

## Respuesta antioxidante de *Artemia franciscana* al nitroprusiato sódico (SNP)

### Antioxidant response of *Artemia franciscana* to sodium nitroprusside (SNP)

Miguel Torres Rodríguez<sup>1</sup> , Álvaro Nogué Palenzuela<sup>2</sup>, Cristina Elena Trenzado Romero<sup>3</sup> , Eva Rufino-Palomares<sup>4</sup> , Amalia Pérez Jiménez<sup>4</sup> 

<sup>1</sup> Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (IATS-CSIC), 12595 Ribera de Cabanes (Castellón), España.

<sup>2</sup> Dpto. Zoología; <sup>3</sup> Dpto. Biología Celular; <sup>4</sup> Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I. Universidad de Granada. Campus Fuentenueva s/n (Granada). España.

**Correspondencia:** Miguel Torres Rodríguez, **E-mail:** [miguel.torres.rodriguez@csic.es](mailto:miguel.torres.rodriguez@csic.es);  
[migueltorres307@hotmail.com](mailto:migueltorres307@hotmail.com)

Artículo original | Original article

#### Palabras clave

Invertebrados acuáticos  
Ecotoxicología  
Compuestos cianógenos

#### Keywords

Aquatic invertebrates  
Ecotoxicology  
Cyanogenic compounds

**RESUMEN** | De entre todos los contaminantes emergentes, los fármacos suscitan un gran interés científico. El nitroprusiato sódico (SNP), es uno de los cianógenos más utilizados como vasodilatador para el tratamiento de afecciones cardíacas. Debido a su uso generalizado y a la posible contaminación de los ambientes acuáticos asociado a la mala gestión de los residuos farmacológicos, es importante llevar a cabo estudios ecotoxicológicos que ayuden a aclarar su efecto en poblaciones de especies bioindicadoras como es el caso de invertebrados acuáticos. En base a esto, el objetivo del presente ensayo fue evaluar la toxicidad del SNP en el invertebrado acuático *Artemia franciscana*. Para tal fin, nauplios de *Artemia franciscana* fueron sometidos a diferentes concentraciones de SNP (0-3000 µg/mL) durante 24 horas, determinándose los valores de LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>80</sub>. Para determinar la respuesta antioxidante y detoxificadora de dichos organismos frente al SNP, se cuantificó la actividad de diferentes enzimas implicadas en dicho proceso: Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), Glutación peroxidasa (GPX), Glutación reductasa (GR), Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), Glutación S-transferasa (GST), DT-diaforasa (DTD), así como los niveles de peroxidación lipídica a través del Malondialdehído (MDA) y la actividad antioxidante total (TEAC). Los resultados obtenidos indican la existencia de una correlación positiva entre las distintas concentraciones de SNP empleadas y la actividad de las enzimas GPX, GR, G6PDH y GST, así como para TEAC, lo cual se ha relacionado con un aumento en la capacidad antioxidante y detoxificadora de xenobióticos en dichos organismos frente al SNP. Sin embargo, no se han observado diferencias para SOD, CAT y DTD, así como en los niveles de peroxidación lipídica. Esto podría ser indicativo de que la administración de SNP produce la inactivación de dichas enzimas y evidencia el efecto dependiente del tiempo que presenta el SNP en la peroxidación lipídica en nauplios de *Artemia franciscana*.

**ABSTRACT** | Among emerging pollutants, the pharma drugs focus a great research interest. Sodium Nitroprusside (SNP) is one of the cyanogens most used as a vasodilator for the treatment of cardiac problems. Due to the increasing expansion and the putative contamination of aquatic environments causes by the mismanagement of pharmacological waste, it is important to carry out ecotoxicological assays to clarify its effect on populations of aquatic invertebrates, which act as bioindicators. Thus, the aim of this study was to evaluate the toxicity of the SNP in the invertebrate *Artemia franciscana*. So, *Artemia franciscana* nauplii were subjected to different concentrations of SNP (0-3000 µg/mL) for 24 hours, determining the values of LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub> and LC<sub>80</sub>. To determine the antioxidant and detoxifying response of these organisms against to SNP, the activity of different enzymes involved in this process: Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione reductase (GR), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), Glutathione S-transferase (GST), DT-Diaphorase (DTD) was quantified, and the levels of lipid peroxidation, (Malondialdehyde (MDA) and total enzyme antioxidant activity (TEAC). The results denoted the existence of a positive correlation between the dose of SNP used and the activity of the enzymes GPX, GR, GST and G6PDH, as well as TEAC, which has been linked to an increase in antioxidant and detoxifying ability of xenobiotic compounds in such organism against the SNP. However, no significant differences were observed for SOD, CAT and DTD enzymes response, as well as in the levels of lipid peroxidation. This is indicative that the SNP exposure produces the inactivation of these enzymes, showing the time-dependent effect that SNP present in the peroxidation lipid in *Artemia franciscana* nauplii.

## INTRODUCCIÓN

En el medio ambiente existen muchas fuentes de estrés (agentes bióticos y abióticos) que alteran el desarrollo normal de los organismos vivos. El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio de la homeostasis celular debido a un aumento significativo en la concentración extra- e intra-celular de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS) (Torres *et al.*, 2003). Este aumento de ROS/RNS va acompañado de una pérdida de la capacidad antioxidante, produciendo alteraciones estructurales y funcionales en ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Pisoschi y Pop., 2015) que causan daño a nivel celular y tisular (Elejalde-Guerra, 2001; Prigol *et al.*, 2009). El metabolismo oxidativo de las células es una fuente continua de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos pueden formarse a través de diferentes mecanismos, siendo altamente tóxicos, incluso causando la muerte celular (Huerta *et al.*, 2005; Pérez, 2008). Para protegerse de estos agentes altamente reactivos, los seres vivos han desarrollado un complejo sistema de protección antioxidante basado en la producción de moléculas antioxidantes de origen enzimático y no enzimático (Elejalde-Guerra, 2001, Huerta *et al.*, 2005).

Entre los antioxidantes enzimáticos más importantes están: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) (Torres *et al.*, 2003), Glutatión peroxidasa (GPX), Glutatión reductasa (GR), Glutatión S-transferasa (GST) (Pérez, 2008), Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PH) que actúa protegiendo a la célula indirectamente del estrés oxidativo (Wajcman y Galactéros, 2004) y DT-diaforasa (DTD) también conocida como NAD (P) H: quinona oxidoreductasa o NQO1 tiene como función principal la detoxificación de los componentes del ciclo redox (Chen *et al.*, 2000).

Entre los principales daños causados por el estrés oxidativo se encuentran los producidos en los lípidos. Este proceso se conoce como peroxidación lipídica y consiste en la degradación oxidativa que sufren los lípidos como resultado de una serie de reacciones que conducen a la formación de un radical lipídico, liberando Malondialdehído (MDA) como producto final de su degradación. De esta forma, existe una relación directamente proporcional entre la concentración de MDA y la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados oxidados, siendo un buen indicador del daño causado por la peroxidación lipídica (Gill *et al.*, 2015).

El SNP ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ ) es uno de los cianógenos más ampliamente utilizados como vasodilatador para el tratamiento de insuficiencia cardíaca y problemas de hipertensión (Hottinger *et al.*, 2014). Se sabe que el tratamiento con SNP da lugar al desarrollo de estrés nitrosativo y oxidativo en diferentes organismos (Bayliak *et al.*, 2015; Lozinsky *et al.*, 2012). Esto es debido a su capacidad para producir cianuro de hierro, NO y ROS, siendo estos subproductos los responsables de su citotoxicidad (Sani *et al.*, 2014).

En términos legislativos, se trata de un producto descrito como tóxico por inhalación e ingestión, tanto para la salud humana como para el medio ambiente, por la “Directiva General de Clasificación de Sustancias de la UE”, Dir 67/548/CE. Sin embargo, aunque existen diversos estudios donde se asocia la administración de SNP con neurotoxicidad y apoptosis celular tanto en humanos (Li, *et al.*, 2013; Zhang y Zhao, 2003) como en otros mamíferos terrestres (Kaku, *et al.*, 2001; Kaehler *et al.*, 1991, Prigol, *et al.*, 2009), existe muy poca información ecotoxicológica del SNP como contaminante en ambientes acuáticos. Así, se ignora hasta el momento los efectos citotóxicos y su efecto sobre el estado oxidativo de los organismos acuáticos.

Esta falta de estudios, unido a su uso continuado durante varias décadas como compuesto activo en fármacos destinados a tratar dolencias cardíacas (Friederich y Butterworth, 1995) y a la mejorable gestión de los residuos farmacológicos existente en los diferentes países en vías de desarrollo (Barceló y López, 2008), promueve el interés en el estudio ecotoxicológico del SNP en un ambiente tan sensible como es el medio acuático. En base a ello, el propósito de esta investigación consiste en determinar el efecto tóxico y la influencia del SNP sobre el estado oxidativo de los invertebrados acuáticos, tomando como referencia nauplios del crustáceo *Artemia franciscana*. La elección de *A. franciscana* como organismo de estudio se debe principalmente a su fácil control y su uso generalizado en investigaciones toxicológicas (Libralato, 2014; Nunes *et al.*, 2006; Peiqiang y Sijun, 2020; Sorgeloos *et al.*, 1978). Además, este organismo es un

elemento clave de la cadena trófica durante la cría larvaria de organismos acuáticos destinados a la acuicultura (Dhont *et al.* 2013, González y Aportela, 2001).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Eclosión de *Artemia franciscana*

La eclosión de quistes de *A. franciscana* (INVE Aquaculture Inc.) se llevó a cabo bajo condiciones de laboratorio (agua de clorada, 30‰ NaCl, 28°C, oxígeno a saturación) durante 24 horas (Sorgeloos *et al.*, 1977; Van Stappen, 1996).

Debido a la diferente sensibilidad a los tóxicos presentada por el género *Artemia* en función de su estado de desarrollo y para evitar posibles influencias en los resultados como consecuencia de una alimentación exógena, o bien por un estado de ayuno generado por el consumo de los nutrientes endógenos, se decidió emplear nauplios de *Artemia* recién eclosionados (Estado I) con el objetivo de controlar la mayor parte de parámetros del ensayo y permitir una mayor homogeneidad de las muestras (Sorgeloos, *et al.*, 1978).

### Toxicidad del SNP: Determinación de los valores de concentración letal (LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>80</sub>)

Una vez eclosionados los quistes de *A. franciscana*, se introdujeron 20 nauplios por pocillo en placas de 24 pocillos con diferentes dosis de SNP (0-3000 µg/mL), por triplicado, durante 24 horas de incubación. Para ello, se partió de una disolución madre (9000 µg/mL) donde 63 mg de SNP puro se disolvieron en 7,2 mL de agua salina. Una vez obtenida la disolución madre, se colocó un determinado volumen de disolución por pocillo en función de la concentración final deseada, completando con agua salina hasta alcanzar un volumen de 0,5 mL por pocillo (Tabla 1), el cuál se completó con agua salina hasta llegar a un volumen final de 1,5 mL (Nikinmaa, M., 2014).

**Tabla 1.** Concentraciones y volúmenes ensayados durante el estudio de la toxicidad para el SNP en nauplios de *A. franciscana*.

Concentración final de SNP (µg/mL)	Volumen de disolución madre (µL)	H <sub>2</sub> O salina (µL)
0	0	500
25	4,16	495,84
50	8,33	491,67
75	12,5	487,5
150	25	475
250	41,66	458
300	50	450
350	58,33	442
400	66,66	433
450	75	425
500	83,33	417
600	100	400
700	116,66	383
1000	166,66	333
2000	333,33	167
3000	500	0

Transcurrido ese tiempo, se observó el comportamiento de los individuos y se contabilizó la mortalidad, determinando los valores de LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>80</sub>, de acuerdo con la siguiente fórmula: % de supervivencia ( $A_0 - A_T$ )/ $A_0 \times 100$ , donde  $A_0$  es el número de nauplios supervivientes en la muestra de control (100 % de supervivencia) y  $A_T$  es la supervivencia de nauplios tratados con cada concentración ensayada de SNP. El análisis computarizado de los datos fue realizado por OriginPro 8 (OriginLab Corporation, USA), mediante el cual se realizó un ajuste de tipo dosis-respuesta empleando la siguiente fórmula general:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(LOGx0 - x)p}}$$

Donde  $LOGx0$  es el centro de la curva,  $p$  la pendiente,  $A_1$  la asíntota inferior y  $A_2$  la asíntota superior en el ajuste. Los errores se calcularon como error estándar de la media a partir de un  $n=3$ . Los valores obtenidos en la curva dosis-respuesta permitieron realizar el cálculo de la concentración de SNP capaz de disminuir la supervivencia en un 20 %, 50 % y 80 % ( $LC_{20}$ ,  $LC_{50}$  y  $LC_{80}$ ) tras 24 horas de tratamiento.

### Obtención de muestras biológicas

Tras la eclosión y separación de los nauplios de *A. franciscana*, estos se sembraron a una densidad de 0,3 g/mL en recipientes de plástico expuestos a diferentes concentraciones de SNP durante 24 horas. Las concentraciones de SNP utilizadas fueron 390  $\mu\text{g/mL}$  ( $LC_{50}$ ), 195  $\mu\text{g/mL}$  ( $LC_{50/2}$ ), 97,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $LC_{50/4}$ ), 48,75  $\mu\text{g/mL}$  ( $LC_{50/8}$ ) y un control sin SNP. El tamaño de las muestras fue de 6 réplicas ( $n=6$ ). Posteriormente, la biomasa de nauplios de *A. franciscana* expuestos al SNP se almacenó a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior análisis.

### Preparación de extractos citosólicos

Las muestras biológicas se homogeneizaron, en 9 volúmenes de tampón Tris-HCl 100 mM, EDTA (Ácido etilendiaminotetracético) 0,1 M y Tritón X-100 0,1 % (p/v), pH 7,8. Para ello se empleó un homogeneizador manual Potter, manteniéndolo siempre en hielo. Tras su homogenización se pasó a la centrifugación de las diferentes muestras (30000 g, 30',  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , Beckman L8-70M), recuperando el sobrenadante resultante y almacenado a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , hasta su uso posterior para las determinaciones enzimáticas y análisis de peroxidación lipídica.

### Determinación de actividades enzimáticas

Todos los ensayos se realizaron a  $25 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$  utilizando un espectrofotómetro de microplacas Podwer WaveX (Bio-Tek Instruments, EE.UU.) en placas de 96 pocillos.

#### Actividad Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se determinó según el método de McCord y Fridovich (1969). Éste se basa en el cambio de absorbancia a 550 nm de la mezcla reacción, provocado por la inhibición del proceso de reducción del Citocromo *c* en presencia de SOD. La mezcla reacción consistió en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, xantina 0,6 mM, citocromo *c* 0,5 mM, xantina oxidasa comercial (XOD) 1UI/mL. La actividad fue expresada como unidades de SOD por miligramo de proteína (U/mg proteína). Una unidad de actividad SOD fue definida como la cantidad de enzima requerida para inhibir la tasa de reducción de citocromo C un 50 % (McCord y Fridovich, 1969).

#### Actividad Catalasa (CAT)

La actividad de catalasa se determinó midiendo la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno a 240 nm según Aebi (1984). La mezcla de reacción consistió en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  10,5 mM. La actividad se expresó como unidades de CAT por miligramo de proteína (U/mg de proteína). Se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima requerida para transformar un  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en las condiciones analíticas descritas.

#### Actividad Glutatión peroxidasa (GPX)

Para determinar la actividad de glutatión peroxidasa se utilizó el método de Flohé y Günzler (1984). Este método se basa en la medida indirecta de la actividad mediante la lectura a 340 nm del decremento en la absorbancia producido por la oxidación del NADPH, utilizado para regenerar el glutatión reducido

(GSH) a partir del glutatión oxidado (GSSG) obtenido por la acción de la glutatión peroxidasa. La mezcla de reacción consistió en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,1), azida sódica 15,5 mM, EDTA 3,9 mM, GSH 25,8 mM, NADPH 1,5 mM, GR 9,7 UI/mL, hidroperóxido de cumeno 1 mM. La actividad específica de la enzima GPX fue expresada en miliunidades/ mg de proteína (mU/mg proteína).

#### Actividad Glutatión reductasa (GR)

La actividad glutatión reductasa se determinó por el método modificado de Carlberg y Mannervik (1975). Éste consiste en la lectura a 340 nm del descenso de la absorbancia producido por la oxidación del NADPH utilizado por la GR, en el paso de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). La mezcla de reactivos fue la siguiente: tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, NADPH 0,7 mM, GSSG 3,25 mM. La actividad específica del enzima glutatión reductasa fue expresada en mU/mg de proteína.

#### Actividad Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

La actividad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se midió según una modificación del método establecido por Löhr y Waller (1960). En ella se mide el incremento de densidad óptica a 340 nm provocada por la formación de NADPH. La mezcla reacción consistió en tampón Imidazol 71,4 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 100 mM, NADP<sup>+</sup> 20 mM, HCO<sub>3</sub>Na 119 mM, glucosa 6-fosfato (G6P) 10 mM. La actividad específica de la enzima fue expresada en mU/mg de proteína.

#### Actividad Glutatión S- transferasa (GST)

La actividad glutatión S- transferasa se midió según la técnica de Frasco y Guilhermino (2002), basada en el método de Habig (1974) adaptado a microplaca. En ella se midió el incremento de densidad óptica a 340 nm provocada por la formación de un conjugado formado por glutatión y CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno) por mediación de la enzima glutatión S-transferasa. La mezcla de reactivos consistió en: tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 6,5), GSH 10 mM, CDNB 60 mM. La actividad GST se expresó en mU/mg de proteína.

#### Actividad DT-diaforasa (DTD)

La actividad DT-diaforasa se midió según el método establecido por Lemaire *et al.* (1996). Éste se basa en la variación de la absorbancia medida a 600 nm como consecuencia de la disminución de la quinona reductasa (QR2). El cóctel reacción contenía: Tris-HCl 50 mM (pH 7,3), NADH 5 mM, DCPIP (2,6-diclorofenol indofenol) 0,42 mM, albúmina 0,147 %. La actividad DTD se expresó en mU/mg proteína.

### Indicadores de estrés oxidativo

#### Peroxidación lipídica

Para la valoración del grado de peroxidación lipídica, empleamos el método de Buege y Aust (1978). La concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se expresó como concentración de malondialdehído (MDA) (nmol/mL de extracto).

#### Actividad antioxidante total (TEAC)

La actividad antioxidante total (TEAC) se midió según el método establecido por Erel (2004). La actividad antioxidante se refiere a la equivalente a un análogo hidrosoluble de la vitamina E (Trolox) que se toma como patrón. Para ello utilizamos 10 µL de muestra concentrada + 200 µL de reactivo 1 (tampón acetato 0,4 M, pH 5,8), medimos su absorbancia y dejamos reposar durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añaden 10 µL de reactivo 2 (tampón acetato 30 mM, pH 3,6) y se vuelve a medir su absorbancia. Realizada la medición y obtenidos los valores de absorbancia para las diferentes muestras (Abs R2-Abs R1)

obtenemos el valor final de concentración basándonos en la curva patrón, calculando la capacidad antioxidante total (TEAC) expresada como  $\mu\text{moles}$  de equivalentes de Trolox por litro.

### Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se midió por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino para la realización de la curva patrón estándar.

### Análisis estadístico

Todos los valores fueron expresados como la media  $\pm$  SEM (Error Estándar de la Media) ( $n=6$ ). Tras confirmar la homogeneidad de las varianzas, se realizó una ANOVA de una vía. Cuando el análisis de varianza confirmó la existencia de diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) debido a las dosis de SNP empleadas, se aplicó el test *post-hoc Tukey's HSD*.

## RESULTADOS

### Toxicidad del SNP en nauplios de *A. franciscana*

La evaluación de la toxicidad del SNP se determinó mediante la curva concentración-respuesta ajustada a los resultados de supervivencia para las concentraciones ensayadas (Figura 1). Los resultados mostraron dificultades para la natación a partir de  $50 \mu\text{g/mL}$  de SNP, observándose una mortalidad del 100 % a partir de  $2000 \mu\text{g/mL}$  de SNP. Los valores de concentración letal fueron:  $\text{LC}_{20}$ :  $139,71 \mu\text{g/mL}$ ;  $\text{LC}_{50}$ :  $390,12 \mu\text{g/mL}$ ;  $\text{LC}_{80}$ :  $779,49 \mu\text{g/mL}$ .

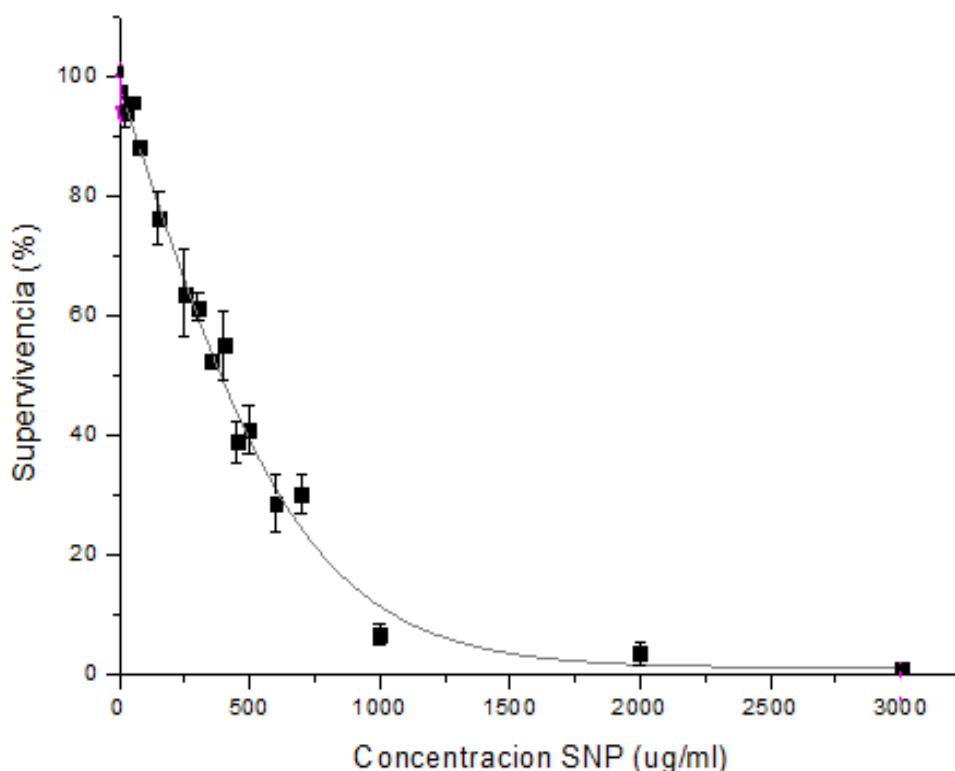


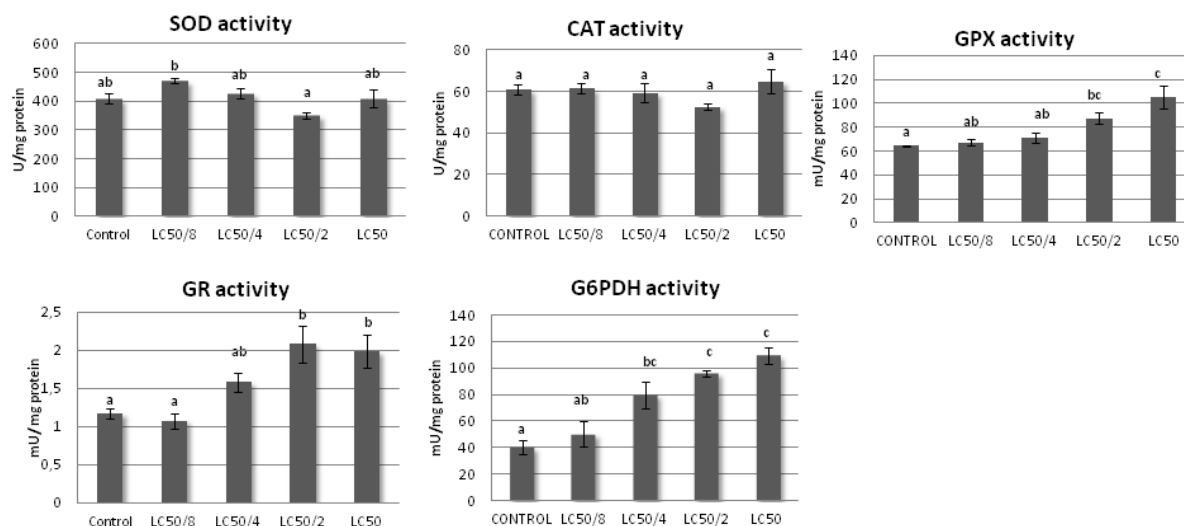
Figura 1. Curva dosis respuesta del SNP sobre la tasa de supervivencia en nauplios de *A. franciscana* ( $n=3$ ).

### Actividad de las enzimas antioxidantes en nauplios de *Artemia franciscana* frente al SNP.

Los resultados para las enzimas antioxidantes aparecen reflejados en la figura 2. Con respecto a la actividad de SOD podemos observar diferencias entre los distintos tratamientos con SNP. Sin embargo, no

se pone de manifiesto una correlación entre la concentración de SNP y el incremento de la actividad SOD. Los niveles más altos y bajos de actividad SOD se observaron en los tratamientos LC<sub>50/8</sub> y LC<sub>50/2</sub>, respectivamente. Así, solo se observan diferencias significativas únicamente entre ambos tratamientos. Con respecto a la actividad de la catalasa no se observan diferencias significativas como consecuencia del tratamiento con SNP en los nauplios de *Artemia franciscana* (Figura 2).

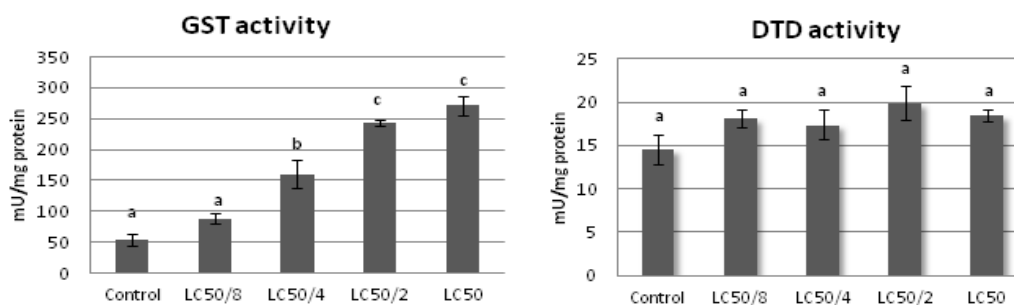
Los resultados obtenidos para la actividad de GPX ponen de manifiesto la existencia de una correlación entre la concentración de SNP y el incremento de la actividad de dicha enzima. De esta forma, los niveles máximos de actividad correspondieron a la máxima concentración de SNP (LC<sub>50</sub>) (Figura 2). Con respecto a la actividad GR, no se observan diferencias significativas entre control y la dosis más baja utilizada (LC<sub>50/8</sub>). Sin embargo, a partir de la dosis LC<sub>50/4</sub>, la actividad GR se vio incrementada, mostrándose los valores más altos a las dosis de LC<sub>50/2</sub> y LC<sub>50</sub>. La actividad observada para la G6PDH parece aumentar al incrementar la concentración de SNP. La actividad más alta se observa a la máxima concentración de SNP (LC<sub>50</sub>). Sin embargo, no existen diferencias significativas con respecto a las concentraciones LC<sub>50/4</sub> y LC<sub>50/2</sub>. (Figura 2)



**Figura 2.** Efecto de la concentración de SNP sobre la actividad SOD, CAT, GPX, GR y G6PDH en nauplios de *A. franciscana*. Los valores corresponden a la media ± SEM (n=6). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre grupos experimentales ( $P < 0,05$ ).

**Actividad detoxificadora en nauplios de *Artemia franciscana* frente al SNP**

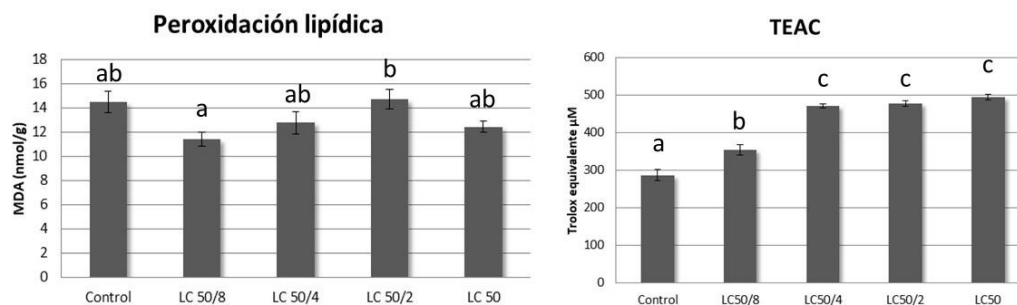
Con relación a la actividad GST (Figura 3) se pone de manifiesto una correlación entre la concentración de SNP y el incremento de la actividad de esta enzima. La única concentración que no induce cambios significativos con respecto al control es LC<sub>50/8</sub>. Para el resto de concentraciones si se produce un incremento de la actividad GST, alcanzándose los máximos valores de actividad a las dosis LC<sub>50/2</sub> y LC<sub>50</sub>. En el caso de la DTD (Figura 3), no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos con SNP.



**Figura 3.** Efecto de la concentración de SNP sobre la actividad GST y DTD en nauplios de *A. franciscana*. Los valores corresponden a la media ± SEM (n=6). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre grupos experimentales ( $P < 0,05$ ).

## Indicadores de daño oxidativo en nauplios de *Artemia franciscana* frente al SNP

Los resultados obtenidos en la determinación de la peroxidación lipídica (Figura 4) en las diferentes muestras ponen de manifiesto la ausencia de una correlación entre la concentración de SNP y los niveles de peroxidación lipídica. En el caso TEAC existe un aumento progresivo de la actividad hasta llegar a LC<sub>50/4</sub> donde la actividad se estabiliza sin ofrecer diferencias significativas entre LC<sub>50/8</sub> y LC<sub>50</sub>, observándose una diferencia de actividad del 72,4 % entre el control y LC<sub>50</sub>.



**Figura 4.** Efecto de la concentración de SNP sobre los niveles de peroxidación lipídica y actividad antioxidante total (TEAC) en nauplios de *A. franciscana*. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM (n=6). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre grupos experimentales ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

El SNP forma parte de los compuestos precursores de óxido nítrico, asociando su administración con procesos de estrés oxidativo y nitrosativo (Bayliak *et al.*, 2015) debido a su capacidad para producir cianuro de hierro, NO y especies reactivas de oxígeno, siendo estos compuestos responsables de la toxicidad (Sani *et al.*, 2014). El cianuro producido por el SNP se transforma rápidamente en tiocianato (Nostro *et al.*, 2015). La toxicidad del tiocianato en peces y crustáceos parece estar relacionada con la sustitución de los iones cloruro en las branquias y la perturbación del equilibrio iónico, derivando en problemas respiratorios que pueden causar la muerte del individuo (Epstein *et al.*, 1973; Bhunia *et al.*, 2000). El NO es un agente tóxico que actúa como radical libre, de manera que al aumentar su concentración favorece las reacciones de oxidación (Nazari *et al.*, 2012) y la generación de daños en el ADN celular que pueden llevar a la muerte de los nauplios de *Artemia* (Fernández *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el efecto tóxico que presenta el SNP en *Artemia franciscana*, ofreciendo una LC<sub>50</sub> de 390,12  $\mu\text{g/mL}$ . El SNP penetra a través de las barreras fisiológicas provocando diferentes alteraciones en los nauplios de *Artemia* que pueden ir desde pérdida de movilidad, alteraciones de las rutas metabólicas, hasta la muerte de los individuos (González y Aportela, 2001). Según Bayliak *et al.* (2015) el SNP tiene más efectos tóxicos sobre las células y los tejidos con mayor actividad metabólica o con una alta actividad mitocondrial. Además, cabría esperar que la toxicidad del SNP en nauplios de *A. franciscana* fuese mayor que para los individuos adultos, ya que el compuesto tóxico tendría mayor facilidad para ejercer su acción a nivel celular al presentar los nauplios una barrera tisular de menor grosor (Nostro *et al.*, 2015) y una relación superficie/volumen más alta asociada a un tamaño más pequeño (Schmidt-Nielson, 1984), haciéndolos especialmente sensibles a los compuestos tóxicos. Los nauplios de *Artemia* presentan una estructura única llamada órgano del cuello o glándula de la sal encargada de la osmorregulación, lo que permite vivir en diferentes ambientes salinos. La acción de este órgano podría facilitar la entrada y absorción del SNP aumentando el efecto tóxico de este compuesto (Conte *et al.*, 1972).

Comparando la toxicidad del SNP en *A. franciscana* con relación a otros fármacos, como el ibuprofeno o la ciclosporina observamos que estos presentan unos valores más bajos de LC<sub>50</sub> (Rajabi, *et al.*, 2015). Por otro lado, estudios previos en *Artemia* ponen de manifiesto valores de LC<sub>50</sub> muy inferiores en compuestos de cianuro, revelando una alta toxicidad del SNP (Lu *et al.*, 2013). Además, existen compuestos como la atorvastatina, empleada al igual que el SNP para el tratamiento de enfermedades cardiacas, cuyo LC<sub>50</sub> es superior al del SNP, lo que revela una mayor toxicidad del mismo en *Artemia franciscana* (Rajabi, *et al.*,



2015).

Los resultados obtenidos para las principales enzimas antioxidantes no pusieron de manifiesto una clara influencia del SNP sobre la actividad de SOD y CAT. Según Ansari *et al.* (2015), SOD y CAT presentan cobre e hierro en su centro activo, respectivamente. La reacción directa de estos metales con el NO podría ser una causa de la no afectación de su actividad. El hecho de que no se observe un aumento en la actividad SOD asociada a los mayores niveles de SNP podría deberse al efecto inhibitor ejercido por dicho compuesto con independencia del metal presente en su centro activo (Misra, 1984).

La enzima SOD es la primera que actúa en la cascada antioxidante eliminando el radical superóxido. Como consecuencia de esta acción se produce peróxido de hidrógeno que sería degradado por la CAT. Esto explicaría el patrón de comportamiento similar en ambas enzimas, ya que la ausencia de una mayor producción de peróxido de hidrógeno justificaría la no existencia de cambios significativos en la actividad CAT (Ferreira *et al.*, 2007; Halliwell y Gutteridge, 2000). Por lo tanto, existe relación entre ambas actividades enzimáticas donde la actividad de CAT, en cierto modo, dependerá de la actividad SOD. Además, la enzima CAT solo actúa cuando existe una alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manera que, si no existe un aumento notable de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no se debe percibir ninguna modificación (Halliwell y Gutteridge, 2000).

Para las enzimas GPX, GR y G6PDH, podemos observar una correlación entre la concentración de SNP y el aumento progresivo de su actividad, mostrando un incremento significativo entre la muestra control y el tratamiento con LC<sub>50</sub> del 64 %, 70.6 % y 172.5 % respectivamente. Estos incrementos están posiblemente asociados con un aumento de ROS y peróxidos orgánicos como consecuencia de la acción del SNP (Nikinmaa, 2014). Esto explicaría la mayor actividad en GPX, una enzima que funciona mediante la eliminación de peróxidos orgánicos e inorgánicos, utilizando glutatión reducido (GSH) como agente reductor. Este aumento en la actividad ya se observó al tratar *Artemia* con diferentes metales tóxicos (Mohamed *et al.*, 2014). Por otro lado, la disminución en los niveles de peróxido de hidrógeno podría haber desplazado la función peroxidasa hacia la actividad GPX con una función adaptativa justificando así la ausencia de cambios en la actividad CAT (Halliwell y Gutteridge, 2000; Trenzado, 2004). Del mismo modo, la regeneración de GSH a partir de glutatión oxidado (GSSG) por parte del GR explicaría el aumento de la actividad de dicha enzima en circunstancias en donde se haya producido un gasto extra de GSH (Halliwell y Gutteridge, 2000). GR utiliza NADPH como agente reductor. En este sentido, la acción de G6PDH sería fundamental, ya que esta enzima cataliza el primer paso de la ruta de las pentosas fosfato, reduciendo NADP a NADPH, siendo esta coenzima esencial para la lucha contra el daño oxidativo (Wajcman y Galactéros, 2004). G6PDH juega un papel fundamental en el mantenimiento del estado redox intracelular y la modulación de las defensas antioxidantes mediante el control de la generación de NADPH tanto en mamíferos (Gaetani *et al.*, 1989) como en peces (Martínez *et al.*, 2005; Pérez, 2008). De esta forma, se crea una relación y una dependencia directa entre la actividad de estas enzimas (Flohé y Günzler, 1984; Ansari *et al.*, 2015). La reacción en cascada entre estas enzimas, justificaría de forma clara un patrón de comportamiento similar entre ellas, representativo de la relación directa entre el incremento de ROS por acción del SNP y la respuesta enzimática antioxidante. Así, parece lógico pensar que un aumento en la concentración de SNP, vaya asociado a un aumento en la producción de ROS, justificando así el incremento de las defensas antioxidantes.

El estudio de la función detoxificadora, representada por las enzimas GST y DTD, mostró un aumento significativo de la actividad GST proporcional al aumento de la concentración de SNP en el medio. El incremento de la actividad de esta enzima se ha relacionado con un aumento de la capacidad antioxidante y detoxificadora en los organismos. Esta es llevada a cabo mediante la formación de conjugados entre sustancias xenobióticas y el glutatión para su posterior eliminación. Esta enzima dimerica tiene una localización citosólica, donde se encarga de la eliminación de compuestos xenobióticos, y también en el retículo endoplásmico donde se encarga de la eliminación de tóxicos endógenos (Habig *et al.*, 1974). Con relación a la actividad DTD, no se observaron cambios significativos asociados al tratamiento con SNP. La DTD, también conocida como NAD(P)H: quinona oxidoreductasa o NQO1, tiene la capacidad de reducir quinonas a hidroquinonas aceptando dos electrones cedidos por el NADH o NADPH (Chen *et al.*, 2000).

Esta reacción asegura la oxidación completa del sustrato sin la formación de semiquinonas y especies con radicales de oxígeno reactivo que son perjudiciales para las células (Ross y Siegel, 2004). La ausencia de cambios significativos en la actividad de esta enzima, podría ser indicativo de que la producción de hemiquinonas no ha sido tan relevante como para promover la activación de dicha enzima (Chen *et al.*, 2000). Asimismo, en peces se puso de manifiesto que el tratamiento con B-naftoflavona da lugar a una variabilidad en la respuesta de la actividad DTD dependiente de la especie tratada. Esta actividad únicamente fue inducida en *Oncorhynchus mykiss*, no ofreciendo respuesta, o respuesta muy leve, en el resto de las especies estudiadas (*Salmo trutta*, *Perca fluviatilis*, *Cyprinus carpio*, *Myoxocephalus scorpius* (Sturve *et al.*, 2005). Esto podría ser indicativo de la variabilidad de respuesta de dicha enzima en función del organismo estudiado.

En cuanto a la valoración del daño oxidativo en lípidos, los resultados no pusieron de manifiesto un efecto claro del SNP sobre la peroxidación lipídica celular en nauplios de *Artemia franciscana*. Estudios previos llevados a cabo en membranas celulares de mamíferos revelaron un efecto similar del SNP sobre la peroxidación de los lípidos de membrana de estas células (Posser, *et al.* 2006). Por otro lado, en roedores no se puso de manifiesto de forma clara una relación de dependencia entre la administración de SNP y la aparición de daños oxidativos en lípidos (Sani, *et al.*, 2014). En el presente trabajo los resultados son indicativos de que el daño oxidativo asociado al tratamiento con SNP no fue relevante a nivel lipídico.

El estudio de la Capacidad Antioxidante Total (TEAC), puso de manifiesto un aumento progresivo de la misma asociada a la concentración de SNP. Dicho incremento se estabilizó a partir de la concentración LC<sub>50/4</sub>. Esto indica que existe un aumento de la actividad antioxidante llevada a cabo por moléculas antioxidantes hasta llegar a 48,75 µg/mL (LC<sub>50/4</sub>), donde *Artemia franciscana* podría llegar a su límite de producción de moléculas antioxidantes (Erel, 2014). Así, la medida de la TEAC contempla la acción de pequeñas moléculas antioxidantes presentes en el organismo como el ácido úrico, la vitamina C o la vitamina D.

Finalmente, a modo de conclusión, podemos afirmar que el estudio de toxicidad revela la sensibilidad de *Artemia franciscana* frente al nitroprusiato sódico (SNP), estimándose una LC<sub>50</sub> de 390,12 µg/mL, mientras que concentraciones superiores a 2000 µg/mL causan una mortalidad del 100 % tras 24 horas de exposición al compuesto. Además, el tratamiento con SNP en nauplios de *A. franciscana* durante 24 horas promovió una respuesta enzimática antioxidante manifestada por el incremento de la actividad glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH). De igual forma, tras el tratamiento con SNP durante 24 horas, se observó un aumento de la capacidad detoxificadora en nauplios de *A. franciscana* manifestado por un incremento significativo de la actividad glutatión transferasa (GST). Sin embargo, no se observó un efecto dosis-dependiente entre el SNP y los niveles de peroxidación lipídica. Esto puede ser indicativo de que el daño oxidativo no se puso de manifiesto a nivel lipídico a las concentraciones de SNP estudiadas. La capacidad antioxidante total (TEAC) en nauplios de *Artemia franciscana* aumentó en respuesta al tratamiento con SNP durante 24 horas. Dicho aumento se estabilizó a dosis de 97,5 µg/mL (LC<sub>50/4</sub>) lo que podría ser indicativo de un agotamiento en la capacidad de regeneración de moléculas antioxidantes a esta concentración. Así, en base a los resultados expuestos, podemos confirmar el efecto tóxico que presenta el SNP sobre los nauplios de *Artemia franciscana*, colocando a este compuesto como un agente contaminante con efectos letales sobre los invertebrados acuáticos a determinadas concentraciones.

### Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses.

### Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado con el apoyo de los grupos de investigación de Nutrición y Alimentación de Peces (RNM-156) y Drogas, Tóxicos Ambientales y Metabolismo Celular (BIO-157), de la Universidad de Granada.

**REFERENCIAS**

- Aebi H. (1984). Catalase “*in vitro*”. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Ansari F.A., Ali S.N, Mahmood R. (2015). Sodium nitrite induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. *Toxicology in Vitro* 29(7): 1878-1886.
- Barceló D., López M.J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel Científico-Técnico de seguimiento de la política de aguas 1, 24.
- Bayliak M.M., Shmihel H.V., Lylyk M.P., Vytvytska O.M., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. (2015). Alpha-ketoglutarate attenuates toxic effects of sodium nitroprusside and hydrogen peroxide in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40 (2): 650-659.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bhunja F., Saha N.C., Kaviraj A. (2000). Toxicity of thiocyanate to fish, plankton, worm, and aquatic ecosystem. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 64(2): 197-204?
- Buege J.A., Aust S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52: 302-310.
- Carlberg I., Mannervik B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of biological chemistry* 250(14): 5475-5480.
- Chen S., Wu K., Knox R. (2000). Structure-function studies of DT-diaphorase (NQO1) and NRH: quinone oxidoreductase (NQO2)1. *Free Radical Biology and Medicine* 29(3-4): 276-284.
- Conte F.P., Hootman S.R., Harris P.J. (1972). Neck organ of *Artemia salina* nauplii. *Journal of Comparative Physiology* 80(3): 239-246.
- Dhont J., Dierckens K., Støttrup J., Van Stappen G., Wille M., Sorgeloos P. (2013). Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. *Advances in Aquaculture Hatchery Technology* 242: 157-202.
- Elejalde-Guerra J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de medicina interna* 18 (6): 326-335.
- Epstein F.H., Maetz J., Renzis G. (1973). Active transport of chloride by the teleost gill: inhibition by thiocyanate. *American Journal of Physiology* 224: 1295-1299.
- Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry* 37: 277-285.
- Fernández A., Ribeiro J.M., Costas M.J., Pinto R.M., Canales J., Cameselle, J. (1996). Specific ADP-ribose pyrophosphatase from Artemia cysts and rat liver: effects of nitroprusside, fluoride and ionic strength. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1290(1): 121-127.
- Flohé L., Günzler W.A. (1984). Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 105: 115-121.
- Frasco M.F., Guilhermino L (2002) Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 149-156.

- Gaetani G.F., Galiano S., Canepa L., Ferraris A.M., Kirkman H.N. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood Journal* 73: 334-339.
- Gill K.K., Sandhu H.S., Kaur R. (2015). Evaluation of lipid peroxidation and antioxidant status on fenvalerate, nitrate and their co-exposure in *Bubalus bubalis*. *Pesticide biochemistry and physiology* 123: 19-23.
- González P.Y., Aportela G.P. (2001). Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Toxicología* 1(1): 104-8.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. (2000). Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: 3<sup>o</sup> ed. Oxford University Press. USA.
- Hottinger D.G., Beebe D.S., Kozhimannil T., Prielipp R.C., Belani K.G. (2014). Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* 30(4): 462-471.
- Huerta M., Ortega M.E., Cobos M., Herrera A.D.C., Guinzberg R. (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia* 30(12): 728-734.
- Kaehler, S.T.N., Singewald, C., Sinner, Philippu, A. (1999). Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Research* 835(2): 346-349.
- Kaku T., Jiang M. H., Hada J., Morimoto K., Hayashi Y. (2001). Sodium nitroprusside induced seizures and adenosine release in rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 413(2-3): 199-205.
- Libralato G. (2014). The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. *Marine Environmental Research* 101(0): 38-43.
- Lozinsky O.V., Lushchak O.V., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. (2012). Sodium nitroprusside toxicity in *Drosophila melanogaster*: delayed pupation, reduced adult emergence, and induced oxidative/nitrosative stress in eclosed flies. *Archives of insect biochemistry and physiology* 80(3): 166-185.
- Löhr G.W., Waller H.D. (1960). Glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Methods of enzymatic analysis* 2: 636-641.
- Lu Y., Xu X.L., Meng C., Zhou J.Q., Sheng J.J., Wu C.K., Xu S.W. (2013). The toxicity assay of *Artemia salina* as a biological model for the preliminary toxic evaluation of chemical pollutants. *Advanced Materials Research* 726: 230-233.
- Martínez Á., Morales R., Sanz A. (2005). Antioxidant Defenses in Fish. Biotic and Abiotic Factors. *Reviews in Fish Biology and Fisher* 15: 75-88.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 244 (22): 6049-6055.
- Misra P. (1984). Inhibition of Superoxide Dismutase by Nitroprusside and Electron Spin Resonance Observation on the Formation of a Superoxide Mediated Nitroprusside Nitrosyl Free Radical. *Journal of Biological Chemistry* 259(20): 12678-12684.

- Mohamed A.H., Sheir S.K., Osman G.Y., Abd-El Azeem H.H. (2014). Toxic effects of heavy metals pollution on biochemical activities of the adult brine shrimp, *Artemia salina*. *Canadian Journal of pure and applied sciences* 8 (3):3019-3028.
- Nazari Q.A., Mizuno K., Kume T., Takada-Takatori Y., Izumi Y., Akaike A. (2012). In Vivo Brain Oxidative Stress Model Induced by Microinjection of Nitroprusside in Mice. *Journal of Pharmacological Science* 120 (2): 105-111.
- Nikinmaa M. (2014). *An Introduction to Aquatic Toxicology*. Oxford: Oxford University Press. USA.
- Nostro P.L., Ninham B. W., Carretti E., Dei L., Baglioni P. (2015). Specific anion effects in *Artemia salina*. *Chemosphere* 135: 335-340.
- Nunes B.S., Carvalho F.D., Guilhermino L.M., Van Stappen G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution* 144(2): 453-462.
- Peiqiang Z., Sijun D. (2020). Advances in the Research on *Artemia* in Aquatic Ecotoxicology. *Asian Journal of Ecotoxicology* (4): 33-44.
- Pérez A. (2008). Respuesta nutritiva, metabólica y balance redox del dentón (*Dentex dentex*) bajo diferentes condiciones nutricionales. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Granada, España.
- Pisoschi A.M., Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97(0): 55-74.
- Posser T., Moretto M.B., Dafre A.L., Farina M., da Rocha J.B.T., Nogueira C.W., Franco J.L. (2006). Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: An in vitro evaluation. *Chemico-Biological Interactions* 164(1-2): 126-135.
- Prigol M., Bruning C.A., Nogueira C.W. (2009). Protective effect of disubstituted diaryl diselenides on cerebral oxidative damage caused by sodium nitroprusside. *Biochemical Engineering Journal* 45(2): 94-99.
- Rajabi S., Ramazani A., Hamidi M., Naji T. (2015). *Artemia* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Journal of Pharemaeutic Sciences* 23 (1): 20-26.
- Ross D., Siegel D. (2004). NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1, DT-Diaphorase), Functions and Pharmacogenetics. *Methods in Enzymology* 382: 115-144.
- Sani M., Sebai H., Ghanem-Boughanmi N., Boughattas N.A., Ben-Attia M. (2014). Dosing-time dependent oxidative effects of sodium nitroprusside in brain, kidney, and liver of mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38(2): 625-633.
- Schmidt-Nielson K. (1984). *Scaling: Why is Animal Size so Important?* Cambridge University Press. New York, USA.
- Sorgeloos P., Bossuyt E., Laviña E., Baeza M., Persoone G. (1977). Decapsulation of *Artemia* cysts: A simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture* 12(4): 311-315.
- Sorgeloos P., C. Remiche C., Persoone G. (1978). The use of *Artemia* nauplii for toxicity tests. A critical analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2(3-4): 249-255.

- Sturve J., Stephensen E., Forlin L. (2005). Effects of redox cycling compounds on DT diaphorase activity in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Hepatology* 4(1): 1-4.
- Torres E., Bustos-Jaimes I., Le Borgne S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 46(1): 1-15.
- Trenzado C. (2004). Selección parental y dieta como estrategias de atenuación del estrés crónico en la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España.
- Van Stappen G. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper* 361: 107-136.
- Wajcman H., Galactéros F. (2004). Le déficit en glucose-6 phosphate déshydrogénase: protection contre le paludisme et risque d'accidents hémolytiques. *Comptes Rendus Biologies* 327(8): 711-720.
- Zhang Y., Zhao B. (2003). Green tea polyphenols enhance sodium nitroprusside induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry* 86: 1189-1200.

Recibido: 19-05-2021

Aprobado: 06-08-2021

Versión final: 08-08-2021

