

Phenanthrene and nitrite effects on juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, using hepatic biotransformation enzymes, biliary fluorescence, and micronuclei as biomarkers

Efectos del fenantreno y el nitrito en juveniles del róbalo, *Dicentrarchus labrax*, mediante el uso de enzimas hepáticas biotransformadoras, fluorescencia biliar y micronúcleos como biomarcadores

MA Reis-Henriques^{1,3*}, M Ferreira^{1,3}, AM Coimbra^{1,3}, C D'Silva², J Costa^{1,3}, MS Shailaja²

¹ CIIMAR-UP – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Rua dos Bragas 289, 4050-123 Porto, Portugal. * E-mail: mahenriq@icbas.up.pt

² NIO – National Institute of Oceanography, Dona Paula, Goa 403004, India.

³ ICBAS-UP – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Largo do Professor Abel Salazar 2, 4090-003, Porto, Portugal.

Abstract

Aquatic organisms may absorb organic compounds mainly from water and by ingestion of contaminated food. The toxicity of such compounds may be intensified by the presence of certain inorganic compounds such as nitrite (NO_2^-). In order to evaluate the effect of phenanthrene (PHE), a polycyclic aromatic hydrocarbon, in the presence and absence of NO_2^- , juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax* L, were exposed to PHE i.p. and to NO_2^- in water, and several endpoints were measured at days 1, 3, and 6 of exposure. Sea bass exposed to PHE exhibited lower hepatic 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity as compared to the control group. The activity of the phase II enzyme, glutathione S-transferase (GST), was similar in all the groups of fish. The concentration of PHE metabolites, determined as fluorescent aromatic compounds, was nearly 14 times higher both in the presence and absence of NO_2^- , showing that even at low EROD activities this PAH is metabolized. The presence of micronuclei was observed to be significantly higher only in sea bass treated with PHE alone, suggesting that different PHE metabolites, without genotoxic properties, were formed in the presence of NO_2^- .

Key words: biotransformation enzymes, micronucleus, nitrite, phenanthrene, polycyclic aromatic hydrocarbons.

Resumen

Los organismos acuáticos pueden absorber compuestos orgánicos principalmente del agua y por ingestión de sustancias alimenticias contaminadas. La toxicidad de tales compuestos se puede ver intensificada por la presencia de ciertos compuestos inorgánicos como el nitrito (NO_2^-). Para evaluar el efecto del fenantreno (PHE), un hidrocarburo aromático policíclico, en presencia y ausencia de NO_2^- , se expusieron juveniles de róbalo, *Dicentrarchus labrax* L, a PHE intraperitoneal y NO_2^- en el agua, y se midieron varias respuestas a los 1, 3 y 6 días de exposición. Los organismos expuestos al PHE mostraron menor actividad de la 7-etoxiresorufina O-deetilasa (EROD) hepática en comparación con el grupo control. La actividad de la enzima de la fase II, glutatión S-transferasa (GST), fue similar en todos los grupos de peces. La concentración de metabolitos del PHE, determinada en forma de compuestos aromáticos fluorescentes, fue cerca de 14 veces mayor tanto en presencia como en ausencia de NO_2^- , lo que muestra que el PHE es metabolizado aun con bajas actividades de la EROD. Sólo se observó una presencia significativamente mayor de micronúcleos en róbalos tratados únicamente con PHE, lo que sugiere que en presencia de NO_2^- se formaron otros metabolitos del PHE que carecen de propiedades genotóxicas.

Palabras clave: enzimas biotransformadoras, fenantreno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, micronúcleos, nitrito.

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a widespread class of environmental pollutants known to exert acutely toxic effects. Aquatic organisms, like fish, may absorb these compounds mainly from the water through gills and by the ingestion of contaminated sediments or food. Phenanthrene (PHE), a three-ring PAH, included in the US-EPA priority PAHs, is present in the aquatic environment as a result of both petrogenic and pyrogenic sources, and it has been shown to exert

Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) son contaminantes muy tóxicos ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Los organismos acuáticos, como los peces, pueden absorber estos compuestos del agua a través de las branquias y mediante la ingestión de sedimentos o alimentos contaminados. El fenantreno (PHE), un PAH con tres anillos, considerado uno de los PAHs prioritarios para la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, se

toxicity in several marine species (Albers 2003). PHE is the smallest tricyclic PAH to have a “bay region” and a “K region”, the highly reactive regions where the main carcinogenic species can be formed (Correia *et al.* 2007). For this reason it is commonly used as a model substrate for studies on metabolism of carcinogenic PAHs.

The highly reactive nitrite (NO_2^-) is produced naturally, mainly through biological processes such as denitrification and nitrification dominated by ammonia (NH_3) oxidation. Even though NO_2^- is a natural compound, its presence in the environment is a potential problem and NO_2^- toxicity to animals is well-documented (Jensen 2003). Generally, it is less toxic in seawater than in freshwater due to the high chloride concentration and to the opposite osmotic gradient in fish; however, due to the high fish density in intensive marine culture units, supplied with recirculating water, frequently the NO_2^- levels can become highly toxic (Doblender and Lackner 1996, Jensen 2003). Aquatic animals are at risk towards NO_2^- intoxication, because in water it can be taken up across the gill epithelium and intestine, and accumulated to very high concentrations in body fluids. Nitrite exerts its toxicity by reducing the oxygen-carrying capacity of the blood and it is also linked to inhibition of phase I (cytochrome P450-mediated) biotransformation in fish (Arillo *et al.* 1984). Furthermore, environmentally realistic concentrations of NO_2^- can affect the dynamics of conjugation metabolism in exposed fish (Gonzalez *et al.* 2000), and moreover, NO_2^- enhances toxicity of PHE in tilapia (*Oreochromis mossambicus*), leading to the increased formation of carcinogenic metabolites (Shailaja and Rodrigues 2003).

Several studies have demonstrated the induction of the cytochrome P450-dependent mixed function oxidase (MFO) system as a biological biomarker of exposure to anthropogenic organic contaminants such as PAHs, polychlorobiphenyls (PCBs), organochlorine pesticides, dioxins, and furans (Eggens *et al.* 1996, Gagnon and Holdway 2002, Ferreira *et al.* 2004, 2006). The phase I metabolites are then available for phase II conjugation with glutathione, glucuronide or sulphate, leading to decreased reactivity and increased excretion (Van der Oost *et al.* 2003). In common with all vertebrates, fish have a well-developed MFO system that can rapidly metabolize parent PAHs into hydrophilic products that are more easily excreted. Consequently, only minor concentrations of parent compounds are usually detectable in fish tissues (Ariese *et al.* 1993, Di Giulio *et al.* 1995). Although the induction of the MFO system is considered a general biomarker of exposure, it is not specific, so the determination of bile PAH metabolites as fluorescent aromatic compounds has been applied as a biomarker of exposure to both pyrogenic and petrogenic PAHs (Krahn *et al.* 1986, Lin *et al.* 1994, Aas *et al.* 2000).

Depending on the chemical structure and level of exposure, PAHs and their metabolites have the capacity to produce toxic, mutagenic, and/or carcinogenic effects in fish and other vertebrates, including humans (MacRae and Hall 1998, Monteiro *et al.* 2000), and for this reason, the increase in the levels of PAH contamination in aquatic systems that has occurred over the

encuentra en el ambiente acuático debido a fuentes tanto petrogénicas como pirogénicas, y se ha comprobado su efecto tóxico en varias especies marinas (Albers 2003). El PHE es el menor PAH tricíclico con una región “bay” y una “K”, regiones que son altamente reactivas donde se pueden formar las principales especies carcinogénicas (Correia *et al.* 2007), y por esta razón es comúnmente utilizado como un sustrato modelo en estudios sobre el metabolismo de los PAHs carcinogénicos.

El nitrito (NO_2^-) es muy reactivo y es producido de manera natural principalmente por procesos biológicos como la desnitrificación y la nitrificación dominada por la oxidación del amoníaco (NH_3). Aunque el NO_2^- es un compuesto natural, su presencia en el ambiente es un problema potencial y existen muchos registros de sus efectos tóxicos en animales (Jensen 2003). Por lo general resulta menos tóxico en el agua de mar que en agua dulce debido a la alta concentración de cloruro y al gradiente osmótico opuesto en los peces; sin embargo, debido a la gran densidad de peces que se suele manejar en los cultivos marinos intensivos con recirculación de agua, los niveles de NO_2^- pueden llegar a ser altamente tóxicos (Doblender y Lackner 1996, Jensen 2003). La fauna acuática puede estar en riesgo de intoxicación por NO_2^- ya que cuando éste se encuentra disuelto en el agua puede ser absorbido por el epitelio branquial y el intestino, y acumularse en concentraciones muy altas en los fluidos corporales. El NO_2^- ejerce su toxicidad al reducir la capacidad de la sangre para transportar oxígeno y también se asocia con la inhibición de la fase I de la biotransformación (mediada por el citocromo P450) en peces (Arillo *et al.* 1984). Además, las concentraciones ambientales reales del NO_2^- pueden afectar la dinámica de las reacciones metabólicas de conjugación en los peces expuestos (Gonzalez *et al.* 2000), y en la tilapia *Oreochromis mossambicus*, el NO_2^- aumenta la toxicidad del PHE, incrementando la formación de metabolitos carcinogénicos (Shailaja y Rodrigues 2003).

Varios estudios han demostrado que la inducción del sistema oxidasa de función mixta (MFO) dependiente del citocromo P450 es un marcador biológico de exposición a contaminantes orgánicos antropogénicos como los PAHs, los policlorobifenilos (PCBs), los pesticidas organoclorados, las dioxinas y los furanos (Eggens *et al.* 1996, Gagnon y Holdway 2002, Ferreira *et al.* 2004, 2006). Los metabolitos de la fase I quedan disponibles para su conjugación en la fase II con glutatión, glucurónido o sulfato, causando una reducción en la reactividad y un incremento en la excreción (Van der Oost *et al.* 2003). Al igual que los demás vertebrados, los peces tienen un sistema MFO bien desarrollado que rápidamente puede metabolizar los PAHs precursores en productos hidrofílicos que son excretados con mayor facilidad. En consecuencia, usualmente sólo es posible detectar concentraciones menores de los compuestos precursores en los tejidos de peces (Ariese *et al.* 1993, Di Giulio *et al.* 1995). Aunque la inducción del sistema MFO es considerada un biomarcador de exposición general, no es específico, por lo que la determinación de los metabolitos de PAHs en la bilis en forma de compuestos aromáticos fluorescentes ha sido usada como biomarcador de

last decades is a cause for concern (Weber and Janz 2001). The distress over PAHs is that many have been shown to be carcinogenic to humans (Harvey 1991), and a high incidence of tumours, especially in liver, has been reported in several species of fish collected from areas contaminated with these chemicals (Murchelano and Wolke 1985, Bauman *et al.* 1987, Myers *et al.* 1991). The micronucleus test detects micronuclei resulting from either chromosomal breakage during cell division or chromosome loss events during anaphase. In fish, this test has been shown to be a useful *in vivo* technique for genotoxicity testing and to have a potential for *in situ* monitoring of water quality (Kim and Hyun 2006).

Sea bass is an important cultured species, with a high potential in intensive culture systems where increased levels of NO_2^- and PAHs, including PHE, can occur, since they are usually present in coastal waters. In tilapia, the association of these two compounds was found to increase the production of carcinogenic nitro-metabolites (Shailaja and Rodrigues 2003, Shailaja *et al.* 2006). Our main objective was to compare the response of sea bass when exposed to both compounds, by evaluating several biomarkers of exposure, namely the levels of PHE-type metabolites in bile, liver enzyme activities of ethoxyresorufin O-deethylase and glutathione S-transferase, and the micronucleus test.

Material and methods

Test animals

The experiment was carried out using sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., obtained from a local fish farm in the north of Portugal. The fish were kept until the start of the experiment in large tanks with running water and transferred to the test aquaria three days before the start of the exposures. During the experimental period fish were kept in 200-L aquaria in aerated water and were not fed.

Experiment

The experiment consisted in exposing the animals to PHE with or without the presence of NO_2^- (10 μM). Sea bass, weighing 63.2 ± 16.4 g and measuring 19.1 ± 1.5 cm, were injected intra-peritoneally with 10 mg kg^{-1} of PHE in peanut oil, with or without the simultaneous addition of an aqueous solution of sodium nitrite (final concentration, 10 μM of NO_2^-) to the test tank. In addition, two other test groups received an intra-peritoneal injection of peanut oil (VEH), and were maintained with or without the presence of 10 μM of NO_2^- in water. A fifth group of sea bass (CTR), free of any exposure, was kept to control possible alterations due to manipulation. Animals were sacrificed after 1, 3, and 6 days of exposure. During the exposure period fish were kept under natural photoperiod, with water temperature of $18.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and salinity of 20.1 ± 0.01 .

At days 1, 3, and 6, sea bass were anesthetized in ice-cold water before sampling. Blood was collected from the caudal vein for analysis of micronuclei. Bile was collected from the

exposición tanto a PAHs pirogénicos como a petrogénicos (Krahn *et al.* 1986, Lin *et al.* 1994, Aas *et al.* 2000).

Dependiendo de la estructura química y el nivel de exposición, los PAHs y sus metabolitos pueden causar efectos tóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos en peces y otros vertebrados, incluyendo el ser humano (MacRae y Hall 1998, Monteiro *et al.* 2000), y es por esto que resulta preocupante el incremento registrado en los niveles de contaminación por PAHs en algunos sistemas acuáticos durante las últimas décadas (Weber y Janz 2001). Se ha demostrado que varios PAHs son carcinogénicos para el ser humano (Harvey 1991), y se ha observado una gran incidencia de tumores, especialmente en el hígado, en varias especies de peces recolectados de zonas contaminadas por estos químicos (Murchelano y Wolke 1985, Bauman *et al.* 1987, Myers *et al.* 1991). La prueba de micronúcleos detecta estas estructuras que resultan ya sea de la ruptura de cromosomas durante la división celular o de la pérdida de cromosomas durante la anafase. En algunos peces esta prueba ha resultado ser una técnica *in vivo* útil para ensayos de genotoxicidad y para el potencial monitoreo *in situ* de la calidad del agua (Kim y Hyun 2006).

El róbalo es una especie acuacultural importante, con un alto potencial para sistemas de cultivo intensivo donde pueden presentarse niveles elevados de NO_2^- y PAHs, incluyendo PHE, ya que normalmente estos sistemas se localizan en aguas costeras. En la tilapia se ha encontrado que la asociación de estos dos compuestos aumentó la producción de metabolitos nitrogenados (Shailaja y Rodrigues 2003, Shailaja *et al.* 2006). El objetivo principal de este trabajo fue comparar la respuesta del róbalo expuesto a ambos compuestos, mediante la evaluación de varios biomarcadores de exposición: los niveles de metabolitos del PHE en la bilis, la actividad enzimática hepática de la etoxiresorufina O-deetilasa así como la glutatión S-transferasa, y la prueba de micronúcleos.

Materiales y métodos

Animales experimentales

El experimento se llevó a cabo con especímenes del róbalo *Dicentrarchus labrax* L., obtenidos de una granja local en el norte de Portugal. Antes de iniciar el experimento los peces se mantuvieron en tanques grandes con agua corriente, transfiriéndose a los tanques experimentales tres días antes de iniciar las exposiciones. Durante el periodo experimental los peces se mantuvieron en tanques de 200 L con agua aireada y sin alimentación.

Experimento

El experimento consistió en exponer a los animales al PHE en presencia o ausencia de NO_2^- (10 μM). Los especímenes de róbalo, de 63.2 ± 16.4 g de peso y 19.1 ± 1.5 cm de largo, fueron inyectados intraperitonealmente con 10 mg kg^{-1} de PHE en aceite de cacahuate, agregando o sin agregar simultáneamente una solución acuosa de nitrito de sodio (concentración

gallbladder with a 1-mL syringe and stored at -80°C until analysis of fluorescent aromatic compounds. Livers were excised, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis. The hepatic somatic index was calculated as percentage of body weight and condition factor was calculated as follows: $\text{weight} \times \text{length}^{-3} \times 100$.

Biochemical analysis

Livers were homogenized (1:10, w:v) in ice-cold sodium phosphate buffer 50 mM, Na_2EDTA 0.1 mM, pH 7.8, and centrifuged at 15,000 g for 20 min, at 4°C , for the enzymatic assays. Glutathione S-transferase (GST) was determined according to the method of Habig *et al.* (1974), adapted to microplate as described by Ferreira *et al.* (2006) using glutathione (GSH) 10 mM in phosphate buffer 0.1 M, pH 6.5, and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 60 mM in ethanol prepared just before the assay. The reaction mixture consisted of phosphate buffer, GSH solution, and CDNB solution in a proportion of 4.95 mL phosphate buffer:0.9 mL GSH:0.15 mL CDNB. In the microplate, 0.2 mL of the reaction mixture was added to 0.1 mL of the diluted sample (25–50 μg of protein), with a final concentration of 1 mM GSH and 1 mM CDNB in the assay. The GST activity was measured immediately every 20 sec, at 340 nm, during the first 5 min, and calculated in the period of linear change in absorbance. Liver GST activity is expressed in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$.

Liver ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity was measured according to Ferreira *et al.* (2004). Briefly, liver was homogenized in ice-cold buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M KCl). Microsomes were obtained by centrifugation of the 9,000 g supernatant at 36,000 g for 90 min in a SIGMA 3K30 centrifuge. The pellet was then resuspended in buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM NaEDTA, pH 7.4, 1 mM dithiothreitol, 20% v/v glycerol) and spun down at 36,000 g for 120 min (Fent and Bucheli 1994). Microsomes were suspended in EDTA-free resuspension buffer and stored at -80°C until use. Microsomal suspension (50 μL) was incubated with ethoxyresorufin 0.5 μM for 1 min, and the enzymatic reaction was initiated by the addition of 45 μM NADPH. EROD activity was measured for 5 min at $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$, and determined by comparison to a resorufin standard curve. Hepatic EROD activity is expressed in $\text{pmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$.

Phenanthrene-type metabolites in the bile were determined through fixed wavelength fluorescence (FF) (Ferreira *et al.* 2006). Briefly, 5 μL of bile diluted in 5 mL of ethanol 48% were used for FF determination at the excitation/emission wavelength pair 260/380 nm, which is specific for PHE (Krahn *et al.* 1993). Measurements were performed on a BIOTEK SFM25 fluorimeter. The FF values were expressed as arbitrary fluorescence units (a.f.u.) after deducting the signal levels of the solvent. The bile pigment biliverdin was measured at 380 nm in all samples to estimate bile density. PHE metabolite fluorescence was normalized to biliverdin. Biliverdin was used

final, 10 μM de NO_2^-) al tanque experimental. Otros dos grupos experimentales fueron inyectados intraperitoneal con aceite de cacahuete (VEH), y se mantuvieron en agua con o sin 10 μM de NO_2^- . Un quinto grupo (CTR), libre de cualquier exposición, se utilizó para llevar un control de posibles alteraciones debidas a la manipulación. Los animales fueron sacrificados después de 1, 3 y 6 días de exposición. Durante el periodo experimental los peces se mantuvieron con un fotoperiodo natural, con una temperatura del agua de $18.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ y salinidad de 20.1 ± 0.01 .

A los días 1, 3 y 6 de exposición, los especímenes fueron anestesiados en agua helada antes de obtener las muestras. Se recolectó sangre de la vena caudal para el análisis de micronúcleos. Se extrajo bilis de la vesícula biliar con una jeringa de 1 mL y se almacenó a -80°C hasta el análisis de componentes aromáticos fluorescentes. Los hígados se extirparon, pesaron, congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta su análisis. Se calculó el índice hepatosomático como el porcentaje de peso corporal, y el factor de condición se calculó de la siguiente forma: $\text{peso} \times \text{longitud}^{-3} \times 100$.

Análisis bioquímico

Los hígados se homogeneizaron (1:10, p:v) en tampón de fosfato de sodio helado 50 mM, Na_2EDTA 0.1 mM, pH 7.8, y se centrifugaron a 15,000 g durante 20 min a 4°C para los ensayos enzimáticos. La glutatión S-transferasa (GST) se determinó por el método de Habig *et al.* (1974), adaptado para microplaca según Ferreira *et al.* (2006), usando glutatión (GSH) 10 mM en tampón de fosfato 0.1 M, pH 6.5, y 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 60 mM en etanol preparado justo antes del ensayo. La mezcla de reacción consistió de tampón de fosfato, solución GSH y solución CDNB, en una proporción de 4.95 mL de tampón de fosfato:0.9 mL de GSH:0.15 mL de CDNB. En la microplaca se adicionó 0.2 mL de mezcla de reacción a 0.1 mL de muestra diluida (25–50 μg de proteína), llegando a una concentración final 1 mM de GSH y 1 mM de CDNB en el ensayo. La actividad de GST se midió inmediatamente cada 20 seg, a 340 nm, durante los primeros 5 min, calculándose en el periodo de cambio lineal de absorbancia. La actividad hepática de GST se expresa en $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

La actividad hepática de la etoxiresorufina O-deetilasa (EROD) fue medida de acuerdo con Ferreira *et al.* (2004). Brevemente, se homogeneizó el hígado en tampón helado (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, KCl 0.15 M). Los microsomas se obtuvieron mediante centrifugación de los 9,000 g de sobrenadante a 36,000 g por 90 min en una centrífuga SIGMA 3K30. Se resuspendió la muestra en tampón (Tris-HCl 50 mM, NaEDTA 1 mM, pH 7.4, ditiotretitol 1 mM, glicerol al 20% v/v) y se centrifugó a 36,000 g durante 120 min (Fent y Bucheli 1994). Los microsomas se suspendieron en tampón de resuspensión libre de EDTA y se almacenaron a -80°C hasta ser utilizados. La suspensión microsomal (50 μL) fue incubada con etoxiresorufina (0.5 μM) por 1 min, y se inició la reacción

as control, namely to check if differences in fluorescence intensity could result from differences in bile densities (Ferreira *et al.* 2006).

Micronucleus test

Two blood smear slides were prepared for each fish and fixed in methanol for 10 min and stained with Giemsa 5% in 3 mM phosphate buffer for 30 min. All slides were observed under a light microscope and the presence of micronuclei was recorded in a total of 1000 erythrocytes per slide.

Statistical analysis

To evaluate manipulation effect the treated groups (VEH, VEH+NO₂⁻, PHE, and PHE+NO₂⁻) were compared with the untreated group (CTR) using a two-way ANOVA with a multiple comparison test (least significant difference, LSD) at a 5% significance level.

Differences between treated groups were tested using a MANOVA with a multiple comparison test (LSD) at a 5% significance level. Three factors were analyzed: exposure time, and PHE and NO₂⁻ treatments. Some data had to be log-transformed in order to fit ANOVA assumptions. All tests were performed using the Statistica 6.0 software (Statsoft, Inc., 2001).

Results

The hepatic somatic index gradually decreased with the exposure time while the condition factor remained unaltered (table 1).

Several biomarkers were assessed in order to evaluate the effects of PHE with or without the presence of NO₂⁻. The analysis of the manipulation effect, by comparison of the treated groups (VEH, VEH+NO₂⁻, PHE, and PHE+NO₂⁻) with the control group (CTR), revealed that only the hepatic EROD activity at day 1 was affected by the manipulation procedure, since at days 3 and 6 both VEH-injected groups presented activity values similar to the CTR group. To evaluate PHE exposure with or without the presence of NO₂⁻, comparisons were made with the respective VEH-treated groups.

Hepatic EROD activity is displayed in figure 1. Lowest EROD activity was observed in all injected groups (VEH, VEH+NO₂⁻, PHE, and PHE+NO₂⁻) on day 1 and it increased progressively towards day 6. At days 1 and 3, significant differences were seen between the PHE- and VEH-treated groups, the fish exposed to PHE showing lower levels of EROD activity. On day 6, although not statistically significant, EROD activity continued to be lower than in the VEH group. The fish treated with PHE+NO₂⁻ showed significantly lower levels of EROD activity than the VEH+NO₂⁻ group on days 1, 3, and 6. Moreover, on day 6, the PHE+NO₂⁻ group showed significantly lower levels of EROD activity than the PHE group, indicating that NO₂⁻ potentiates PHE effects in this

enzimática agregando 45 µM de NADPH. La actividad de la EROD se midió durante 5 min a $\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 585$ nm, y se determinó por comparación con una curva estándar de resorufina. La actividad hepática de la EROD se expresa en pmol min⁻¹ mg proteína⁻¹.

Se determinaron los metabolitos de tipo PHE en la bilis mediante fluorescencia de longitud de onda fija (FF) (Ferreira *et al.* 2006). Brevemente, se utilizaron 5 µL de bilis diluida en 5 mL de etanol al 48% para la determinación de FF al par de longitudes de onda excitación/emisión de 260/380 nm, el cual es específico para PHE (Krahn *et al.* 1993). Las mediciones se realizaron usando un fluorímetro BIOTEK SFM25. Los valores de FF se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (a.f.u.) después de deducir los niveles de la señal del solvente. La biliverdina (pigmento biliar) se midió a 380 nm en todas las muestras para estimar la densidad biliar. Se normalizó la fluorescencia de los metabolitos de PHE a la biliverdina, la cual fue utilizada como control para comprobar si las diferencias en la intensidad de fluorescencia podrían deberse a diferencias en las densidades biliares (Ferreira *et al.* 2006).

Prueba de micronúcleos

Se prepararon dos placas con frotis de sangre de cada animal. Se fijaron en metanol durante 10 min y se tiñeron con Giemsa al 5% en tampón de fosfato 3 mM por 30 min. Todas las placas se observaron bajo un microscopio óptico, registrándose la presencia de micronúcleos en un total de 1000 eritrocitos por placa.

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de la manipulación, se compararon los grupos tratados (VEH, VEH+NO₂⁻, PHE y PHE+NO₂⁻) con el grupo no expuesto (CTR) usando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con una prueba de comparación múltiple (mínima diferencia significativa, LSD) a un nivel de significancia de 5%.

Se probaron las diferencias entre los grupos tratados mediante un ANOVA multivariado con una prueba de comparación múltiple (LSD) a un nivel de significancia de 5%. Se analizaron tres factores: el tiempo de exposición y los tratamientos con PHE y NO₂⁻. Algunos de los datos fueron transformados logarítmicamente para ajustarse a las suposiciones del ANOVA. Todas las pruebas se realizaron con la paquetería Statistica 6.0 (Statsoft, Inc., 2001).

Resultados

El índice hepatosomático disminuyó gradualmente con el tiempo de exposición, mientras que el factor de condición permaneció igual (tabla 1).

Se evaluaron varios biomarcadores para determinar los efectos del PHE en presencia o ausencia de NO₂⁻. El análisis del efecto de manipulación, mediante la comparación de los

Table 1. Number (*N*), hepatic somatic index (HSI), and condition factor (CF) of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at days 1, 3, and 6 of exposure: control (CTR), vehicle (VEH), vehicle plus nitrite (VEH+NO₂⁻, 10 μM), phenanthrene (PHE, 10 mg kg body weight⁻¹), and phenanthrene plus nitrite (PHE+NO₂⁻, 10 μM). Values presented as mean ± SE. Significant differences (*P* < 0.05) within each group between days of exposure represented by letters.

Tabla 1. Número (*N*), índice hepatosomático (HSI) y factor de condición (CF) de róbalo (*Dicentrarchus labrax*) a los 1, 3 y 6 días de exposición: control (CTR), vehículo (VEH), vehículo más nitrito (VEH+NO₂⁻, 10 μM), fenantreno (PHE, 10 mg kg de peso corporal⁻¹) y fenantreno más nitrito (PHE+NO₂⁻, 10 μM). Los valores se presentan como medias ± EE. Las letras indican diferencias significativas (*P* < 0.05) dentro de cada grupo entre los días de exposición.

Group	Day	<i>N</i>	HSI (%)	CF
CTR	1	5	1.3 ± 0.11	0.9 ± 0.02
	3	5	1.1 ± 0.15	0.8 ± 0.02
	6	5	1.0 ± 0.12	0.9 ± 0.04
VEH	1	6	1.6 ± 0.14 ^a	0.9 ± 0.03
	3	6	1.4 ± 0.07 ^b	0.9 ± 0.02
	6	6	1.0 ± 0.09 ^c	0.9 ± 0.13
VEH+NO ₂ ⁻	1	6	1.4 ± 0.08	0.9 ± 0.02
	3	6	1.2 ± 0.07	0.9 ± 0.02
	6	6	1.1 ± 0.09	0.9 ± 0.01
PHE	1	6	1.6 ± 0.10 ^a	0.9 ± 0.03
	3	6	1.3 ± 0.09 ^b	0.9 ± 0.03
	6	6	1.0 ± 0.13 ^c	0.8 ± 0.02
PHE+NO ₂ ⁻	1	6	1.2 ± 0.16 ^a	0.9 ± 0.02
	3	6	1.4 ± 0.07 ^b	0.9 ± 0.01
	6	6	0.9 ± 0.16 ^c	0.9 ± 0.01

enzyme activity. NO₂⁻ alone had no effect as shown by the similar values in the VEH and VEH+NO₂⁻ groups.

The phase II biotransformation was assessed as hepatic GST activity (fig. 2). Hepatic GST showed no significant differences either with time of exposure or exposure to PHE, with or without the addition of NO₂⁻ to water.

Analyses of PHE metabolites in sea bass bile confirmed the ability of this species to metabolize this PAH (fig. 3). The higher levels of PHE metabolites were measured at day 3, followed by a significant decrease at day 6. The NO₂⁻ in water had no effect on the presence of PHE metabolites in bile.

To assess the genotoxic capacity of PHE and its metabolites, we evaluated the presence of micronuclei in sea bass erythrocytes (fig. 4). Exposure to PHE caused a significant increase in the number of micronuclei on day 3 (threefold) and day 6 (fivefold) after exposure to this PAH. Interestingly, in the presence of NO₂⁻ in the water no changes were observed in the number of micronuclei.

Discussion

This study aimed to characterize the effects of PHE administration in juvenile sea bass. Biochemical and genotoxic endpoints were assessed, namely phase I and phase II biotransformation enzyme activities (EROD and GST), the levels of

grupos tratados (VEH, VEH+NO₂⁻, PHE y PHE+NO₂⁻) con el grupo control (CTR), mostró que la actividad hepática de la EROD sólo se notó afectada por el proceso de manipulación al día 1, ya que a los 3 y 6 días ambos grupos inyectados con VEH presentaron valores de actividad similares a los del grupo CTR. Para evaluar la exposición al PHE en presencia o ausencia de NO₂⁻, se compararon los grupos respectivos tratados con VEH.

En la figura 1 se observa como la actividad hepática de la EROD fue menor en todos los grupos tratados (VEH, VEH+NO₂⁻, PHE y PHE+NO₂⁻) al día 1, incrementándose progresivamente hacia el día 6. A los días 1 y 3 se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con PHE y VEH, mostrando los peces expuestos al PHE menores niveles de esta actividad. A los 6 días, aunque no de manera estadísticamente significativa, la actividad de la EROD continuó siendo menor que en el grupo VEH. Los peces tratados con PHE+NO₂⁻ mostraron niveles significativamente menores de actividad de la EROD que el grupo VEH+NO₂⁻ a los 1, 3 y 6 días. Además, para el día 6, el grupo PHE+NO₂⁻ mostró niveles significativamente menores de actividad de la EROD que el grupo PHE, lo que indica que el NO₂⁻ aumenta los efectos del PHE en esta actividad enzimática. El NO₂⁻ por sí solo no tuvo ningún efecto, como lo muestran los valores similares en los grupos VEH y VEH+NO₂⁻.

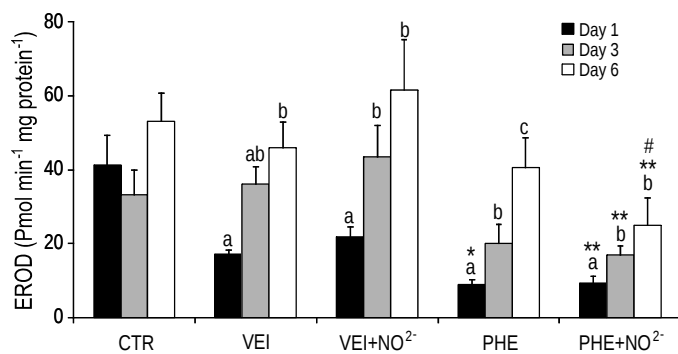


Figure 1. Hepatic EROD activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at days 1, 3, and 6 of exposure: control (CTR), vehicle (VEH), vehicle plus nitrite (VEH+NO₂⁻, 10 μM), phenanthrene (PHE, 10 mg kg body weight⁻¹), and phenanthrene plus nitrite (PHE+NO₂⁻, 10 μM). Values presented as mean ± SE. Significant differences within each group between days of exposure represented by letters: $P < 0.05$. Significant differences between the VEH and PHE groups (VEH vs PHE and VEH+NO₂⁻ vs PHE+NO₂⁻): *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Significant differences between the PHE and PHE+NO₂⁻ groups: #, $P < 0.05$.

Figura 1. Actividad hepática de la EROD en róbalo (*Dicentrarchus labrax*) después de 1, 3 y 6 días de exposición: control (CTR), vehículo (VEH), vehículo más nitrato (VEH+NO₂⁻, 10 μM), fenantreno (PHE, 10 mg kg de peso corporal⁻¹) y fenantreno más nitrato (PHE+NO₂⁻, 10 μM). Los valores se presentan como medias ± EE. Las letras indican diferencias significativas dentro de cada grupo entre los días de exposición: $P < 0.05$. Diferencias significativas entre los grupos tratados con VEH y PHE (VEH vs PHE y VEH+NO₂⁻ vs PHE+NO₂⁻): *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Diferencias significativas entre los grupos de PHE y PHE+NO₂⁻: #, $P < 0.05$.

PHE-like metabolites in bile, and the induction of micronuclei in erythrocytes. We also wanted to explore the effects of nitrite presence in water on enhancement of PHE toxicity, in a species with a high commercial value, often exposed to high levels of this compound in aquacultural conditions.

The hepatic somatic index decrease observed from day 1 to day 6 (table 1) resulted from the fact that sea bass were not fed during the experimental time; however, the condition factor values showed that starving had no effect on sea bass condition after 6 days.

The data on CYP1A (EROD) activity showed that one day after the injection of PHE or peanut oil there was a significant decrease in this enzyme activity, possibly explained as a stress response to the handling during the injection, as this inhibition was not observed in the CTR group. The data also showed that EROD activity in the VEH and VEH+NO₂⁻ groups, as the experiment progressed, tended to return to values observed in control sea bass. The same pattern was observed for PHE exposed groups, though the exposure to PHE led to a significant reduction in EROD activity, even more pronounced in the presence of NO₂⁻ in water.

PAHs are considered typical inducers of cytochrome P450-related mixed-function oxidases, in particular CYP1A, measured by EROD in fish (Willett *et al.* 1997, Clemons *et al.* 1998, Whyte *et al.* 2000, Ferreira *et al.* 2006), but on the contrary, this study showed that PHE reduced hepatic EROD

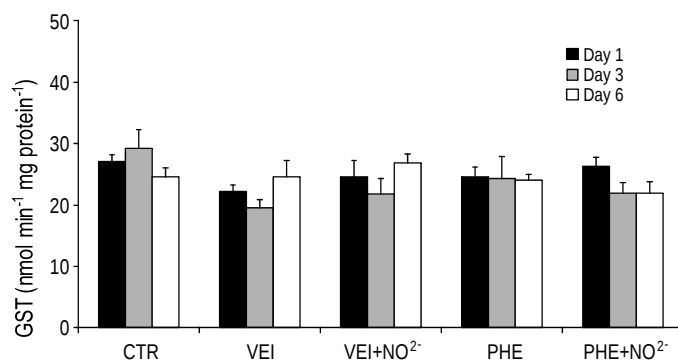


Figure 2. Hepatic glutathione S-transferase (GST) activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at days 1, 3, and 6 of exposure: control (CTR), vehicle (VEH), vehicle plus nitrite (VEH+NO₂⁻, 10 μM), phenanthrene (PHE, 10 mg kg body weight⁻¹), and phenanthrene plus nitrite (PHE+NO₂⁻, 10 μM). Values presented as mean ± SE.

Figura 2. Actividad hepática de la glutatión S-transferasa (GST) en róbalo (*Dicentrarchus labrax*) tras 1, 3 y 6 días de exposición: control (CTR), vehículo (VEH), vehículo más nitrato (VEH+NO₂⁻, 10 μM), fenantreno (PHE, 10 mg kg de peso corporal⁻¹) y fenantreno más nitrato (PHE+NO₂⁻, 10 μM). Los valores se presentan como medias ± EE.

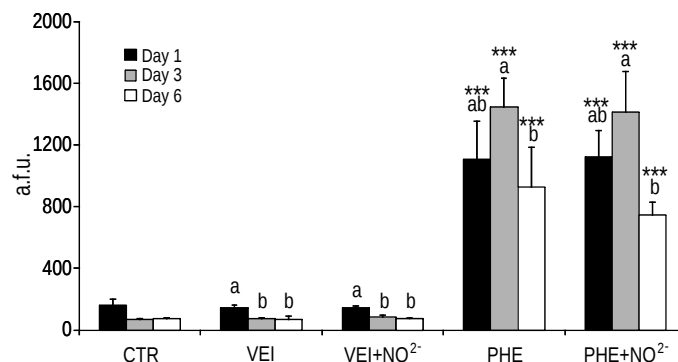


Figure 3. Phenanthrene-type metabolites in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) bile at days 1, 3, and 6 of exposure: control (CTR), vehicle (VEH), vehicle plus nitrite (VEH+NO₂⁻, 10 μM), phenanthrene (PHE, 10 mg kg body weight⁻¹), and phenanthrene plus nitrite (PHE+NO₂⁻, 10 μM). Values presented as mean ± SE (a.f.u. = arbitrary fluorescence units). Significant differences within each group between days of exposure represented by letters: $P < 0.05$. Significant differences between the VEH and PHE groups (VEH vs PHE and VEH+NO₂⁻ vs PHE+NO₂⁻): ***, $P < 0.001$.

Figura 3. Metabolitos de fenantreno en la bilis de róbalo (*Dicentrarchus labrax*) tras 1, 3 y 6 días de exposición: control (CTR), vehículo (VEH), vehículo más nitrato (VEH+NO₂⁻, 10 μM), fenantreno (PHE, 10 mg kg de peso corporal⁻¹) y fenantreno más nitrato (PHE+NO₂⁻, 10 μM). Los valores se presentan como medias ± EE (a.f.u. = unidades arbitrarias de fluorescencia). Las letras indican diferencias significativas dentro de cada grupo entre los días de exposición: $P < 0.05$. Diferencias significativas entre los grupos expuestos a VEH y PHE (VEH vs PHE y VEH+NO₂⁻ vs PHE+NO₂⁻): ***, $P < 0.001$.

Se evaluó la fase II de biotransformación como actividad hepática de GST (fig. 2). La GST hepática no mostró diferencias significativas ni con el tiempo de exposición ni con la exposición al PHE, con o sin NO₂⁻ en el agua.

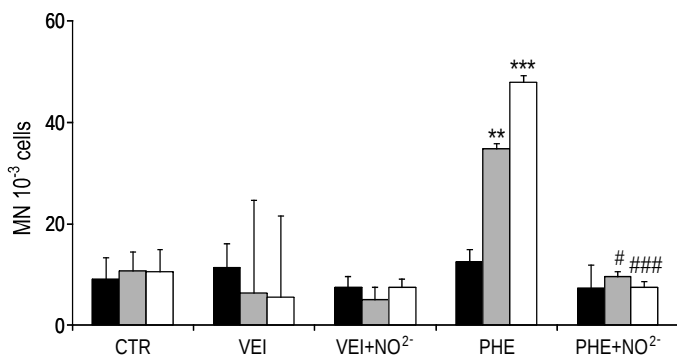


Figure 4. Number of erythrocyte micronuclei in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at days 1, 3, and 6 of exposure: control (CTR), vehicle (VEH), vehicle plus nitrite (VEH+NO₂⁻, 10 µM), phenanthrene (PHE, 10 mg kg body weight⁻¹), and phenanthrene plus nitrite (PHE+NO₂⁻, 10 µM). Values presented as mean ± SE. Significant differences between the VEH and PHE groups (VEH vs PHE and VEH+NO₂⁻ vs PHE+NO₂⁻): **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Significant differences between the PHE and PHE+NO₂⁻ groups: #, $P < 0.05$; ###, $P < 0.001$.

Figura 4. Número de micronúcleos en eritrocitos del róbalo (*Dicentrarchus labrax*) tras 1, 3 y 6 días de exposición: control (CTR), vehículo (VEH), vehículo más nitrito (VEH+NO₂⁻, 10 µM), fenantreno (PHE, 10 mg kg de peso corporal⁻¹) y fenantreno más nitrito (PHE+NO₂⁻, 10 µM). Los valores se presentan como medias ± EE. Diferencias significativas entre los grupos tratados con VEH y PHE (VEH vs PHE y VEH+NO₂⁻ vs PHE+NO₂⁻): **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Diferencias significativas entre los grupos de PHE y PHE+NO₂⁻: #, $P < 0.05$; ###, $P < 0.001$.

activity in juvenile sea bass. In a previous study with tilapia (*Oreochromis mossambicus*), an increase in liver EROD activity was noted in the presence of PHE, which was enhanced by co-exposure to NO₂⁻ (Shailaja and D'Silva 2003). In comparative *in vitro* studies concerning the metabolism of three PAHs (benzo(a)pyrene, chrysene, and PHE) in freshwater brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) liver microsomes (Pangrekar *et al.* 1995, 2003), the results suggested that microsomes present a high degree of stereoselectivity in the metabolic conversion of these PAHs to their corresponding diols, and that chrysene and PHE were metabolized by more than one cytochrome P450 isozyme, presumably with different stereoselectivities. Likewise, in human microsomes PHE was shown to be a potent inhibitor of CYP1A (EROD) activity (Shimada *et al.* 1998). However, large variations in the induction of EROD activity between tropical and temperate fishes (e.g., Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*) have been reported (Pathiratne and George 1996). A more recent *in vivo* study with juvenile sea bream (*Sparus aurata*) also reported that high concentrations of PHE in water significantly reduced EROD activity (Correia *et al.* 2007), suggesting that PHE is not a strong cytochrome P450 inducer, in comparison to commonly used model PAH inducers (benzo(a)pyrene, β-naphthoflavone). The decrease in EROD activity can also be explained by the co-occurrence of several CYP1A inducers or the generation of metabolic products that can interfere with the integrity of the enzyme causing its

El análisis de los metabolitos de PHE en la bilis de róbalo confirmó la capacidad de esta especie para metabolizar este PAH (fig. 3). Los mayores niveles de metabolitos del PHE fueron medidos al día 3, decreciendo significativamente al día 6. El NO₂⁻ en el agua no tuvo ningún efecto sobre la presencia de metabolitos de PHE en la bilis.

Para determinar la capacidad genotóxica del PHE y sus metabolitos se evaluó la presencia de micronúcleos en los eritrocitos de róbalo (fig. 4). La exposición al PHE causó un aumento significativo en el número de micronúcleos a los 3 y 6 días (tres veces y cinco veces más, respectivamente) de exposición a este PAH. Es interesante notar que con la presencia de NO₂⁻ en el agua no se observaron cambios en el número de micronúcleos.

Discusión

El objetivo de este estudio fue caracterizar los efectos de la administración de PHE en juveniles de róbalo. Se evaluaron las siguientes respuestas bioquímicas y genotóxicas: las actividades enzimáticas en las fases I y II de biotransformación (EROD y GST), los niveles de metabolitos de PHE en la bilis, y la inducción de micronúcleos en los eritrocitos. También se evaluaron los efectos de la presencia de NO₂⁻ en el agua sobre el aumento en la toxicidad del PHE en una especie de alto valor comercial frecuentemente expuesta a niveles elevados de este compuesto en condiciones de cultivo.

El decremento en el índice hepatosomático observado del día 1 al día 6 del experimento (tabla 1) se debió a que los peces no fueron alimentados durante el mismo; sin embargo, los valores del factor de condición mostraron que la inanición no tuvo ningún efecto sobre la condición de los animales después de 6 días.

Los datos de actividad de CYP1A (EROD) indicaron que un día después de la inyección de PHE o aceite de cacahuate se presentó una reducción significativa en la actividad de esta enzima, lo cual se puede explicar como una respuesta de estrés a la manipulación durante la inyección ya que esta inhibición no se observó en el grupo CTR. Los datos también mostraron que, conforme progresó el experimento, la actividad de la EROD en los grupos VEH y VEH+NO₂⁻ tendió a regresar a los valores registrados para los especímenes control. Se observó el mismo patrón para los grupos tratados con PHE, aunque tal exposición resultó en una reducción significativa en la actividad de la EROD, siendo ésta más pronunciada en presencia de NO₂⁻ en el agua.

Los PAHs son considerados típicos inductores de las oxidasas de función mixta relacionadas con el citocromo P450, en particular el CYP1A, medido por la EROD en peces (Willett *et al.* 1997, Clemons *et al.* 1998, Whyte *et al.* 2000, Ferreira *et al.* 2006); no obstante, por lo contrario, en este trabajo se mostró que el PHE redujo la actividad hepática de la EROD en los juveniles de róbalo. En un estudio previo con tilapia (*Oreochromis mossambicus*) se registró un aumento en la actividad hepática de la EROD en presencia de PHE, la cual

activity depletion (Stegeman and Hahn 1994), like the production of reactive oxygen species linked to the CYP1A process (Schleizinger and Stegeman 1999). Thus, our work showed that EROD activity induction is species- and PAH-dependent. In the case of the PHE+NO₂⁻ treatment compared to that with PHE alone, a similar reduction in activity was observed (fig. 1), with a significant difference ($P < 0.05$) observed on day 6. Opposite results were obtained for tilapia (Shailaja and Rodrigues 2003), where EROD activity in the presence of NO₂⁻ was twice the activity induced by PHE alone, explained by the capacity of NO₂⁻ to oxidize PHE, thereby facilitating further oxidation of the compound by EROD. Although it has been demonstrated that the presence of NO₂⁻ in aquatic systems can be toxic to aquatic animals resulting in the formation of methaemoglobin (Hargreaves 1998, Huertas *et al.* 2002, Svobodova *et al.* 2005), it is also known that water salinity would regulate NO₂⁻ toxicity (Jensen 2003, Wang *et al.* 2006). Results of experiments studying acute toxicity of NO₂⁻ in tilapia at different salinities (Wang *et al.* 2006) demonstrated that the percentage of methaemoglobin decreased with the increase of chloride concentration in water. Our results showed that juvenile sea bass had a greater NO₂⁻ tolerance since no significant changes were observed for all the measured parameters after exposure to NO₂⁻ in water (VEH and VEH+NO₂⁻). This capacity for adapting to NO₂⁻ exposure observed in sea bass could be due to an increased ability to oxidize nitrite to nitrate, similar to the reported capability to detoxify nitrite by oxidation to nitrate in erythrocytes from rainbow trout (Doblender and Lackner 1997). This favourable characteristic possibly contributes to the success of sea bass aquaculture, where oxygen is often limited. Additionally, the results suggest that NO₂⁻ uptake and toxicity in sea bass are not as meaningful as in freshwater fish (Shailaja *et al.* 2006, Wang *et al.* 2006).

The phase II biotransformation enzyme GST did not show significant differences between the control and all the other groups (fig. 2), probably due to the short exposure period. This hypothesis is supported by the results obtained for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to PHE, ranging from 0.5 to 2 µM, where the activity of GST showed a marked elevation only after 2 and 4 weeks of exposure in liver, gills, and kidney (Jee and Kang 2005). Other studies have also found no relationship between GST and PHE excretion (Shailaja and D'Silva 2003, Jee and Kang 2005). Some PAHs can also be excreted directly as unconjugated polar metabolites in bile (via the gallbladder) (reviewed in Van der Oost *et al.* 2003), or as conjugated forms such as sulphates and glucuronides (phase II conjugation) without involvement of GST (see Watson *et al.* 2004).

Determination of PAH metabolites is particularly relevant in fish as it is the biotransformed, active metabolites that exert significant toxic, mutagenic, and carcinogenic effects (Stroomberg *et al.* 1996, Watson *et al.* 2004). PHE metabolite content in bile presented a rapid increase from the first day of exposure, followed by a slower increase on the third day and a

aumentó con la exposición simultánea a NO₂⁻ (Shailaja y D'Silva 2003). En estudios comparativos *in vitro* sobre el metabolismo de tres PAHs (benzo(a)pireno, criseno y PHE) en los microsomas hepáticos del bagre pardo (*Ameiurus nebulosus*) de agua dulce (Pangrekar *et al.* 1995, 2003), los resultados indicaron que los microsomas presentan un alto grado de estereoselectividad en la conversión metabólica de estos PAHs a sus dioles correspondientes, y que el criseno y el PHE fueron metabolizados por más de una isoenzima del citocromo P450, presuntamente con estereoselectividades diferentes. Asimismo, se encontró que el PHE fue un fuerte inhibidor de la actividad de CYP1A (EROD) en microsomas humanos (Shimada *et al.* 1998). Por otro lado, se han observado grandes variaciones en la inducción de la actividad de la EROD entre peces tropicales y de clima templado (e.g., tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, y trucha arco iris, *Onchorynchus mykiss*) (Pathiratne y George 1996). En un estudio *in vivo* reciente con juveniles de dorada (*Sparus aurata*) también se encontró que altas concentraciones de PHE en el agua redujeron significativamente la actividad de la EROD (Correia *et al.* 2007). Esto sugiere que el PHE no es un fuerte inductor del citocromo P450 en comparación con los inductores de PAHs comúnmente utilizados (benzo(a)pireno, β-naftoflavona). La reducción en la actividad de la EROD también puede ser explicada por la concurrencia de varios inductores de CYP1A o la generación de productos metabólicos que pueden interferir con la integridad de la enzima causando una reducción de su actividad (Stegeman y Hahn 1994), como la producción de especies reactivas de oxígeno asociadas con el proceso de CYP1A (Schleizinger y Stegeman 1999). Por tanto, nuestro trabajo mostró que la inducción de la actividad de la EROD depende de la especie y el PAH. En el caso del tratamiento con PHE+NO₂⁻ comparado con el tratamiento utilizando sólo PHE, se observó una reducción en actividad similar (fig. 1), con una diferencia significativa ($P < 0.05$) el día 6. Para la tilapia se obtuvieron resultados opuestos (Shailaja y Rodrigues 2003), donde la actividad de la EROD en presencia de NO₂⁻ fue dos veces la actividad inducida por el PHE solo. Esto se explica por la capacidad que tiene el NO₂⁻ para oxidar el PHE, facilitando así una mayor oxidación del compuesto por la EROD. Aunque se ha demostrado que la presencia de NO₂⁻ en sistemas acuáticos puede ser tóxica para los animales al resultar en la formación de la metahemoglobina (Hargreaves 1998, Huertas *et al.* 2002, Svobodova *et al.* 2005), también se sabe que la salinidad del agua puede regular la toxicidad del NO₂⁻ (Jensen 2003, Wang *et al.* 2006). Los resultados de experimentos sobre toxicidad aguda del NO₂⁻ en tilapia a diferentes salinidades (Wang *et al.* 2006) indicaron que el porcentaje de metahemoglobina disminuyó conforme aumentó la concentración de cloruro en el agua. Nuestros resultados muestran que los juveniles de róbalo presentan una mayor tolerancia al NO₂⁻ ya que no se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros medidos después de la exposición a NO₂⁻ en el agua (VEH y VEH+NO₂⁻). Esta capacidad de adaptación a la

decline by day six. Identical to what was observed for the activity of CYP1A, the exposure to PHE+NO₂⁻ did not affect the content of bile metabolites when compared with the exposure to PHE alone. Despite the lower EROD activity in PHE-exposed groups, this PAH is still being metabolized, as shown by the PHE metabolite content in bile. These results also suggest that other CYP isozymes could be involved in this metabolism. The CYP isozymes known to metabolize PHE in humans are CYP 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1, and 3A4 (Sai *et al.* 2000); thus, any one of these, or more than one, could be responsible for PHE metabolism in sea bass. The results of this study do not allow us to state which other CYP isoenzymes could be responsible for PHE metabolism in juvenile sea bass, but only to draw a hypothesis.

The micronucleus test has been used as a tool for determining genotoxic responses in different animal groups including fish (Carrasco *et al.* 1990, Pacheco and Santos 1997, 1998). Micronuclei are only present in dividing cells, providing a convenient and reliable index of chromosomal breakage and chromosomal loss (Fenech 2000). In the present study, the genotoxicity was significantly increased in fish exposed to PHE from day 3 to day 6. These genotoxic properties are commonly associated with biotransformation, especially carried out by cytochrome P450 monooxygenases, with the concomitant generation of reactive metabolites frequently more toxic than the parent compounds.

The induction of micronuclei in erythrocytes, after exposure to PHE in water, has been described previously in mullet (*Liza aurata*) without an evident dose-dependent response (Oliveira *et al.* 2007). Although, in a previous work with tilapia at a salinity of 15, it has been shown that PHE and NO₂⁻ co-exposure leads to the formation of mutagenic nitrophenanthrene metabolites after EROD induction (Shailaja *et al.* 2006). In sea bass we observed a significant decrease in this enzyme activity after exposure to the same combination of contaminants and the absence of mutagenic effects in the animals exposed to PHE+NO₂⁻. The absence of genotoxic effects in the presence of NO₂⁻ could be due to the fact that EROD activity was lower, or that in the presence of NO₂⁻ other metabolites with less genotoxic properties are formed.

With this research we intended to analyze, in an intensively cultured species, like sea bass, if the presence of high levels of NO₂⁻ increased PHE toxicity as demonstrated for tilapia. However, the results of this study indicate that in juvenile sea bass the presence of NO₂⁻ did not increase PHE genotoxicity, and also that CYP isoenzymes, in addition to CYP1A, could also be responsible for PHE metabolism, leading to the formation of less toxic metabolites.

Acknowledgements

This study formed part of the Indo-Portuguese Cooperation Programme in Science and Technology (GRICES, Portugal/Department of Science and Technology, India). The authors (CD and MSS) thank the director of NIO for his support. The

exposición a NO₂⁻ presentada por el róbalo puede deberse a una mayor capacidad de oxidar nitrito a nitrato, de forma similar a la capacidad de la trucha arco iris de detoxificar nitrito, mediante oxidación, a nitrato en sus eritrocitos (Doblender y Lackner 1997). Esta ventaja posiblemente contribuye al éxito de la acuicultura del róbalo, en la que frecuentemente el oxígeno es limitado. Además, los resultados sugieren que la captación y la toxicidad del NO₂⁻ en el róbalo no son tan significativas como en los peces de agua dulce (Shailaja *et al.* 2006, Wang *et al.* 2006).

La enzima de biotransformación de la fase II, GST, no mostró diferencias significativas entre el grupo CTR y los demás grupos (fig. 2) probablemente debido al corto tiempo de exposición. Esta hipótesis es apoyada por los resultados obtenidos para el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) expuesto a PHE (de 0.5 a 2 µM), donde la actividad de la GST mostró un marcado incremento en el hígado, las branquias y el riñón sólo después de 2 y 4 semanas de exposición (Jee y Kang 2005). En otros estudios tampoco se ha encontrado una relación entre la excreción de PHE y la GST (Shailaja y D'Silva 2003, Jee y Kang 2005). Algunos PAHs también pueden ser excretados directamente como metabolitos polares no conjugados en la bilis (vía la vesícula biliar) (revisión en Van der Oost *et al.* 2003), o como formas conjugadas tales como sulfatos y glucurónidos (conjugación fase II) sin estar involucrada la GST (ver Watson *et al.* 2004).

La determinación de los metabolitos de PAHs es particularmente relevante en los peces ya que son los metabolitos biotransformados y activos los que causan efectos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos significativos (Stroomborg *et al.* 1996, Watson *et al.* 2004). El contenido de metabolitos de PHE en la bilis presentó un incremento rápido el primer día de tratamiento, seguido por un incremento más lento al tercer día y una reducción al sexto día. Igual a lo observado para la actividad de CYP1A, la exposición a PHE+NO₂⁻ no afectó el contenido de metabolitos biliares al compararse con el tratamiento con sólo PHE. A pesar de la menor actividad de la EROD en los grupos expuestos al PHE, este PAH continúa siendo metabolizado, como lo muestra el contenido de metabolitos de PHE en la bilis. Estos resultados también sugieren que otras isoenzimas de CYP podrían estar involucradas en tal metabolismo. Se sabe que las isoenzimas de CYP 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1 y 3A4 metabolizan el PHE en el ser humano (Sai *et al.* 2000); por tanto, cualquiera de ellas, o más de una, pudiera ser responsable del metabolismo del PHE en el róbalo. Los resultados de este estudio no permiten afirmar cuáles otras isoenzimas de CYP podrían ser las responsables de la metabolización del PHE en los juveniles de róbalo, sino sólo es posible plantear una hipótesis.

La prueba de micronúcleos ha sido utilizada como una herramienta para la determinación de respuestas genotóxicas en diferentes grupos de animales, incluyendo a los peces (Carrasco *et al.* 1990, Pacheco y Santos 1997, 1998). Sólo es posible encontrar micronúcleos en células que se dividen, por lo que éstos proporcionan un índice útil y confiable de la

Portuguese team would like to acknowledge H Santos and C Rosa for their technical assistance.

References

- Aas E, Baussant T, Balk L, Liewenborg B, Andersen OK. 2000. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: A laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat. Toxicol.* 51: 241–258.
- Albers PH. 2003. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns J (eds.), *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, New York, pp. 1–32.
- Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH, Hofstraat JW. 1993. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat. Toxicol.* 26: 273–286.
- Arillo A, Gaiio E, Margiocco C, Mensi P, Schenone G. 1984. Biochemical and ultrastructural effects of nitrite in rainbow trout: Liver hypoxia as the root of the acute toxicity mechanism. *Environ. Res.* 34: 135–154.
- Bauman PC, Smith WD, Parland WK. 1987. Tumour frequencies and contaminant concentrations in brown bullheads from an industrialized river and a recreational lake. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116: 76–86.
- Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS. 1990. An assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 2123–2136.
- Clemons JH, Allan LM, Marvin CH, Wu Z, McCarry BE, Bryant DW, Zacharewski TR. 1998. Evidence of estrogen- and TCDD-like activities in crude and fractionated extracts of PM10 air particulate material using *in vitro* gene expression assays. *Environ. Sci. Technol.* 32: 1853–1860.
- Correia AD, Gonçalves R, Scholze M, Ferreira M, Reis-Henriques MA. 2007. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 347: 109–122.
- Di Giulio RT, Behar JV, Carlson DB, Hasspieler BM, Watson DE. 1995. Determinants of species susceptibility to oxidative stress: A comparison of channel catfish and brown bullhead. *Mar. Environ. Res.* 39: 175–179.
- Doblender C, Lackner R. 1996. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1289: 270–274.
- Doblender C, Lackner R. 1997. Oxidation of nitrite to nitrate in isolated erythrocytes: A possible mechanism for adaptation to environmental nitrite. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 157–161.
- Eggers ML, Opperhuizen A, Boon JP. 1996. Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea. *Chemosphere* 33: 1579–1596.
- Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res./Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 455: 81–95.
- Fent K, Bucheli TD. 1994. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins *in vitro* in freshwater fish. *Aquat. Toxicol.* 28: 107–126.
- Ferreira M, Antunes P, Gil O, Vale C, Reis-Henriques MA. 2004. Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro Estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* 69: 347–357.
- Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA. 2006. The effect of long-term depuration on phase I and phase II biotransformation
- ruptura y pérdida de cromosomas (Fenech 2000). En este estudio se observó un incremento significativo de la genotoxicidad en los peces expuestos al PHE del día 3 al 6. Estas propiedades genotóxicas comúnmente se asocian con la biotransformación, especialmente desarrolladas por monooxigenasas del citocromo P450, con la generación concomitante de metabolitos reactivos frecuentemente más tóxicos que los compuestos precursores.
- Ya ha sido descrita la inducción de micronúcleos en eritrocitos de lisa (*Liza aurata*) tras su exposición a PHE en agua, sin una respuesta dependiente de la dosis (Oliveira *et al.* 2007); sin embargo, en un trabajo con tilapia a una salinidad de 15, se encontró que una exposición al PHE junto con NO₂⁻ indujo la formación de metabolitos mutagénicos de nitrofenantreno después de la inducción por la EROD (Shailaja *et al.* 2006). En los especímenes de róbalo se observó una reducción significativa en la actividad de esta enzima después de su exposición a la misma combinación de contaminantes, así como ausencia de efectos mutagénicos en los animales expuestos a PHE+NO₂⁻. La ausencia de efectos genotóxicos en presencia de NO₂⁻ puede deberse al hecho de que la actividad de la EROD fue menor, o a que en presencia de NO₂⁻ se forman otros metabolitos con propiedades menos genotóxicas.
- En este estudio se analizó si la presencia de niveles altos de NO₂⁻ incrementa la toxicidad del PHE en una especie cultivada intensivamente, en este caso el róbalo, como se ha demostrado para la tilapia. Los resultados indicaron que la presencia de NO₂⁻ no incrementó la genotoxicidad del PHE en juveniles de róbalo, y que las isoenzimas de CYP, además de la CYP1A, también pueden ser responsables del metabolismo del PHE, resultando en la formación de metabolitos menos tóxicos.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó como parte del Programa Indo-Portugués de Cooperación en Ciencia y Tecnología (GRICES, Portugal/Departamento de Ciencia y Tecnología, India). Los autores (CD y MSS) agradecen al director del NIO su apoyo. El equipo portugués reconoce el apoyo técnico de H Santos y C Rosa.

Traducido al español por Christine Harris.

- in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to pollutants in River Douro estuary, Portugal. *Mar. Environ. Res.* 61: 326–338.
- Gagnon MM, Holdway DA. 2002. EROD activity, serum SDH and PAH biliary metabolites in sand flathead (*Platycephalus bassensis*) collected in Port Phillip Bay, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 230–237.
- Gonzalez JF, Del Valle PL, Thohan S, Kane AS. 2000. Effects of waterborne nitrite on phase I-II biotransformation in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Mar. Environ. Res.* 50: 29–32.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S- Transferases: First enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130–7139.
- Hargreaves JA. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166: 181–212.

- Harvey RG. 1991. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Huertas M, Gisbert E, Rodriguez A, Cardona L, Williot P, Castello-Orvay F. 2002. Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: Median-lethal concentration (LC50) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues. *Aquat. Toxicol.* 57: 257–266.
- Jee JH, Kang JC. 2005. Biochemical changes of enzymatic defence system after phenanthrene exposure in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Physiol. Res.* 54: 585–591.
- Jensen FB. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135: 9–24.
- Kim IY, Hyun CK. 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64: 288–297.
- Krahn MM, Kittle JJJ, MacLeod JWD. 1986. Evidence for exposure of fish to oil spilled into the Columbia River. *Mar. Environ. Res.* 20: 291–298.
- Krahn MM, Ylitalo GM, Buzitis J, Bolton JL, Wigren CA, Chan S-L, Varanasi U. 1993. Analyses for petroleum-related contaminants in marine fish and sediments following the Gulf oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* 27: 285–292.
- Lin E, Cormier SM, Racine RN. 1994. Synchronous fluorimetric measurement of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in bile of brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 707–715.
- MacRae JD, Hall KJ. 1998. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in marine sediment under denitrifying conditions. *Water Sci. Technol.* 38: 177–185.
- Monteiro PRR, Reis-Henriques MA, Coimbra J. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit *in vitro* ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.* 48: 549–559.
- Murchelano RA, Wolke RE. 1985. Epizootic carcinoma in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Science* 228: 587–589.
- Myers MS, Landhal JT, Krahn MM, McCain BB. 1991. Relationship between hepatic neoplasm and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the West Coast. *Environ. Health Perspect.* 90: 7–15.
- Oliveira M, Pacheco M, Santos MA. 2007. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene. *Chemosphere* 66: 1284–1291.
- Pacheco M, Santos MA. 1997. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38: 252–259.
- Pacheco M, Santos MA. 1998. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40: 71–76.
- Pangrekar J, Kandaswami C, Kole P, Kumar S, Sikka HC. 1995. Comparative metabolism of benzo(a)pyrene, chrysene and phenanthrene by brown bullhead liver microsomes. *Mar. Environ. Res.* 39: 51–55.
- Pangrekar J, Kole PL, Honey SA, Kumar S, Sikka HC. 2003. Metabolism of phenanthrene by brown bullhead liver microsomes. *Aquat. Toxicol.* 64: 407–418.
- Pathiratne A, George S. 1996. Comparison of xenobiotic metabolizing enzymes of tilapia with those of other fish species and interspecies relationships between gene families. *Mar. Environ. Res.* 42: 293–296.
- Sai Y, Dai R, Yang TJ, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Shou M. 2000. Assessment of specificity of eight chemical inhibitors using cDNA-expressed cytochromes P450. *Xenobiotica* 30: 327–343.
- Schleizinger JJ, Stegeman JJ. 1999. Oxidative inactivation of cytochrome P450 1A (CYP1A) stimulated by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl: Production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As. *Mol. Pharmacol.* 56: 588–597.
- Shailaja MS, D'Silva C. 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53: 835–841.
- Shailaja MS, Rodrigues A. 2003. Nitrite-induced enhancement of toxicity of phenanthrene in fish and its implications for coastal waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 56: 1107–1110.
- Shailaja MS, Rajamanickam R, Wahidulla S. 2006. Increased formation of carcinogenic PAH metabolites in fish promoted by nitrite. *Environ. Pollut.* 143: 174–177.
- Shimada T, Yamazaki H, Foroozesh M, Hopkins NE, Alworth WL, Guengerich FP. 1998. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 1048–1056.
- Stegeman JJ, Hahn ME. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: Current perspective on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Mallins DC, Ostrander GK (eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemistry and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, pp. 87–206.
- Stroomborg GJ, Reuther C, Kozin I, van Brummelen TC, van Gestel CAM, Gooijer C, Cofino WP. 1996. Formation of pyrene metabolites by the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Chemosphere* 33: 1905–1914.
- Svobodova Z, Machova J, Drastichova J, Groch L, Luskova V, Poleszczuk G, Velisek J, Kroupova H. 2005. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. *Aquacult. Res.* 36: 1177–1184.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57–149.
- Wang YB, Zhang WJ, Li WF, Xu ZR. 2006. Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. *Fish Physiol. Biochem.* 32: 49–54.
- Watson GM, Andersen OK, Galloway TS, Depledge MH. 2004. Rapid assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in decapod crustacean by fluorimetric analysis of urine and haemolymph. *Aquat. Toxicol.* 67: 127–142.
- Weber LP, Janz DM. 2001. Effect of [beta]-naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. *Aquat. Toxicol.* 54: 39–50.
- Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30: 347–570.
- Willett KL, McDonald SJ, Steinberg MA, Beatty KB, Kennicutt MC, Safe SH. 1997. Biomarker sensitivity for polynuclear aromatic hydrocarbon contamination in two marine fish species collected in Galveston Bay, Texas. *Environ Toxicol. Chem.* 16: 1472–1479.

Recibido junio de 2008;
aceptado en diciembre de 2008.