Sin embargo, se ha señalado que en el medio ambiente natural no se puede esperar siempre una relación dosis-respuesta lineal y directa, entre la concentración de ciertos compuestos químicos y el contenido/actividad de CYP1A (Pluta, 1993). La relación directa debe realizarse a través de la respuesta integrada de biomarcadores, con las complejas mezclas de xenobióticos inductores y no inductores de CYP1A, ya que ambos tipos de contaminantes pueden estar presentes en el medio ambiente. Algunos contaminantes, por ejemplo PAHs, puede ser metabolizados y, por tanto, las correlaciones directas no son posibles. Además,

algunos xenobióticos inductores e inhibidores de CYP1A, tales como los "trioorganotin compounds" pueden ejercer simultáneamente sus efectos en el sistema enzimático CYP1A. Finalmente, otros factores, como temperatura, estación, hormonas sexuales, etc. modulan la sensibilidad del sistema CYP1A en peces (Stegeman & Hahn, 1994). Por tanto, se requiere una gran precaución a la hora de interpretar los resultados obtenidos con biomarcadores aislados.

Teniendo en cuenta el estado actual de los conocimientos, los investigadores intentan valorar la inducción de CYP1A desde el punto de vista proteico y catalítico, frecuentemente incluso a nivel de RNAm. De esta forma, en caso de que la actividad EROD sea inhibida, la inducción de CYP1A puede incluso ser detectada por medio de técnicas inmunocitoquímicas o *Northern Blotting* (Goksoyr & Forlin, 1992; Bucheli & Fent, 1995).

En resumen, para facilitar la correcta interpretación de las respuestas biológicas, frecuentemente, la CYP1A es analizada en unión con biomarcadores adicionales, por ejemplo, histopatología e inmunohistoquímica, *heat shock proteins*, etc.

METABOLISMO DE SUBSTRATOS ENDÓGENOS Y DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS: P450 (CYP1A), EROD Y AHH

En Vertebrados, es ampliamente conocido que el sistema enzimático "Citocromo P-450s" participa en el metabolismo de substratos endógenos (esteroidogénesis en tejidos adrenal y gonadal, metabolismo de la vitamina D3 en riñón e hígado, formación de bilis en el hígado, metabolismo y síntesis de ácidos biliares, etc.), así como en la desintoxicación y/o bioactivación de diferentes compuestos orgánicos extraños a los organismos—compuestos xenobióticos—, tales como dioxinas, bifenilos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc, siendo el hígado el principal órgano diana implicado en el proceso la desintoxicación y/o bioactivación xenobiótica.

Mientras, en la actualidad, sólo se ha descrito una isoenzima CYP1A en peces (revisado por Segner et al., 1998), en la Tabla 1 se muestra la diversidad de las isoenzimas P450 (CYP) que pueden participar en el metabolismo endógeno y exógeno en mamíferos.

Una cuestión importante es establecer la relación entre el complejo sistema P-450 monooxige-

nasas que intervienen en el metabolismo de substratos endógenos y/o en el metabolismo de xenobióticos. En los tejidos endocrinos, las monooxigenasas dependientes de los citocromos P-450 se localizan, fundamentalmente, en las mitocondrias, aunque también están asociadas al retículo endoplásmico (microsomias). Estos sistemas enzimáticos están implicados en la biosíntesis de hormonas esteroideas. En los sistemas endocrinos, esta función biosintética difiere de las funciones en las que participa el complejo enzimático P-450 del retículo endoplásmico (microsomias) del hígado, donde las monooxigenasas dependientes de P-450 convierten sustancias insolubles en agua, como hormonas esteroideas, colesterol, etc. y compuestos extraños (pesticidas, drogas, etc) en compuestos más polares facilitando su excreción. Aunque hay diferencias en las funciones fisiológicas y en el sistema de transporte de electrones entre los sistemas P-450 mitocondrial y microsómico del hígado, el mecanismo básico por el cual el sistema P-450 activa el oxígeno parece similar (Cooper et al., 1973).

En mamíferos, las P-450s presentes en el retículo endoplásmico (microsomias) participan en el metabolismo de compuestos xenobióticos y en la síntesis y metabolismo de substratos endógenos (ácidos biliares, aromatización e hidroxilación hormonal, etc.) (en Mesnil et al., 1984). En 1987, Yan & Lu señalaron que las enzimas CYP mitocondriales eran altamente específicas para los substratos endógenos, mientras que las enzimas P450 que metabolizaban compuestos xenobióticos se restringían a la fracción microsomal. Sin embargo, en el cerebro de mamíferos y peces, las enzimas P450s que metabolizan compuestos xenobióticos no se localizan sólo en la fracción microsomal (retículo endoplásmico), ya que una fracción importante también está presente en las mitocondrias (Walther et al. 1987; Ghersi-Egea et al., 1988; Iscan et al., 1990; Andersson & Goksoyr, 1994). Así, Iscan et al. (1990) en cerebro de mamíferos señalaron que las enzimas CYPs mitocondriales eran más abundantes que las microsómicas. Además, las isoenzimas que metabolizaban benzopireno (AHH) se localizaban tanto en la fracción mitocondrial como en la microsomal, especialmente en el bulbo olfativo, mientras que las relacionadas con EROD no presentaban diferenciación regional y no se detectaban en la fracción microsomal. Por otro lado, en la fracción mitocondrial y microsomal del cerebro de trucha,

la actividad EROD y los niveles de CYP1A eran inducidos por β -naftoflavona (Andersson & Goksoyr, 1994).

Como ya se ha señalado, en mamíferos las actividades enzimáticas, tales como EROD (etoxiresorufin-O-deetilasa) y AHH (benzopireno-arilhidrocarburo hidrolasa), son catalizadas por el sistema P-450s. Ambas participan en la oxidación de sustratos aromáticos, especialmente PAHs, y por tanto en la desintoxicación y/o biotransformación de diferentes xenobióticos inductores de CYP-monooxigenasas. Mientras la naftoflavona y el metilcolantreno parecen ser xenobióticos preferentemente inductores de la EROD, el benzopireno parece ser un mayor inductor de AHH. Por otro lado, se ha señalado que en mamíferos la AHH cerebral muestra mayor afinidad hacia determinados compuestos aromáticos como benzopireno que la AHH hepática. Mientras en el hígado es más abundante la AHH microsomal, en el cerebro lo es la mitocondrial. Esta mayor o menor afinidad enzimática por un determinado sustrato, dependiendo del órgano/organela, sugiere la existencia de diferencias en la naturaleza de los citocromos P-450 implicados en dicha catálisis enzimática. Mientras en el cerebro de vertebrados, la actividad AHH mitocondrial (NADH y NADPH) es inducida por metilcolantreno y benzopireno, la AHH microsomal del cerebro no es inducida por estos compuestos orgánicos. Compuestos como el fenobarbital inducen la AHH microsómica del hígado, pero no la correspondiente del cerebro. En vertebrados, las diferencias en los citocromos P-450 (microsomal y mitocondrial) en cerebro e hígado, podrían seguir un patrón similar al de la actividad AHH (en Mesnil et al., 1984).

Según Iscan et al. (1990) en el cerebro de mamíferos, bien los citocromos P-450 mitocondriales que metabolizan sustratos dependientes de AHH, son más selectivos que las formas microsómicas, o bien los sustratos (AHH y EROD) son metabolizados por diferentes formas de CYPs, estando la isoenzima que utiliza EROD como sustrato ausente en la fracción mitocondrial del cerebro.

La actividad AHH observada en branquias y riñón de diferentes especies de peces, obviamente, refleja la inducción de proteínas CYP1A en esos órganos (Payne, 1976). En diferentes especies de peces procedentes de áreas contaminadas (PAHs, PCBs, etc.), Stegeman et al., (1979) pusieron de manifiesto que la inducción de la actividad EROD,

por benzopireno, era mayor en microsomas hepáticos que en microsomas del cerebro, observando también (Stegeman et al., 1985, 1989) una inducción de la P4501A total y de actividades EROD y AHH en órganos extrahepáticos de peces procedentes de áreas contaminadas, como por ejemplo, en microsomas de corazón de peces tratados con β -naftoflavona.

DISTRIBUCIÓN TISULAR DE CYP1A E INDUCCIÓN XENOBIÓTICA EN PECES

Conocer la distribución tisular basal y la inducción de CYP1A en diferentes tejidos es de especial interés ya que, por ejemplo, la presencia y/o metabolismo de compuestos xenobióticos en tejidos extrahepáticos, probablemente, está implicado en los efectos sistémicos que las sustancias tóxicas inductoras de CYP1A producen (Stegeman y Hahn, 1994). Recientemente, Van Veld et al. (1997) señalan una diferente ruta de expresión celular de CYP1A después de la exposición de los peces a determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos como benzopireno (BP), directamente a través del agua o por vía trófica, ya que detectaron una mayor inducción de CYP1A a nivel de branquias, hígado y sistema vascular en el primer caso y una, casi exclusiva, inmunoreacción a nivel intestinal, cuando la exposición al contaminante era por vía trófica.

Por tanto, el método inmunohistoquímico parece adecuado para conocer, no sólo, las células/tejidos/órganos diana en las que este complejo enzimático –citocromos P4501A– es constitutivo y/o inducido, sino también porque permite dar una señal integrada sobre la ruta de exposición y la vía de incorporación/eliminación de diferentes compuestos xenobióticos. Sin embargo, es necesario señalar que a pesar de las ventajas de los métodos inmunohistológicos, como complemento de otros biomarcadores toxicológicos, la correlación entre la detección analítica de CYP1A por *Western Blot*, ELISA, etc. y su distribución tisular en diferentes tejidos debe ser valorada con precaución. Así por ejemplo, es ampliamente conocido que en los peces los niveles de glucógeno y lípidos en el hígado varían dependiendo del estado nutricional, reproducción, etc. Además, es necesario tener en cuenta que los lípidos neutros presentes, por ejemplo, en el hígado son disueltos durante el procesamiento histológico (en Sarasquete et al., 1997). En

este caso, la distribución tisular de CYP1A puede presentarse de forma difusa y/o disminuida la semicuantificación inmunocitoquímica como señalaron Van Veld et al. (1997), en los tejidos con alto contenido lipídico. Este hecho es de gran interés, sobre todo, teniendo en cuenta la afinidad de diferentes compuestos xenobióticos inductores de CYP1A por los substratos lipofílicos (hígado, gonada, saco vitelino, etc). Creemos que el uso paralelo de secciones de tejidos procesados directamente en el criostato (conservación de lípidos), podría ayudar a explicar la existencia de posibles correlaciones negativas, que puedan establecerse, entre la cuantificación analítica de CYP1A y su localización tisular por métodos inmunohistoquímicos.

En las Figuras 1 a 6 se muestra la distribución de CYP1A en diferentes órganos y tejidos (cerebro, hígado, tracto digestivo, etc.) de larvas y adultos de dorada, *Sparus aurata*; robalo, *Dicentrarchus labrax* y *Fundulus heteroclitus* control y/o tratados con lindano (γ hexaclorociclohexano $-\gamma$ HCH-).

DESARROLLO LARVARIO

De forma general es admitido que los peces en los estadios iniciales de su desarrollo son más sensibles a los efectos tóxicos de los compuestos xenobióticos lipofílicos que los juveniles o adultos. A esta sensibilidad podría contribuir la biotransformación de dichos compuestos. Por otra parte, se ha sugerido que el alto contenido lipídico del saco vitelino y de la gota de grasa de embriones y larvas de peces, podría favorecer la bioacumulación de los contaminantes orgánicos lipofílicos (Reinecke & Segner, 1998) durante la fase lecitotropa del desarrollo larvario.

Los primeros estudios ontogénicos sobre la inducción de P450s fueron realizados en salmónidos y *Fundulus heteroclitus* (Binder & Stegeman, 1980; 1983). En estas investigaciones se puso de manifiesto que la CYP1A está presente, constitutivamente, y puede ser inducida durante los estadios iniciales de la vida larvaria, incluso durante la embriogénesis. En estudios posteriores basados en la relación dosis-respuesta, se señala un incremento de la sensibilidad después de la eclosión (Peters & Livingstone, 1995; Peters et al., 1996). Antes de la eclosión, la actividad AHH era débil en *Fundulus heteroclitus* y aumenta considerablemente des-

pués de la eclosión. Según Binder et al. (1985), el incremento de la actividad AHH depende más de la eclosión que de la edad o estado de desarrollo larvario y este aumento de AHH no se relaciona con la presencia de inhibidores en estadios anteriores a la eclosión. Según estos autores, la actividad AHH microsomal era inducida por PCBs en embriones de *Fundulus* y los estadios de desarrollo larvario, antes de la aparición de un hígado rudimentario, eran capaces de responder a estos inductores.

La localización tisular de CYP1A ha sido investigada en embriones de salmónidos (Lauren et al., 1990) y recientemente en peces marinos (Reinecke & Segner, 1998), observándose un patrón de distribución tisular de CYP1A similar en larvas y adultos. Así, en el hígado del rodaballo, *Scophthalmus maximus*, Reinecke & Segner (1998) detectaron inmunoreactividad, frente al antisuero anti-CYP1A, en el citoplasma de los hepatocitos de las larvas, si bien la intensidad de reacción era menor que en el hígado de ejemplares adultos, observando además una fuerte inmunoreacción en los endotelios del sistema vascular, así como una localización extrahepática de CYP1A en las células musculares cardíacas, células endoteliales del corazón, segmento proximal y capilares del glomérulo renal, etc. Nosotros (Figuras 1 a 5) en larvas de *Sparus aurata* observamos una distribución similar de CYP1A, detectando una inducción por γ HCH a nivel de los endotelios del sistema vascular, hígado, saco, tracto digestivo tracto digestivo (citoplasma, vacuolas supranucleares y borde estriado), así como en bulbo olfatorio, cavidad buco-faríngea y epitelio branquial. En larvas de dorada control y contaminadas con lindano (γ HCH) destaca una mas o menos similar e intensa inmunoreactividad frente al anticuerpo anti CYP1A en la epidermis, áreas dispersas del cerebro en desarrollo y retina (Fig. 1 a 5). En larvas de rodaballo, *Scophthalmus maximus* de 7 días, tratadas durante 48 horas con lindano (1ppb) se produce una inducción de la actividad EROD (de 0.41 a 2.29 pmol/min/mg proteína) (Peters & Livingstone, 1995), siendo el lindano un inductor de los citocromos P4501A en mamíferos (en Peters & Livingstone, 1995).

Obviamente, en los peces existen grandes diferencias en la arquitectura tisular /orgánica de larvas y adultos. Así por ejemplo, durante las fases iniciales de su desarrollo, las larvas presentan laminillas secundarias pero no filamentos bran-

quiales, observándose inmunoreactividad, frente al anticuerpo anti-CYP1A, en las células endoteliales de los capilares sanguíneos de los filamentos. Del mismo modo, y a pesar de que la organización de la musculatura no es homóloga en larvas y adultos, Reinecke & Segner (1998) observaron inmunoreacción en las células endoteliales del tejido muscular, así como en el sistema vascular del cerebro, en receptores neuronales y en el epitelio pigmentario de la retina. Según Peters et al. (1996), la diferenciación de la expresión específica de CYP1A se realiza en las fases iniciales de la ontogenia y las variaciones posteriores parecen ser, fundamentalmente, de tipo cuantitativo, presentando una distribución similar de CYP1A en las larvas y los adultos (Reinecke & Segner, 1998).

El endotelio del sistema vascular está implicado en una gran número de funciones reguladoras, tales como el control del volumen sanguíneo, la síntesis de reguladores vasoactivos –metabolitos del ácido araquidónico o prostaglandinas–, etc. Al mismo tiempo, las células endoteliales participan en el transporte de compuestos químicos de la sangre a las células y tejidos. Debido a sus, relativamente, altos niveles de CYP1A, las células endoteliales pueden activar los compuestos xenobióticos durante su paso por la sangre o transferirlos a los tejidos, lo que podría afectar negativamente, tanto al propio endotelio vascular como a las células/tejidos subyacentes (Henry et al., 1997). Es interesante señalar que las células endoteliales de los embriones y larvas de peces muestran, comparativamente, una fuerte inmunoreactividad CYP1A (Lauren et al., 1990; Reinecke & Segner, 1998; Sarasquete et al., 1999); esto podría explicar la presencia de severas patologías de vascularización y el desarrollo de edemas en embriones y larvas expuestos a compuestos xenobióticos inductores de CYP1A (Guiney et al., 1997; Henry et al., 1997). En diferentes especies de peces de agua dulce y marinos, el sistema vascular ha sido reconocido como el principal tejido diana para diferentes hidrocarburos (HAHs) en estadios iniciales del desarrollo y en adultos; este hecho parece estar relacionado con el aumento de la expresión de CYP1A en los endotelios (Reinecke & Segner, 1998; Guiney et al., 1997).

En estudios recientes realizados por diferentes autores en larvas de peces marinos (Segner et al., 1994; Sarasquete et al., 1997 entre otros) se señala que durante la ontogenia del tracto digestivo y glándulas anexas (eclosión-metamorfosis), las estructuras y funciones metabólicas y endocrinas pueden

pasar por dos momentos clave: bien la estructura y función se diferencian al iniciarse la alimentación exógena (por ejemplo hígado), experimentando posteriormente alteraciones cuantitativas principalmente, o bien la estructura y función están ausentes al iniciarse la vida larvaria (por ejemplo glándulas gástricas) y sólo se diferencian durante la metamorfosis. En el rodaballo, la ontogenia de la CYP1A parece seguir un patrón similar (Reinecke & Segner, 1998; Sarasquete & Segner 1999).

En resumen, la distribución tisular de CYP1A es similar en larvas y adultos y el endotelio del sistema vascular es particularmente sensible a la acción tóxica de los compuestos xenobióticos inductores de CYP1A.

DISTRIBUCIÓN E INDUCCIÓN XENOBIÓTICA HEPÁTICA Y EXTRAHEPÁTICA DE CYP1A

En diferentes especies de peces, la CYP1A se localiza especialmente en el hígado (endotelios del sistema vascular y hepatocitos), endotelios del sistema vascular del corazón, endotelios renales, etc. Es asumido que tanto en los vertebrados superiores como en los inferiores –peces–, el hígado es el primer órgano en iniciar la expresión de CYP1A, aunque también se ha demostrado una inducción xenobiótica extrahepática en diferentes tejidos, entre los que se incluye epitelio branquial, endotelio del corazón, mucosa del digestivo, epitelio olfatorio, túbulos renales, endotelio branquial, endotelio cerebral, etc. (Miller et al., 1988; Stegeman et al., 1989, 1991; Andersson y Goksoyr, 1994; Husoy et al., 1994; Monod et al., 1994; Van Veld et al., 1997; Segner et al., 1998 entre otros).

En peces procedentes de áreas no contaminadas, Stegeman et al. (1991) observaron una inmunoreactividad, frente al anticuerpo anti-CYP1A, en los endotelios del sistema vascular del hígado, así como en las células pilares branquiales, epitelios de los conductos renales, sistema vascular cerebral, etc. Estos autores, detectaron una inducción xenobiótica de CYP1A, en el hígado (hepatocitos, endotelio vascular y pancreas exocrino), en el corazón (endocardio atrial y ventricular, endotelio del bulbo arterioso, endotelios vasculares), en riñón (epitelio del conducto colector, epitelio glomerular y endotelios), tracto gastrointestinal (epitelio gástrico, epitelio de ciegos pilóricos, endotelios) y en los endotelios del sistema vascular de gonadas, tejido olfatorio, bazo y cerebro.

En ejemplares procedentes de áreas contaminadas o tratados experimentalmente con diferentes xenobióticos lipofílicos (Husoy et al., 1996), se ha observado una gran inducción de CYP1A en la mayor parte de los tejidos y en sus diferentes estructuras celulares. Así, se señala una inmunoreactividad anti-CYP1A inducida por xenobióticos, en el epitelio biliar, epitelio intestinal, epitelio respiratorio, además de un incremento de inmunotinción en los endotelios del sistema vascular de la mayor parte de los tejidos estudiados. Sin embargo, estos autores señalan la existencia de diferencias interespecíficas e intraespecíficas en la inducción de CYP1A, por ejemplo a nivel del hígado. Así, en algunas especies de peces se observa un mayor incremento de CYP1A en los hepatocitos que en los endotelios; este mayor incremento de CYP1A, en los hepatocitos, suele ir acompañado de lesiones preneoplásicas hepáticas. Este hecho podría soportar la hipótesis de que la expresión e inducción de CYP1A en los endotelios, puede producir un efecto protector en los hepatocitos subyacentes, frente al daño tisular inducido por los compuestos xenobióticos (Husoy et al., 1996).

Recientemente, Van Veld et al. (1997) pusieron de manifiesto la existencia de una diferente ruta de expresión tisular de CYP1A en ejemplares de *Fundulus heteroclitus*, expuestos a diferentes xenobióticos inductores de CYP1A como el benzopireno (BP), cuando la exposición se realizaba directamente a través del agua o por vía trófica. En el primer caso, estos autores observaron una mayor inmunoreacción, frente al anticuerpo anti-CYP1A, en las células pilares branquiales, epitelio branquial, endotelio del corazón, hígado, riñón y sistema vascular, mientras que por vía trófica, la mayor inmunoreacción se observó en el epitelio del tracto digestivo, siendo inapreciable en el hígado. Durante su paso por el intestino, el alimento contaminado por benzopireno sufre una gran transformación (Van Veld et al., 1988) y, por tanto, el intestino parece constituir un primer paso eficiente para la biotransformación y reducción de los niveles de los inductores activos que llegan al hígado y a otros tejidos. Esto podría explicar la falta de aparente inducción de CYP1A en el hígado, sistema vascular, etc., cuando la exposición de los peces, a estos contaminantes, se realiza sólo a través de la dieta. Cuando los peces son expuestos a concentraciones muy elevadas de xenobióticos inductores de CYP1A, a través del alimento, los contaminantes pueden, sin embargo, escapar de la

biotransformación intestinal y alcanzar el hígado y otros tejidos (Van Veld et al., 1991). Asimismo, cuando los peces son coexpuestos (agua y vía trófica) al benzopireno, la respuesta inductora de CYP1A se observa fundamentalmente en hígado, branquias y sistema vascular de diferentes tejidos, incluyendo tracto digestivo, riñón, corazón, epitelio olfatorio, etc. Nosotros en larvas de dorada tratadas con lindano γ -HCH detectamos una intensa inmunoreacción en el hígado (sistema vascular), en el tracto digestivo, a nivel del borde estriado y citoplasma de los enterocitos y en las vacuolas supranucleares presentes en el intestino posterior y relacionadas según diferentes autores (en Sarasquete et al., 1997) con una micropinocitosis proteica. Por otro lado, también se ha sugerido que altos niveles de PAHs en la dieta pueden producir efectos similares a los que se producen a través del agua (vía branquial) y viceversa. Sin embargo, es conveniente recordar que compuestos xenobióticos como PAH y PHAHs, que a menudo coexisten en el ambiente, muestran diferentes rutas de expresión (Van Veld et al., 1997).

La hepatotoxicidad y la inducción hepática de CYP1A parece estar más influenciada por la incorporación del benzopireno a través de las branquias, siendo además órganos diana, el hígado, endotelio del corazón y otros tejidos. Asimismo, en estudios realizados en peces procedentes de zonas contaminadas con PAHs, se sugiere que la inducción de CYP1A a nivel intestinal, puede servir como una bioindicador de contaminación a través de la dieta (Van Veld et al., 1990, 1997). Sin embargo, y a pesar de las aparentes diferencias en la expresión tisular de CYP1A, señalada por Van Veld y colaboradores, obviamente es necesario tener en cuenta que en el medio ambiente las rutas de incorporación están muy influenciadas por la complejidad de los procesos biogeoquímicos cíclicos de los tóxicos, las mezclas complejas de tóxicos, la unión de los tóxicos a la materia orgánica disuelta, múltiples efectos sinérgicos y/o antagónicos de contaminantes que coexisten en el medio ambiente, diferencias interespecíficas, factores temporales, niveles tróficos, estrategias de alimentación, contenido lipídico de los peces, sexo, etc. Por tanto, parece necesario realizar estudios integrados *in vitro/in vivo*, con el mayor número de factores fisiológicos posibles por un lado y de diferentes aspectos geoquímicos de los contaminantes por otro, con objeto de disponer de la mayor información posible sobre el efecto de los

contaminantes (toxicidad, biodisponibilidad, desintoxicación, etc.) en el medio ambiente y biota.

CITOCROMOS P-450 (CYP1A)-: CEREBRO Y PITUITARIA

En mamíferos, el sistema enzimático P-450 cerebral no sólo interviene en el metabolismo de compuestos xenobióticos, sino que en combinación con otros sistemas enzimáticos participa en la compleja ruta metabólica que controla la función neuronal. Por tanto, el potencial neuromodulador, vía citocromo P-450s monooxigenasas es evidente, como también lo es la capacidad del cerebro para transformar los compuestos xenobióticos, así como para interferir en los procesos de neurotransmisión (en Mesnil et al., 1984). En el cerebro de vertebrados, las neuronas catecolaminérgicas parecen contener P-450s exclusivos del sistema nervioso central (Kapitulnik et al., 1987).

Es ampliamente conocido que un papel importante del sistema enzimático P-450, en el cerebro, es la transformación de andrógenos en estrógenos por aromatización y la de estrógenos en catecol-estrógenos por hidroxilación. En el cerebro de mamíferos, la actividad aromatasas, predominantemente mitocondrial, se localiza, fundamentalmente en el hipotálamo y área límbica, siendo muy escasa en la pituitaria y cortex. La presencia de catecol-estrógenos en áreas específicas del cerebro de diferentes vertebrados, incluyendo el hipotálamo y la pituitaria, y el hecho de que estos compuestos se sintetizan en circunstancias normales, sugiere que los catecol-estrógenos juegan un papel fisiológico importante en el cerebro (en Mesnil et al., 1984). En vertebrados, Kapitulnik et al. (1987) detectaron la presencia de isoenzimas dependientes de los citocromos P-450 en áreas cerebrales responsables del metabolismo de compuestos exógenos y endógenos, como las isoenzimas relacionadas con la conversión de estradiol y estrona en catecolestrógenos. Por tanto, y como ya se ha señalado, en el cerebro los citocromos P-450 modulan importantes procesos fisiológicos, pero también pueden interferir en sus acciones y alterar determinadas funciones neuroendocrinas.

Numerosos xenobióticos orgánicos inducen la síntesis de P-450 monooxigenasas, las cuales pueden incrementar el catabolismo de esteroides, así como producir una disminución de los niveles de gonadotropinas (Thomas, 1990). En el hígado y cerebro de mamíferos, la actividad 2-estrogeno-

hidrolasa, es catalizada por el sistema enzimático P450 monooxigenasas, pero estas enzimas difieren entre sí y en relación a las que metabolizan compuestos xenobióticos. Así por ejemplo, en ratas, las monooxigenasas hepáticas tienen mayor afinidad por el estradiol, que las correspondientes del cerebro. Aunque en el hígado, estas enzimas son sensibles a cambios en la función tiroidea, esto no se refleja en la forma cerebral. Las mayores concentraciones de actividad 2-estrogeno-hidrolasa se observan en el cerebro, siendo el órgano diana de esta actividad enzimática. Por tanto, el metabolismo de los substratos hormonales en tejidos neuroendocrinos -diana- es crítico para la expresión de la acción fisiológica de dichas hormonas. En el cerebro, la participación de los citocromos P-450 en el metabolismo hormonal sugiere que este complejo enzimático participa en la neuromodulación cerebral y obviamente, estas funciones fisiológicas pueden verse alteradas por compuestos inductores de enzimas catalizadas por citocromos-P450 (en Mesnil et al., 1984).

Por otra parte, ya que los compuestos xenobióticos transportados por la sangre deben atravesar las células endoteliales antes de alcanzar el cerebro, la capacidad del complejo CYP en los endotelios, para convertir compuestos lipofílicos en productos más polares debe afectar al transporte de estas sustancias en el cerebro (Andersson & Goksoyr, 1994). En el cerebro de ratas, las enzimas dependientes del complejo P-450 se distribuyen en diferentes células, mostrando las neuronas una mayor actividad que las células de la glia. Puesto que las neuronas contienen toda la maquinaria necesaria para la síntesis de diferentes substratos endógenos, como neurotransmisores, neurohormonas, etc., la presencia de una alta actividad P-450-monooxigenasas en las neuronas, sugiere que este complejo enzimático además de jugar un papel fisiológico en el cerebro, pueden participar en la toxicidad/desintoxicación de compuestos xenobióticos en los tejidos diana (Dhawman et al., 1990). Así, en ratas, los cuerpos celulares neuronales presentan mayor concentración de CYP1A y mayor actividad de AHH y EROD que las células de la glia, siendo también mucho mayor su inducción xenobiótica, por ejemplo por metilcolantreno, en las neuronas (Köhler et al., 1988; Dhawman et al., 1990). Sin embargo, Stegeman et al. (1991) en diferentes especies de peces no observaron inmunoreactividad anti-CYP1A en las neuronas de los ejemplares control ni en los procedentes de zonas

contaminadas por xenobióticos orgánicos inductores de CYP1A. Según diferentes autores (Smolowitz et al., 1991; Stegeman et al., 1991), la inmunoreactividad anti-CYP1A en el cerebro de peces se restringe al endotelio vascular. Nosotros, en larvas control y contaminadas con γ HCH de dorada, *Sparus aurata* y cerebro de ejemplares adultos control de *Dicentrarchus labrax* (Fig. 1 a 6), detectamos inmunoreactividad a nivel de todo el sistema vascular cerebral (Fig. 6), así como en la pituitaria y tercer ventrículo (adultos), bulbo olfativo y placoda del epitelio olfativo (larvas y adultos) y retina (larvas). En las larvas de dorada, *Sparus aurata* contaminadas con γ HCH parece observarse una inducción de CYP1A en el sistema vascular y sistema olfatorio (Fig. 1 a 5).

Según diferentes autores (en Mesnil et al., 1984) las enzimas mitocondriales del cerebro son más específicas que las microsómicas. En el cerebro de rata, la membrana interna mitocondrial muestra propiedades de permeabilidad restrictiva (Shiverick & Notelovitz, 1983); por tanto los substratos deben ser sintetizados en el interior de las mitocondrias o ser capaces de atravesar la membrana mitocondrial y alcanzar el lugar activo del enzima. Esta condición la cumplen los ácidos grasos y esteroides, pero no los compuestos xenobióticos. Por otra parte, los citocromos P450 microsómicos tienen una amplia capacidad para metabolizar substratos endógenos y exógenos (Das et al., 1981; en Mesnil et al., 1984; en Walther et al., 1986). Sin embargo, en el cerebro de ratas, Walther et al. (1986) señalaron que la oxidación y desintoxicación de los compuestos xenobióticos puede ocurrir en las mitocondrias y en el interior de las terminales nerviosas. Asimismo, y como ya se ha señalado anteriormente, en el cerebro de truchas, tanto las CYP1A mitocondriales, como las que se encuentran en la fracción microsómica pueden intervenir en el metabolismo (desintoxicación/bioactivación) de compuestos xenobióticos lipofílicos (Andersson & Goksoyr, 1994). Según estos autores, en el cerebro de truchas, la mayor concentración e inducción de CYP1A se detecta en el bulbo olfatorio, observándose además una actividad EROD basal e inducida en bulbo olfatorio, telencéfalo, hipotálamo, cerebelo y tectum óptico. En larvas de dorada (control y contaminadas con lindano), el bulbo olfatorio es la región cerebral que presenta una mayor inmunoreactividad frente al anticuerpo anti-CYP1A.

Por otro lado, las diferencias interespecíficas

en la acumulación de xenobióticos y formación de metabolitos en el cerebro, por ejemplo en el bacalao y trucha, podrían ser explicadas, en principio, en base a sus diferencias en el contenido lipídico (mayor en el bacalao). Sin embargo, según Andersson & Goksoyr (1994) la distribución y propiedades de las enzimas que metabolizan los compuestos xenobióticos en el sistema nervioso central, deben también jugar un papel importante en las diferencias interespecíficas observadas.

Es ampliamente conocido que el incremento de los niveles de CYP1A puede producir un aumento del metabolismo/desintoxicación de xenobióticos, pero también puede estar implicado en el incremento del metabolismo de substratos endógenos: hormonas esteroideas –alteraciones endocrinas–, hidroxilación del ácido araquidónico –actividad ATPásica muscular–, etc. y/o en la producción de sustancias bioactivas (Andersson & Goksoyr, 1994). Diferentes compuestos xenobióticos lipofílicos como dioxinas, bifenilos e hidrocarburos aromáticos relacionados, interfieren con importantes funciones fisiológicas, incluida la reproducción. Esta interferencia es debida, probablemente, a que estos tóxicos inducen alteraciones en los sistemas hormonales que regulan la reproducción. De hecho, las bajas capacidades reproductivas descritas en algunas especies de peces y/o los fenómenos de esterilidad e incluso de “feminización” han sido atribuidos a diferentes contaminantes orgánicos (en Navas et al., 1999).

En los tejidos que muestran propiedades endocrinas, las actividades enzimáticas catalizadas por los citocromos P450 se localizan en las mitocondrias y retículo endoplásmico. En las adrenales, las P450 mitocondriales están implicadas en la biotransformación oxidativa de esteroides hormonales (Cooper et al., 1973). El significado fisiológico y toxicológico de la presencia de isoenzimas P-450 en la pituitaria no son del todo conocidos. En el cerebro de ejemplares control de *Dicentrarchus labrax*, nosotros observamos una fuerte inmunoreactividad en la pituitaria, posiblemente, a nivel de las células gonadotropas (GTH II). En la pituitaria de truchas macho tratadas con naftoflavona (BNF), Andersson et al. (1993) detectaron una inducción de la actividad EROD, no observando inmunoreactividad, frente al anticuerpo anti CYP1A, en la pituitaria de ejemplares control. Según estos autores, la inducción xenobiótica de P450A se restringía a las células gonadotropas (GTH II). Los niveles elevados de GTH II y testosterona detectados en el

plasma de truchas macho tratados con BNF sugieren la existencia de una alteración hormonal de la reproducción, ya que las GTH II regulan los estadios finales de la maduración sexual (Andersson et al., 1993). Muchos compuestos xenobióticos afectan directamente a la actividad neural, en el hipotálamo y en otras áreas cerebrales, produciendo alteraciones en la función de los neurotransmisores y en la secreción de diferentes neurohormonas (GnRH y GRIF) que regulan la secreción de GTHs (Thomas, 1990).

Asimismo, en ratas macho, compuestos xenobióticos como la tetracloro-p-dioxina (TCDD) producen deficiencias androgénicas (Moore et al., 1985); se ha sugerido que estos compuestos alteran el *feed-back* negativo mediante el cual los esteroides regulan la secreción hormonal de la pituitaria, incrementando la potencia de los esteroides circulantes (Bookstaff et al., 1990). Esta disminución de los niveles séricos de andrógenos, podría ser debida a que compuestos como TCDD inducen una inhibición de determinadas enzimas esteroideogénicas, tales como 17 hidroxilasa y 17,20 liasa en los testículos (Mebus et al., 1997). En experimentos *in vitro*, se ha señalado que los PCBs alteran la secreción hipofisaria de gonadotropinas y se han descrito correlaciones entre la disminución de la esteroideogénesis tisular y los niveles plasmáticos de esteroides. Asimismo, en machos maduros de carpa y trucha, el tratamiento con PCBs produce una gran disminución en los niveles de andrógenos circulantes (Thomas, 1990) y alteraciones morfológicas en la cabeza de los espermatozoides (en Andersson et al., 1993).

Por otro lado, es ampliamente conocido que un incremento en los niveles de CYP1A puede

aumentar el metabolismo de los componentes esenciales o la producción de metabolitos que modifican la cascada de los eventos intracelulares que conducen a la liberación de las gonadotropinas. Es interesante señalar, por ejemplo, que la conversión metabólica del ácido araquidónico está regulada por hormonas que son liberadas por la pituitaria, observándose que compuestos xenobióticos como TCDD producen un aumento en los niveles de enzimas -NADPH- dependientes del metabolismo del ácido araquidónico y, por tanto, las funciones fisiológicas relacionadas con dicho ácido pueden estar alteradas. Determinadas isoenzimas del complejo CYP son especialmente activas en la monohidroxilación (C19) del ácido araquidónico (Andersson et al., 1993).

Finalmente, también es conocido que en Vertebrados, el cerebro contiene la maquinaria necesaria para la síntesis de prostaglandinas y análogos. En dicha síntesis participan isoenzimas catalizadas por los citocromos P-450; por tanto cualquier interferencia en dicho proceso (por ejemplo una inducción xenobiótica de CYP1A), puede interferir con la función que ejercen las prostaglandinas en el sistema nervioso central, ya que como es sabido un aumento de CYPs, produce no sólo un incremento, por ejemplo, del metabolismo y posterior desintoxicación de xenobióticos, sino que puede incrementar el metabolismo de substratos endógenos y/o la formación de intermediarios bioactivos (en Mesnil et al., 1984).

En resumen, en el cerebro, los citocromos P-450s modulan importantes funciones fisiológicas neuroendocrinas y los compuestos xenobióticos pueden alterar alguna de estas funciones, incluida la reproducción.

Tabla 1. Distribución e Inducción xenobiótica de isoenzimas CYP en mamíferos

Isoenzimas	Substrato	Localización
CYP1A1	PAHs, PCBs, dioxinas etoxiresorufin	hígado, cerebro pulmón, intestino,
CYP1A2	aflatoxinas, estradiol, <i>coffein</i> metoxiresorufin, <i>warfarin</i>	hígado
CYP4A	ácidos graso (hidroxilación), prostaglandinas (oxidation), ftalatos, clofibrate	hígado
CYP19	aromatasa (andrógenos —estrógenos)	cerebro
CYP2B6	ciclofosmamide	hígado
CYP3A1	corticosterona (6 β -hidroxilación)	hígado
CYP3A4	aflatoxinas, testosterona	intestino, hígado
CYP2E1	etanol, benzol, cloroformo, leucocitos	intestino, hígado

AGRADECIMIENTOS

Con esta pequeña Memoria queremos rendir un Homenaje al Prof. Dr. D. Manuel Gutiérrez-Rodríguez, con motivo de su 50 Aniversario como "Ilustre Científico Marino" y en especial en el campo de la Contaminación del Medio-Ambiente y Biota. Gracias especiales a los Dres J. Antonio Muñoz-Cueto, J. María Navas y M. Luisa González de Canales, así como a los Sres J. Bosco Ortiz, Juana Arellano e Isabel Viaña por su valiosa ayuda Científica y Técnica

ABREVIATURAS EN FIGURAS:

branquias (b); borde estriado (be); bulbo olfativo (bo); cavidad buco-faríngea (bf); células mucosas (cm); cerebro (c); enterocitos (e); epidermis (ep); gota grasa (gg); hígado (h); pituitaria (pi); placoda óptica (po); retina (r); sistema digestivo (sd); sincitio prerivitelo (sp); sistema vascular (sv); vacuolas supranucleares; saco-vitelo (v)

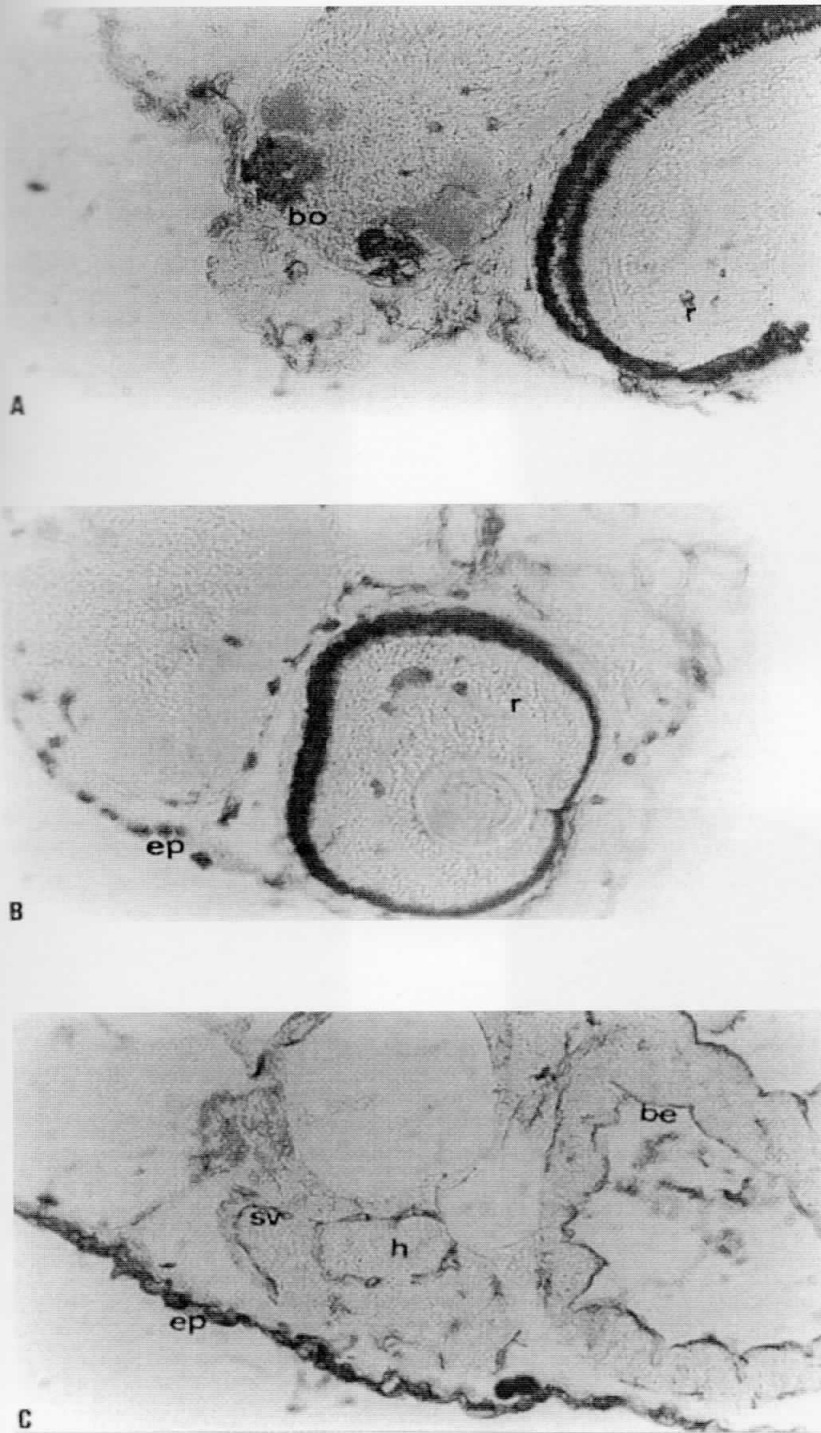


FIGURA 1. Distribución de CYP1A en larvas de dorada, *Sparus aurata* (4 días). Inmunoreacción en bulbo olfativo (A) de larvas tratadas con γ -hexaclorociclohexano (γ -HCH). Positividad frente al antisuero anti-CYP1A en retina (B), hígado, borde estriado del tracto digestivo y epidermis (C) de larvas control.

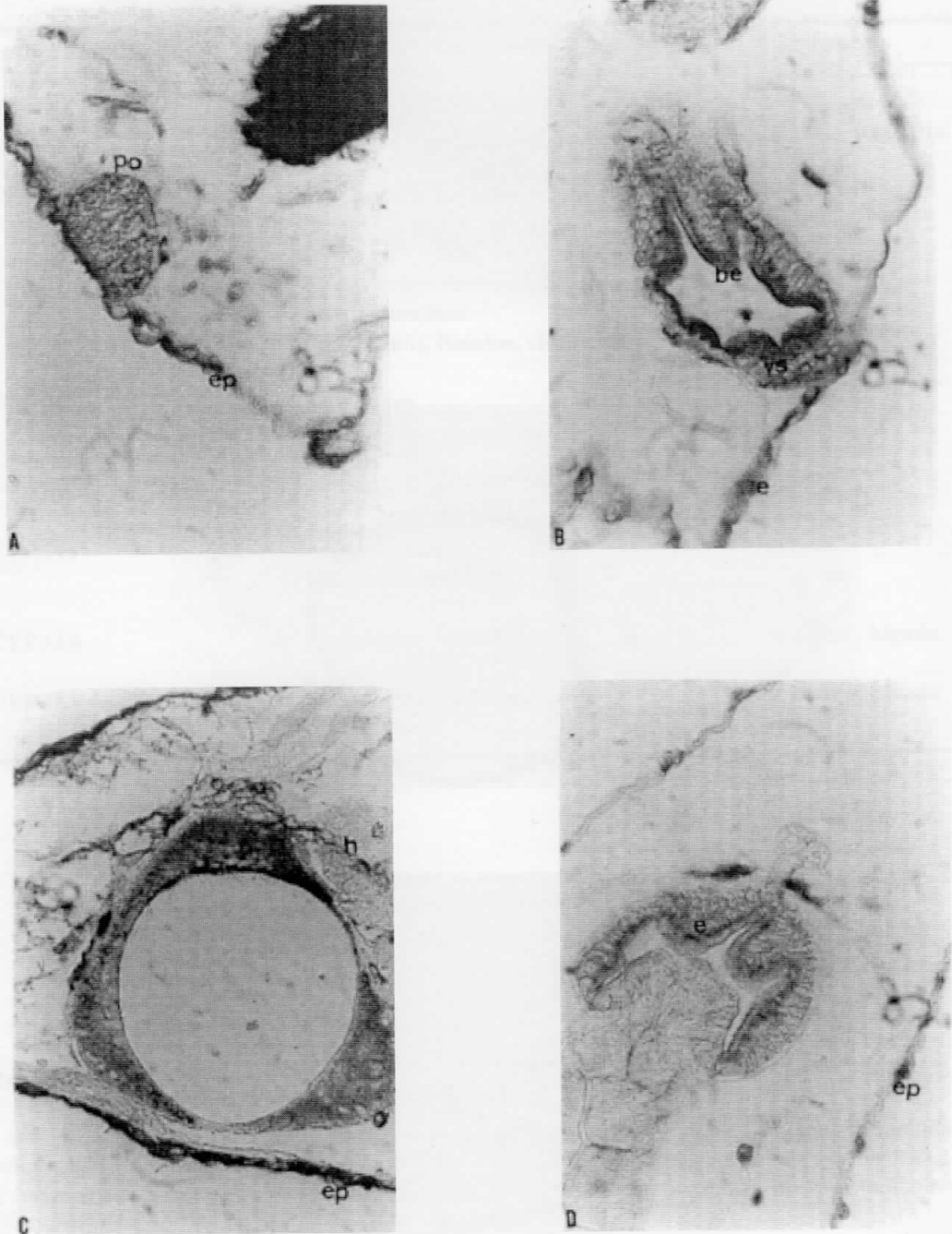


FIGURA 2. Distribución de CYP1A en larvas de dorada, *Sparus aurata* (4 días). Inmunoreacción en epitelio de la placoda olfativa (A) de larvas control. Borde estriado y vacuolas supranucleares del intestino posterior (B) e hígado con alteraciones en el sistema vascular -edema- en larvas contaminadas con γ -hexaclorociclohexano (C). Localización de CYP1A en los enterocitos del tracto digestivo y epidermis de larvas control (D).

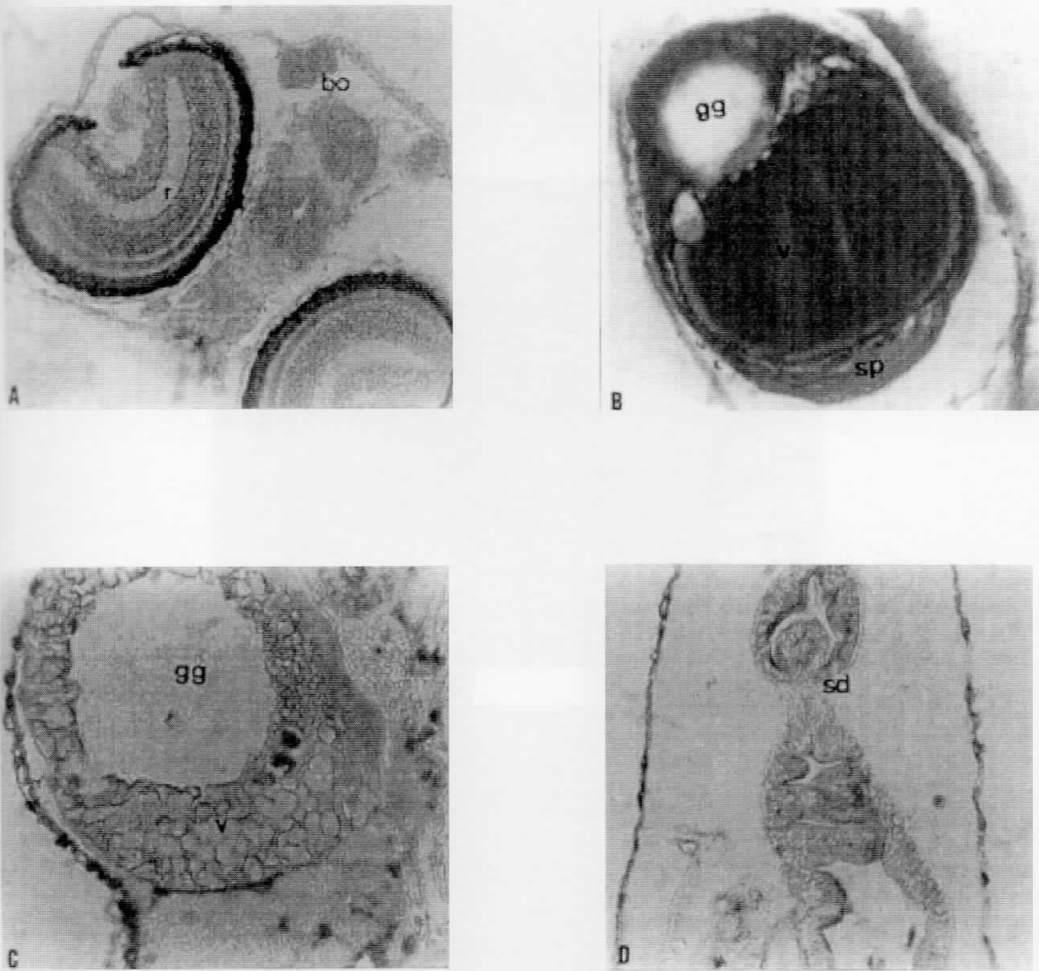


FIGURA 3. Sección histológica de una larva de dorada de 4 días. Control. Hematoxilina-V.O.F. (A). Saco de vitelo de una larva de dorada de 2 días. Control. Hematoxilina-V.O.F. (B). Saco de vitelo de una larva de 3 días. Control. anti-suero anti-CYP1A (C). Tracto digestivo de una larva de 4 días. Control. anti-suero anti-CYP1A. (D).

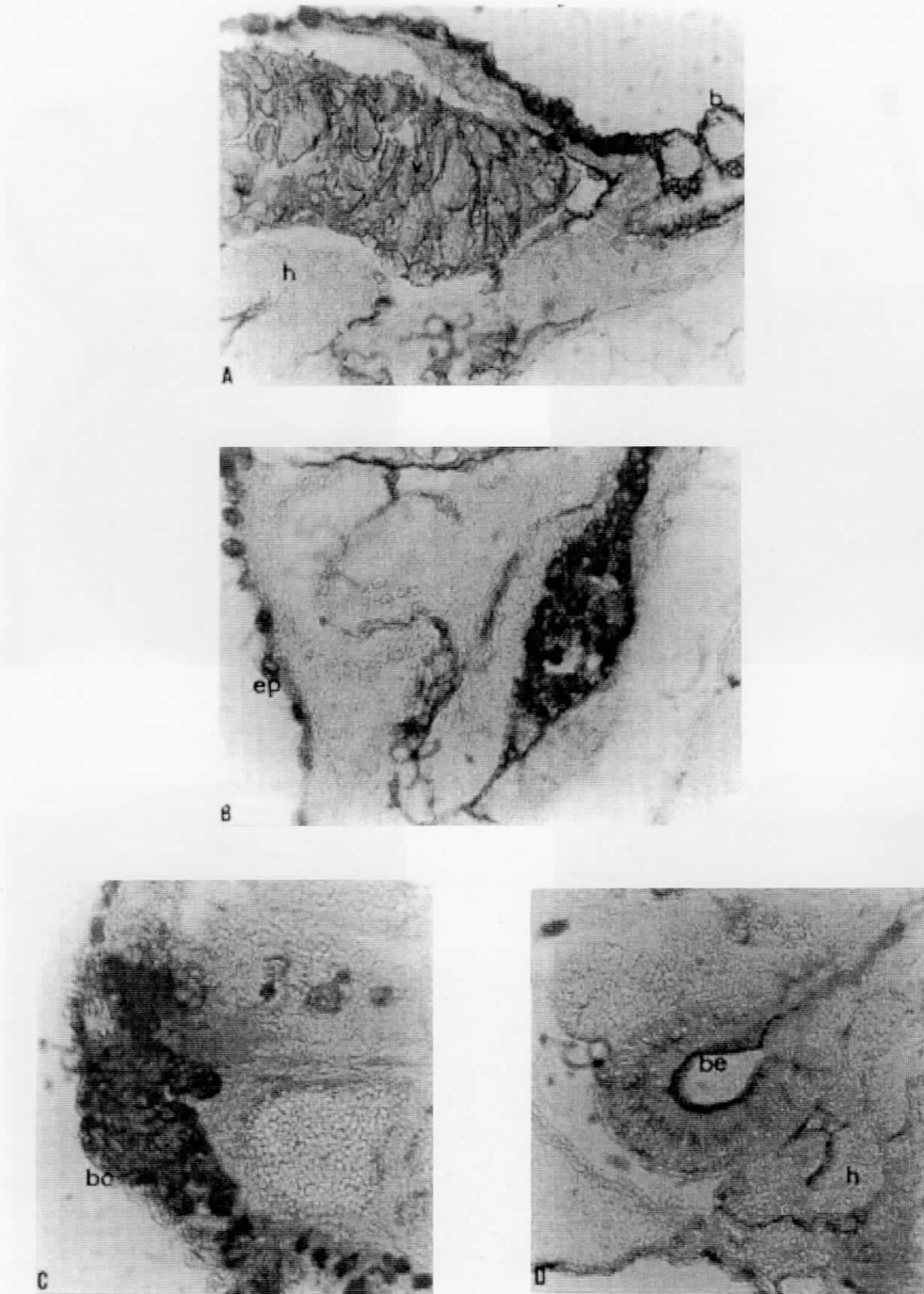


FIGURA 4. Inmunoreacción frente al antisuero anti-CYP1A en larvas de dorada control y tratadas con lindano. Inmunoreactividad en una larva de dorada de 3 días tratada con γ -HCH (24 horas, 400 mg/L) (A). Porción olfativa en larva de dorada, *Sparus aurata* de 4 días tratada con lindano (48 horas, 200 mg/L) (B). Inmunoreactividad frente a anti-CYP1A en el epitelio de la placoda olfativa de una larva tratada con lindano (24 horas, 400 ug/L) (C). Sistema digestivo de una larva de dorada, *Sparus aurata* tratada with γ -HCH (24 horas, 400 mg/L) (D).

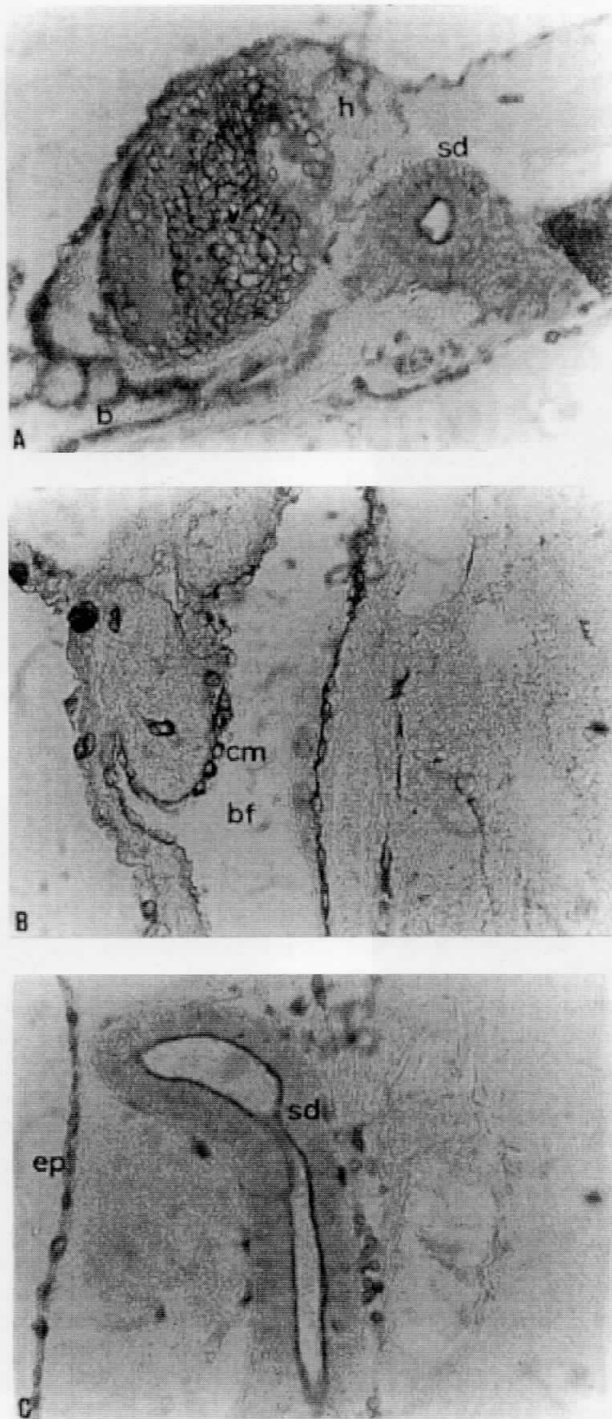


FIGURA 5. Inmunoreactividad frente al antisuero anti-CYP1A en larvas de dorada, *Sparus aurata*. Larva de dorada tratada con γ -HCH (24 h, 400 mg/L) (A). Inmunoreacción en la cavidad buco-faríngea de una larva de 4 días tratada con lindano (48 h, 200 mg/L) (B). Epitelio digestivo de una larva control de 4 días, mostrando una inmunoreacción positiva frente al antisuero anti-CYP1A (C).

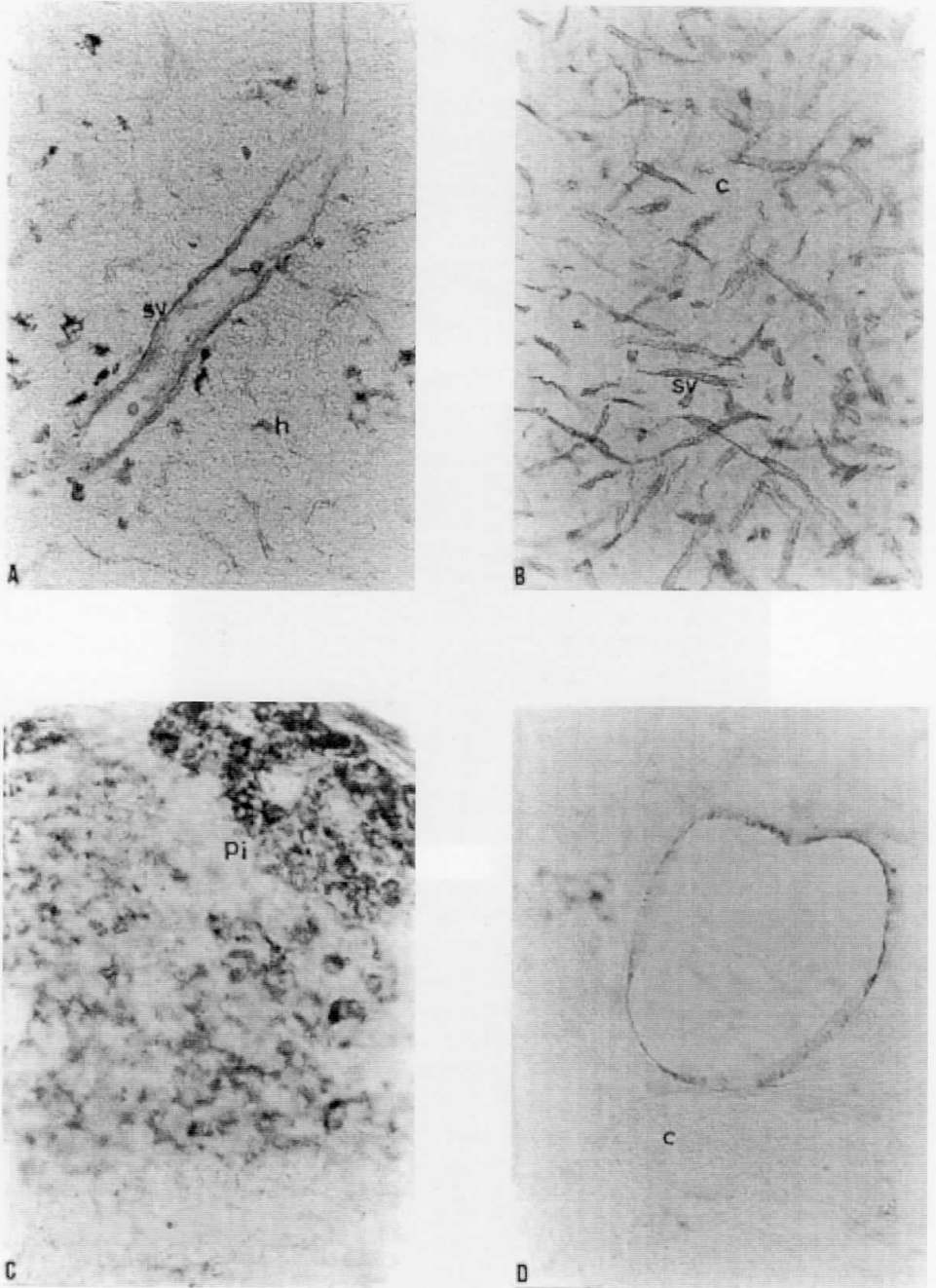


FIGURA 6. Localización de CYP1A en hígado (sistema vascular, sinusoides y conductos biliares) de *Fundulus heteroclitus* (A); en sistema vascular del cerebro (B); pituitaria (C) y vaso cerebral (D) de ejemplares de robalo, *Dicentrarchus labrax* control.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSSON, T. & GOKSOYR, A. 1994. Distribution and induction of cytochrome P4501A1 in the rainbow trout brain. *Fish Physiol. Biochem.* 13(4):335-342.
- ANDERSSON, T., FÖRLIN, L., OLSEN, S., FOSTIER, A. & BRETON, B. 1993. Pituitary as a target organ for toxic effects of P4501A1 inducing chemicals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 91:99-105.
- BOOKSTAFF, R., MOORE, R.W., PETERSON, R.E. 1990. 2,3,7,8-Tetrachlorobenzo-p-dioxin increases the Potency of Androgens and Estrogens as feedback inhibitors of luteinizing hormone secretion in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 104: 212-224.
- BEHRENS, A., SCHIRMER, K., BOLLS, N.C. & SEGNER, H. 1998. Microassay for rapid measurement of 7-ethoxyresorufin-0-deethylase activity in intact fish hepatocytes. *Mar. Environ. Res.* 46:369-373.
- BINDER, R.L. & STEGEMAN, J.J. 1980. Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activities in embryos of an estuarine fish. *Biochem. Pharmacol.* 29:949-955.
- BINDER, R.L. & STEGEMAN, J.J. 1983. Basal levels and induction of hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase activity during the embryonic period of development in brook trout. *Biochem. Pharmacol.* 32:1324-1328.
- BINDER, R.L., STEGEMAN, J.J. & LECH, J.J. 1985. Induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenase systems in embryos and eleutheroembryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Chem. Biol. Interactions*, 55: 185-202.
- BLASCO, J. 1998. El uso de biomarcadores en contaminación marina. En "Patología, Fisiología y Biotoxicología en Acuicultura". Serv. Public. Univ. Cádiz. C. Sarasquete, J.A. Muñoz-Cueto y M.L. González de Canales (Eds.).
- BRAUNBECK, T. HAUCK, C., SCHOLZ, S. & SEGNER, H. 1995. Mixed function oxygenases in cultured fish cells: contributions of in vitro studies to the understanding of MFO induction. *Z. Angew. Zool.* 81:55-72.
- BUCHELI, T.D. & FENT, K. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25:201-268.
- BURKE, M. & MAYER, R. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug. Metab. Disp.* 2:538-588.
- COOPER, D.Y., SCHLEYER, H. & ROSENTHAL, O. 1973. Chemistry of cytochrome P-450 purified from endocrine systems. *Drug. Met. Disp.* 1:21-28.
- DAS, M., SETH, P.K. & MUKHTAR, H. 1981. NADH-dependent inducible aryl hydrocarbon hydroxylase activity in rat brain mitochondria. *Drug Met. Disp.* 9:69-70.
- DHAWMAN, A., PARMAR, D., DAS, M. & SETH, K. 1990. Cytochrome P-450 dependent monooxygenase in neuronal and glial cells: Inducibility and specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170:441-447.
- GHERSI-EGEA, J.F., MINN, A. & SIEST, G. 1988. A new aspect of the protective function of the blood brain barrier: activities of four drug-metabolizing in isolated rat brain microvessels. *Life Sci.* 42:2515-2523.
- GOONERATNE, R., MIRANDA, C.L., HENDERSON, M.C., BUHLER, D.R. 1997. β -naphthoflavone induced CYP1A1 and CYP1A3 proteins in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Xenobiotica*, 27:175-187.
- GOKSOYR, A. & FÖRLIN, L. 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* 22:287-312.
- GUINEY, P.D., SMOLOWITZ, R.M., PETERSON, R.E. & STEGEMAN, J.J. 1997. Correlation of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction of

- Cytochrome P4501A in vascular endothelium with toxicity in early life stages of Lake trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143: 256-273.
- HENRY, T.R., SPITSBERGEN, J.M., HORNUNG, M.W., ABNET, C.C. & PETERSON, R.E. 1997. Early life stage toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Zebrafish, *Danio rerio*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142: 56-68.
- HUSOY, A.M., MYERS, M.S., WILLIS, M.L., COLLIER, T.K., CELANDER, M. & GOKSOYR, A. 1994. Immunohistochemical localization of CYP1A and CYP3A-like isozymes in hepatic and extrahepatic tissues of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), a marine fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 129: 294-308.
- HUSOY, A.M., MYERS, M.S. & GOKSOYR, A. 1996. Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sorfjorden, Norway. *Aquatic Toxicol.* 36:53-74.
- ISCAN, M., REUHL, K., WEISS, B. & MAINES, M.D. 1990. Regional and subcellular distribution of cytochrome P-450 dependent drug metabolism in monkey brain: The olfactory bulb and the mitochondrial fraction have high levels of activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169:858-863.
- KAPITULNIK, J., GELBOIN, H.V., GUENGERICH, F.P. & JACOBOWITZ, D.M. 1987. Immunohistochemical localization of cytochrome P-450 in rat brain. *Neuroscience*, 20: 829-833
- KENNEDY, S.W., JONES, S.P. & BASTIEN, J.P. 1995. Efficient analysis of cytochrome P4501A catalytic activity, porphyrins, and total proteins in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence plate reader. *Anal. Biochem.* 226: 362-370.
- KÖHLER, C., ERIKSSON, L.G., HANSSON, T., WARNER, M. & GUSTAFSSON, J.A. 1988. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 84:109-114.
- LAUREN, D.J., OKIHIRO, M.S., HINTON, D.E. & STEGEMAN, J.J. 1990. Localization of cytochrome P4501A1 induced by β -naphthoflavone (BNF) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *FASEB J.*4:A379.
- MESNIL, M., TESTA, B. & JENNER, P. 1984. Xenobiotic metabolism by brain monooxygenases and other cerebral enzymes. In: *Drug metabolism: chemical and biochemical aspects*. B. Testa (Ed.), *Advances in Drug Research*, 13, Academic Press, London. pp. 95-207.
- MEBUS, C.A., REDDY, V.R. & PIPER, W.N. 1987. Depression of rat testicular 17-hydroxylase and 17,20-lyase after administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Biochemical Pharmacology*, 36(5): 727-731.
- MILLER, M.R., HINTON, D.E., BLAIR, J.J. & STEGEMAN, J.J. 1988. Immunohistochemical localization of cytochrome P-450E in liver, gill and heart of scup (*Stenotomus chrysops*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Mar. Environ. Res.* 24:37-39.
- MONOD, G., SAUCIER, D., PERDU-DURAND, E., DIALLO, M., CRAVEDI, J.P. & ASTIC, L. 1994. *Fish Physiol. Biochem.* 13:433-444.
- MOORE, R.W., POTTER, C.L., THEOBALD, H.M., ROBINSON, J.A. & PETERSON, R.E. 1985. Androgenic deficiency in male rats treated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 79: 99-111.
- NAVAS, J.M., SCHRAG, B. & SEGNER, H. 1999. Avances en ecotoxicología marina. I. Toxicidad de compuestos químicos en el medio acuático: xenobióticos y alteraciones endocrinas. En "Patología, Fisiología y Biotoxicología en Especies Acuáticas". CSIC. Serv. Public. C. Sarasquete, J.A. Muñoz-Cueto y M.L. González de Canales (Eds.). (Madrid)
- PAYNE, J.F. 1976. Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science*. 191:945-946.
- PETERS, L.D., & LIVINGSTONE, D.R. 1995. Studies of cytochrome P4501A in early life stages of

- turbot, *Scophthalmus maximus*. Mar. Env. Res., 39: 5-9.
- PETERS L.D., O'HARA S.C.M., LIVINGSTONE D.R. 1996. Benzo(a)pyrene metabolism and xenobiotic-stimulated reactive oxygen species generation by subcellular fraction of larvae of turbot, *Scophthalmus maximus* L. Comp Biochem Physiol. 114C:221-227.
- PLUTA, H.J. 1993. Investigations on biotransformation (mixed function oxygenase activities) in fish liver. In: Braunbeck, T., Hanke, W., Segner, H. (Eds.). Fish ecotoxicology and ecophysiology. V.C.H. Weinheim, pp. 13-33.
- REINECKE, M. & SEGNER, H. 1998. Immunohistochemical localization of cytochrome P4501A in developing turbot, *Scophthalmus maximus*. Mar. Environ. Res. 46:487-492.
- SARASQUETE, C., MUÑOZ-CUETO, J.A., ARELLANO, J. & GONZALEZ DE CANALES, M.L. 1997. Histofisiología e histopatología durante el desarrollo larvario de peces de interés en acuicultura. En "Histofisiología e Histopatología de especies marinas de interés en Acuicultura" Serv. Public. Univ. Cádiz. González de Canales, J.A. Muñoz-Cueto y C. Sarasquete (Eds.). pp. 11-34.
- SARASQUETE, C., MUÑOZ-CUETO, J.A., ORTIZ, J.B., RODRIGUEZ-GOMEZ, F.J., DINIS, M.T. and SEGNER, H. 1999. Immunocytochemical localization of Cytochrome P450 (CYP1A) in developing gilthead seabream, *Sparus aurata* larvae. *Histology and Histopathology*, 14:407-415.
- SARASQUETE, C. & SEGNER, H. 1999. Cytochrome P450 1A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. On Towards an Integrative Approach in Environmental Contamination and Toxicology In Science of the Total Environment (in press).
- SEGNER, H., STORCH, V., REINECKE, M. & KLOAS, W. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. Marine Biology, 119: 471-486.
- SEGNER, H., GONZÁLEZ DE CANALES, M.L., BLASCO, J. & SARASQUETE, C. 1997. El uso de líneas celulares de peces para la valoración de la toxicidad de los metales pesados. En "Histofisiología e Histopatología de especies marinas de interés en Acuicultura" Serv. Public. Univ. Cádiz. M.L. González de Canales, J.A. Muñoz-Cueto y C. Sarasquete (Eds.). pp. 113-130.
- SEGNER, H., GONZÁLEZ DE CANALES, M.L., BLASCO, J. & SARASQUETE, C. 1998. Avances en ecotoxicología marina. Los citocromos P450 (CYP1A) como biomarcadores de la contaminación por compuestos xenobióticos y ensayos de citotoxicidad en líneas celulares de peces. En "Patología, Fisiología y Biotoxicología en Acuicultura". Serv. Public. Univ. Cádiz. C. Sarasquete, J.A. Muñoz-Cueto y M.L. González de Canales (Eds.). pp. 71-94.
- SHIVERICK, K.T. & NOTELOVITZ, M. 1983. Mestranol induced hypertension: characterization of cytochrome P-450 dependent catechol estrogen formation in brain microsomes. Biochem. Pharmacol. 32:101-106.
- SMOLOWITZ, R.M., HAHN, M.E. & STEGEMAN, J.J. 1991. Immunohistochemical localization of cytochrome P450IA1 induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup). Drug. Metab. Dispos. 19:113-123.
- STEGEMAN, J.J. & HAHN, M.E. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.). Aquatic Publishers, Boca Raton. pp. 87-203.
- STEGEMAN, J.J., BINDER, R.L. & ORREN, A. 1979. Hepatic and extrahepatic microsomal electron transport components and mixed-function oxygenases in the marine fish *Stenotomus versicolor*. Biochem. Pharmacol. 28:3431-3439.
- STEGEMAN, J.J., WOODIN, B.R., PARKS, S.S., KLOPPER-SAMS, P.J. & GELBOIN, H.V. 1985. Microsomal cytochrome P-450 function in fish evaluated with polyclonal and monoclonal antibodies to

- cytochrome P-450E from scup (*Stenotomus chrysops*). *Mar. Environ. Res.* 17:83-86.
- STEGEMAN, J.J., MILLER, M.R. & HINTON, D.E. 1989. Cytochrome P450IA1 induction and localization in endothelium of vertebrate (teleost) heart. *Mol. Pharmacol.* 36:723-729.
- STEGEMAN, J.J., SMOLOWITZ, R.M. & HAHN, M.E. 1991. Immunohistochemical localization of environmentally induced cytochrome P450IA1 in multiple organs of the marine teleost *Stenotomus chrysops* (Scup). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110:486-504.
- THOMAS, P. 1990. Teleosts model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. *Journal Experimental Zoology*, 4: 126-128.
- VAN VELD, P.A., PATTON, J.S. & LEE, R.F. 1988. Effect of preexposure to dietary benzo[a]pyrene on the first-pass metabolism of BP by the intestine of toadfish (*Opsanus tau*): *In vivo* studies using portal-vein catheterized fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92:255-265.
- VAN VELD, P.A., WESTBROOK, D.J., WOODIN, B.R., HALE, R.C., SMITH, C.L. HUGGETT, R.J. AND STEGEMAN, J.J. 1990. Induced cytochrome P-450 in intestine and liver of spot (*Leiostomus xanthurus*) from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. *Aquatic Toxicol.* 17:119-132.
- VAN VELD, P.A., KO, U., VOGELBEIN, W.K. & WESTBROOK, D.J. 1991. Glutathione S-transferase in intestine, liver and hepatic lesions of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated environment. *Fish Physiol. Biochem.* 9:369-37.
- VAN VELD, P.A., VOGELBEIN, W.K., COCHRAN, M.K., GOKSOYR, A. & STEGEMAN, J.J. 1997. Route-specific cellular expression of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary benzo[a]pyrene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142:348-359.
- WALTHER, B., GHERSI-EGEA, J.F. MINN, A. & SIEST, G. 1986. Subcellular distribution of cytochrome P450 in the brain. *Brain Res.* 375:338-344.
- WALTHER, B., GHERSI-EGEA, J.F. JAYOSI, Z., MINN, A. & SIEST, G. 1987. Ethoxyresorufin-O-deethylase activity in rat brain subcellular fraction. *Neurosci. Lett.* 76:58-62.
- YAN, C.S. & LU, A.Y.H. 1987. The diversity of substrates for cytochrome P-450. *In Mammalian Cytochrome P-450*. Vol. II, pp. 1-18. Edited by F.P. Guengerich. CRC Press, Boca Raton.