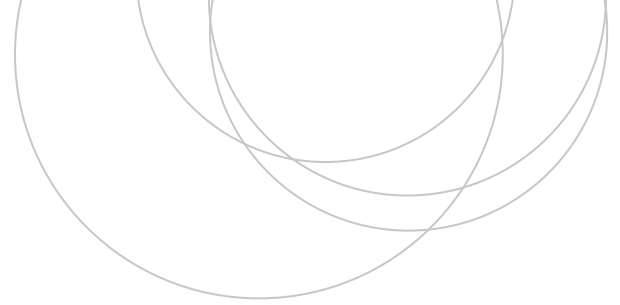




Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Amitriptilina antidepresiboarekiko esposizioa jasan duten *Sparus aurata* arrainen biomarkatzaile biokimikoen neurketa

Egilea:
Ainhoa Camille Aranaga Decori

Zuzendariak:
Esther Blanco Rayón
Urtzi Izagirre Aramaiona

© 2020, Ainhoa Camille Aranaga Decori

AURKIBIDEA

(1) SARRERA.....	2
(2) HELBURUAK ETA HIPOTESIA	4
(3) MATERIAL ETA METODOAK	5
Laginen lorpena.....	5
Entzimen aktibitatearen determinazioa.....	6
Analisi estatistikoak.....	7
(4) EMAITZAK.....	7
Kontrol eta esposizio taldeen arteko ezberdintasunak.....	7
Egun ezberdinen kontrol taldeen arteko ezberdintasunak	9
Egun ezberdinen esposizio taldeen arteko ezberdintasunak	9
Gibel eta zakatzen aktibitateen arteko ezberdintasunak	10
(5) EZTABAIDA.....	10
(6) ONDORIOAK	13
(7) BIBLIOGRAFIA	14

(1) SARRERA

Amitriptilina (AMI) depresioaren eta hantura edota neuropatia eragiten duten hainbat gaixotasunen (migraina eta fibromialgia, besteak beste) aurka asko erabiltzen den antidepresibo trizikliko (TCA) bat da (Bautista-Ferrufino et al., 2011; Moore et al., 2012). TCA honek norepinefrina zein serotonina neurotransmisoreen birxurgapenak inhibitzen ditu nerbio sistema zentraleko neurona presinaptikoen nerbio-bukaeretan, horrela garunean neurotransmisore horien kontzentrazioak handitzen dituelarik (Gillman, 2007; Maubach et al., 1999).

Beste farmako askorekin gertatzen den bezala, amitriptilinarekin metabolismoaren P450 Zitokromoak bideratzen du gizakien gibelean, eta gertatu gabe kanporatzen da (Breyer-Pfaff, 2004; Mylan, 2020) eraldatu gabe edo nortriptilina, 10-hidroxinortriptilina edota 10-hidroxiamitriptilina metabolito moduan (Calisto & Esteves, 2009). Horrela, honen hondakinak araztegiara ailegatzen dira. Hainbat ikerketek erakutsi dute hondakin-uren tratamendurako teknikak ez direla antidepresiboen garbiketarako guztiz baliagarriak, eta, ondorioz, uraren garbiketa eman arren, konposatuaren arrastoak ingurune naturaletaraino heltzen dira, ibai eta itsasoetan hauen pilaketa ematen delarik (Calisto & Esteves, 2009; Yang et al., 2014). Etengabe ingurune urtarrera ematen den TCA jariaketak arazo toxikologikoak eragin ditzake antidepresibo horien itu izan behar ez liratekeen organismoetan (Ziarrusta et al., 2016). Hain zuzen ere, Erresuma Batuko ur-gainazaletan 72 ng/L eta araztegiatan 223 ng/L-rainoko kontzentrazioak aurkitu izan dira (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011). Honetaz gain, araztegietatik irteten diren ur-hondakinekin kontaktuan dauden amuarrainen gibeletan AMIren biometaketa gaitasuna 78 aldiz handitu daitekeela ikusi da (Lajeunesse et al., 2011). Bizkaian, Gernikako araztegi inguruan 2015ean hartutako ur laginetan AMI izan zen kantitate handienean aurkitutako TCA; konkretuki, Gernikako araztegi efluentean 25,9 ng/L eta estuarioko uretan 6,5 ng/L-rainoko AMI kopuruak aurkitu ziren (Ziarrusta et al., 2016). Gainera, Gernikako *Chelon labrosus* arrainen gibelean ere AMI aurkitu zen 1,8 ng/g-tan, honek AMIk organismo urtarretan metatzeko duen gaitasuna islatzen duelarik (Ziarrusta et al., 2016). Kontzentrazio erlatiboki baxuetan agertu arren, gizakiengan efektuak izateko diseinatutako konposatuaren ingurumeneko presentziak eragin kaltegarriak izan ditzake ekosistemetan, organismo urtar zein gizakietan (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011).

Amitriptilina zelula-kultiboetan toxizitatea eragiten duela ikusi da. Hain zuzen ere, farmako honek estres oxidatzailearen emendatzea dakar, oxigenoaren espezie erreaktibo (ROS) ugariren sorrera eta zelula-barneko lipidoen peroxidazioa dakartzalako (Moreno-Fernández et al., 2008; Yang et al., 2014). Gainera, farmako honen presentziak *in vitro* kultiboetan giza-fibroblastoen galera dakarrela frogatu da (Moreno-Fernández et al., 2008), eta neurotoxizitatea indusitzen duela ere (Estebe & Myers, 2004). AMIren inguruko toxikotasun ikerketa gehienak giza edo karraskari modeloetan burutu dira, baina AMIk naturan organismo urtarretan izan dezakeen efektuari buruzko informazioa urria da. Egindako ikerketen artean, zebra arrainak (*Danio rerio*) 100 ng/L AMI-pean jartzean, eraginak ikusi dira hipotalamo-hipofisi-adrenal ardatzeko hormona mailan, sistema antioxidatzailean eta sistema immunearen erregulazioan parte har dezakeen bitartekari pro-inflamatorio batean (Yang et al., 2014). *Cyprinus carpio* espezieko arrainetan TCAk (amitriptilina, nortriptilina eta klomipramina) epe luzera hilkortasunaren handiagotzeekin, garapenaren geldotasunarekin, anormaltasun morfologikoekin eta

garun, bihotz eta giltzurrunetako eraldaketekin lotu dira (Sehonova et al., 2017). Gainera, araztegien ingurueta uretan egondako *Carassius auratus* arrain espeziean ikusitako portaera aldaketa AMI eta beste antidepressibo batzuen presentziak eragindako serotonina mailaren igoerarekin erlazionatuta dagoela uste da (Simmons et al., 2017). Beste alde batetik, AMIk doradetan aminoazido eta lipidoen metabolismoan aldaketa nabarmenak eragiten dituela ikusi da (Ziarrusta et al., 2019). Hala eta guztiz ere, AMIk naturan organismo itsastarretan eragin ditzakeen erantzun biologiko goiztiarrak ezezagunak dira oraindik.

Uretako organismoen artean, arrainak ingurune urtar gehienetan aurkitzen dira, eta funtzio ekologiko garrantzitsua betetzen dute maila trofiko baxuagoetatik altuagoetarako energia garraiatzaile moduan; ondorioz, gehienetan ingurune urtarretako analisi toxikologikoak bideratzeko organismorik aproposenak kontsideratzen dira (Huerta et al., 2012). Gainera, ur-gainazaletara ailegatzen diren farmako ugariaren itu-biologikoak arrain teleosteoetan kontserbaturik azaltzen dira (Gunnarsson et al., 2008), eta, beraz, konposatu horiek organismo urtarretan eragin ditzaketen efektuak neurtzeko aukera aproposa direla ulertzen da.

“Biomarkatzaile” kontzeptua poluitzaileek organismoetan eragiten dituzten erantzun biologiko goiztiarrei buruz hitz egiteko erabiltzen da, eta horien bidez epe luzera emango diren aldaketa kaltegarriak iragar daitezke (McCarthy & Shugart, 1990). Biomarkatzaileak ingurumen-toxikologiaren arloan biokimikoak, zelula-mailakoak edo ehun-mailakoak, eta eragin-biomarkatzaileak (kutsatzaileek eragiten duten erantzunaren berri ematen dutenak) edo esposizio-biomarkatzaileak (kutsatzaileekiko esposizioa egon den adierazten dutenak) izan daitezke (ICES, 2012; Peakall, 1994). Poluitzaileen eraginaren informazio osatuagoak lortzeko, biomarkatzaile bat baino gehiago erabiltzen da normalean; kasu honetan, azetilkolinesterasa (AChE), katalasa (CAT), superoxido dismutasa (SOD), glutationa-S-transferasa (GST), zitokromo-c oxidasa (COX) eta etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD) erabili dira. Biomarkatzaile biokimikoak soilik aztertu dira, lan hau AMIren efektuak determinatzeko ikerketa handiago baten parte delako, zeinetan jadanik AMIren biometaketa eta bioeraldaketa gaitasunak (Ziarrusta et al., 2017) eta AMIk eragindako metabolomaren eraldaketa (Ziarrusta et al., 2019) aztertu diren.

Kutsatzaile batek sor dezakeen AChE entzimaren aktibitate aldaketak, neurotoxizitate maila neurtzeko erabiltzen dira (Moreira & Guilhermino, 2005; Sakar et al., 2006). Arrainekin egindako ikerketetan, poluitzaileen presentzian ematen den AChE aktibitatearen jaitsierak garunean neurotoxizitateari loturiko estresa dagoela adierazten du (Xie et al., 2015).

Zelula guztien metabolismoan superoxido (O_2^-) eta hidrogeno peroxidoaren (H_2O_2) moduko oxigenoaren espezie erreaktiboak (ROS) sortzen dira, baina hauen eragin kaltegarriak saihesteko zelulek defentsak antioxidatzaileak dituzte, kalte eta babes artean oreka bat mantentzen delarik (Storey, 1996). CAT eta SOD funtsezko entzima antioxidatzaileak dira, eta modu koordinatuan egiten dute lan (Storey, 1996). SODEk superoxido erradikalak hidrogeno peroxidora degradatzen ditu, eta CATek, berriz, hidrogeno peroxidoa uretara (Storey, 1996; Vlahogianni et al., 2007). Poluitzaile gehienek kalte oxidatzaile eta defentsak antioxidatzaileen arteko oreka zelularra alda dezakete, horretarako gaitasun antioxidatzailea handitu edo murriztu ahal dutelarik (Storey, 1996). Hainbat kutsatzailek defentsak antioxidatzailea burutzen duten entzimen aktibitatearen

indukzioa eragiten dute baldintza pro-oxidatzaileetan. Hasieran entzimen aktibitatea igo egiten da estres oxidatzailearen aurka egiteko, baina poluitzaileekiko esposizioa luzatzean murriztapen bat ematen da, sistemak ezin baitu maila mantendu. Horrela, proteinak eta DNA moduko oinarriko biomolekulak kalte ditzakeen kalte oxidatzailea agertzen da (Bebianno et al., 2005; Vlahogianni et al., 2007). GSTak ere erredox potentzialaren mantenuan hartzen du parte, eta kutsatzaileen desintoxikazioan ere entzima garrantzitsua da (Vlahogianni et al., 2007). Honek glutation erreduzitua (GSH) eta xenobiotikoen edo zelulako osagai oxidatuen arteko konjugazioa burutzen du, GSHren oxidazio bidez hainbat espezie erreaktibo neutralizatuz (Regoli & Giuliani, 2014). GST aktibitatearen handipen batek xenobiotiko organikoen aurkako defentsa mekanismo baten aktibazioa islatzen du, eta beherapen batek, berriz, estresa eragiten duten ingurumeneko beste konposatu batzuen aurkako erantzun ez-espezifikoa (Blanco-Rayón et al., 2019).

Estresaren aurrean zelulek metabolismo energetikoaren eraldaketa bat pairatzen dute; honi esker, energiarekin erlazonaturiko biomarkatzaileak estres fisiologikoa neurtzeko erabil daitezke. Markatzaile horien artean, COX entzima dago, organismoaren kapazitate aerobikoa ebaluatzeko egokia dena, kapazitate aerobikoa organismo batean estatu metaboliko orokorraren berri ematen duen parametro fisiologikoa izanik (Blanco-Rayón et al., 2019; Hüttemann et al., 2007). COX mitokondrioetako elektroio garraio katearen azken entzima konplexua da, elektroioak erreduzituriko c zitokromotik oxigenora garraiatzen dituena. Gainera, fosforilazio oxidatzailea, protoien ponpaketa eta ATParen sintesia erregulatzen ditu, guzti honek markatzaile egokia bilakatzen dutelarik (Blanco-Rayón, 2018; Hüttemann et al., 2007). COXen aktibitateak, horrela, ehun bakoitzaren oxigeno kontsumo mailaren ideia bat ematen du (Simon & Robin, 1971).

Azkenik, EROD aktibitatea P4501A zitokromoaren (CYP1A) indukzioaren indikatzailea da. P450 zitokromoak organismo guztietan aurkitzen diren proteina familia dira, xenobiotikoak eta molekula endogenoak metabolizatzeko gaitasun handia dutenak (Whyte et al., 2000). Hauek gehien bat arrainen gibelan kontzentratzen dira. Gibelak kutsatzaileak bi fase jarraituz eraldatzen ditu (I eta II transformazio-erreakzio faseak), euren kanporaketa errazagoa izan dadin. CYP1Ak I faseko erreakzioetan hartzen du parte; honi esker kutsatzailearen disolbagarritasuna handitzen da, kanporaketa erraztuz (Andersson & Förlin, 1992). Kutsatzaileen kanporaketa emateko eraldaketak burutzean entzima honen indukzioa gertatzen da, eta hau EROD aktibitatea neurtuz antzeman daiteke. Hau da, EROD aktibitateak arrainetan poluitzaileekiko esposizioa islatzen du modu oso sentikorrean (Whyte et al., 2000).

(2) HELBURUAK ETA HIPOTESIA

Lan honen helburu nagusia AMIk urraberuetan (*Sparus aurata*) biomarkatzaile biokimikoetan duen eragina zehaztea da. Horrela, araztegietatik ibaietara ematen den amitriptilina jariaketak organismo urtarretan eragiten dituen efektu-biologikoei buruzko jakintza handitzea da asmoa. Horretarako, 2, 4 eta 7 egunetan zehar 0,2 µg/L amitriptilinapean (ingurumenarentzako adierazgarriak diren AMI balioak) egondako arrainetan eta kontrol arrainetan neurotoxizitatea, estres oxidatiboa, metabolismo energetikoaren eraldaketak eta kutsatzaileekiko esposizioa aztertu dira AChE, CAT, SOD, GST, COX eta EROD biomarkatzaileen aktibitatea neurtuz.

Aurretik egindako ikerketetan AMI maila ezberdinetako eraldaketa eta kalteekin lotuta dagoela ikusi da: sarreran azaldu den moduan, besteak beste, sistema antioxidatzailearekin, neurotoxizitatearekin eta immunitate-sistemarekin erlazionatutakoak. Gainera, Ziarrusta eta lankideek (2017) arrainak 0,2 µg/L amitriptilinapean jartzean, gibel, zakatz eta garunean AMI metaketak ematen direla ikusi dute, pilaketa handienak esposizioaren 7. egunean ematen direlarik. Hori guztia kontuan hartuta, ikerketa honetan hipotesia kontrol- eta esposizio-taldean artean AMI eragindako kalteak islatzen dituzten biomarkatzaileen aktibitate ezberdintasunak azalduko direla da, aldaketa handienak 7. egunean agertuko direla pentsatzen delarik. Hau da, AMIren metaketa-mailaren menpeko efektu gradualak espero dira.

(3) MATERIAL ETA METODOAK

Laginen lorpena

Ikerketa honetan erabilitako arrain-laginak Ziarrusta eta lankideen (2017) esperimentuan prestatutakoak izan dira. Horretan, Aqualande Taldeak (Roquefort, Frantzia) hornitutako 40 g eta 13 cm luze inguruko urraburu (*Sparus aurata*) gazteak erabili ziren. Amitriptilinarekiko esposizio esperimentuak Plentziako Itsas Estazioan (PiE-UPV/EHU) burutu ziren UPV/EHUko Animaliekin egiten den Esperimentaziorako Etika Batzordearen oniritzia lortu ostean. Bertan, arrainak 13°C-ko tenperatura konstantean eta 14:10 orduko argi:iluntasun zikloan mantendu ziren. Urraburuak PiEra ailegatzean 2 astetan zehar aklimatatu ziren, eta gero beste 48 ordutan zehar egonkortu ziren esperimentuak burutzeko erabiliko ziren ur-tangetan. Tangetako ura etengabe aireztatzen zen, eta eguneroko elikadura 0,10 g arrain-jaki arrain bakoitzeko zen. Uraren tenperatura (13°C) zein pH-a ($7,9 \pm 0,3$) konstante mantendu ziren esperimentu osoan zehar. Uretan disolbatutako oxigeno-, nitrito-, nitrato-, eta amonio-mailak esposizio esperimentu osoan zehar aldian-aldian neurtu ziren, uraren kalitatea bermatzeko.

Esperimentua burutzeko 145 arrainez osaturiko bi talde egin ziren, kontrol taldea eta AMI taldea, 0,2 µg/L AMI kontzentraziopean mantendutakoa (ingurumenerako adierazgarria den antidepressibo kontzentrazioa (Ziarrusta et al., 2017)). Talde bakoitza 250 L itsasoko urez beteriko polipropilenezko ur-tangan kokatu zen (1000 x 700 x 650 mm-koak), bietan baldintza berdinak mantenduz. 7 egunetan zehar, ur-tangetan esposizioa bideratzeko fluxu-sistema jarrai bat erabili zen, bi ponpa peristaltiko erabiliz: lehenengoarekin 8,5 L/h itsasoko ur, eta bigarrenarekin esposizio-taldeko tangan 20 mL/h amitriptilina soluzio (amitriptilina *stock* soluzioa: Sigma-Aldrich-etik eskuratutako %98-ko Amitriptilina hidrokloratoa 5000 g/L etanolean, ondoren Mili-Q uretan diluitua 85,2 µg/L-eko azken kontzentrazioa lortu arte) gaineratu ziren. AMI soluzioa 48 orduko ordezkatzeko zen.

Talde bakoitzetik 5 arrain hartu ziren amitriptilinarako esposizioa hasi osteko 2., 4. eta 7. egunetan (guztira, 30 arrain). Batutako arrainak anestesiatu (200 mg/L trikaina) ondoren, pisatu, neurtu eta gibela, garuna, eta zakatzak nitrogeno likidoan izoztu ziren, ondoren, analisiak egin arte izozkailuan (-80°C) gordetzeko.

Denboran zehar esposizio ur-tangan neurtutako AMI kontzentrazioa dosifikazio kontzentrazioarekin bat zetorren, $0,12 \pm 0,02$ µg/L-koa izanik (Ziarrusta et al., 2017). Horrez gain, kontrol-taldean laginetan AMI eta bere metabolitoen kontzentrazioak detekzio-mugan azpitik zeuden (<1 ng/L). Esperimentuan zehar ez zen

hilkortasunik erreparatu, eta kontrol- eta esposizio-arrainen artean ez zen kondizio orokorraren ((arrainen pisua x 100)/luzera) eta indize hepatosomatikoaren ((gibelaren pisua x 100)/arrainen pisua) artean ezberdintasun estatistikoki esangarririk ikusi, honek esperimentuan zehar arrainen osasuna mantendu zela adierazten duelarik (Ziarrusta et al., 2017).

Entzimen aktibitatearen determinazioa

AChE-ren aktibitatea garunean, CAT, SOD, GST eta COX gibel zein zakatzetan, eta EROD gibelean soilik zehaztu ziren. Kasu guztietan laginen homogeneizazioa (Cryolys sistemarekin ekipaturiko Precellys homogeneizadorearekin) eta zentrifugazioa (Allegra X-30R Centrifuge, Beckman Coulter) burutu ziren 4°C-tan, entzima bakoitzerako espezifikoak ziren disoluzio indargetzaileak erabiliz. Analizatutako entzima guztietan, lortutako gainjalkina erabili zen proteina kontzentrazioa Bradford metodoaren (Bradford, 1976) bidez neurtzeko, eta zuzen estandarerako behi-serumaren albumina (BSA, sigma A2153) erabili zen.

AChE aktibitatea. Garun laginen homogeneizazioa burutu zen 0,1 M potasio fosfato (pH 7,3) disoluzio indargetzailea erabiliz, eta jarraian 20 minutuko zentrifugazioa (10.000x g). Zentrifugazioan lortutako gainjalkina erabiliz, AChEren aktibitatearen determinaziorako 412 nm-tan azido 5-tio-2-nitrobentzoikoaren formazioa neurtu zen, Ellman-en metodoa (Ellman et al., 1961) jarraituz, mikroplaketarako moldaera erabiliz (Guilhermino et al., 1996). AChEren aktibitatea laginaren proteina kontzentrazioaren funtziopean adierazi zen, nmol/min·mg proteina unitateetan

CAT aktibitatea. Gibel eta zakatz laginen homogeneizazioa (pH 7,0 eta 0,05 M-dun fosfato disoluzio indargetzailea) eta zentrifugazioa (20 min, 10.000x g) burutu ziren. Entzimaren aktibitatea determinatzeko Claibornek (1985) zehaztu bezala H₂O₂-ren kontsumoa (0,03 M H₂O₂) neurtu zen 240 nm-tan, UV argi bidezko irakurketak egiteko mikroplaka espezifikoa erabiliz. CATen aktibitatea laginaren proteina kontzentrazioaren funtziopean adierazi zen, nmol/min·mg proteina unitateetan.

SOD aktibitatea. Zakatz eta gibel laginen homogeneizazioa (0,1 M fosfato disoluzio indargetzailea, pH 7,4) eta zentrifugazioa (20 minutu, 10.000x g) burutu ziren. SODen aktibitatea neurtzeko SIGMA-ALDRICH®-en SODen determinaziorako testa (19160 SOD *determination kit*) erabili zen. Honetan, xantina oxidasak sorturiko superoxido erradikalek WST-1 konposatuarekin erreakzionatzen dute kolorea emanez. SODen presentziak superoxido erradikalak H₂O₂ra eraldatzea eragiten du, kolorearen agerpena inhibituz, horrela SODen aktibitatea neurtu daitekeelarik. Aktibitatearen determinaziorako, entzimaren IC₅₀-eko diluzio ratioa erabili zen aktibitatea U/g ehun unitateetan adierazi zelarik.

GST aktibitatea. Zakatz eta gibel laginak homogeneizatu (100 mM fosfato disoluzio indargetzailea, pH 7,4) eta zentrifugatu (20 minutu, 10.000x g) ziren. Aktibitatea 340 nm-tan tioeterren formazioa neurtuz determinatu zen, Habig-ren metodoa (Habig et al., 1974) erabiliz. Aktibitatea laginaren proteina kontzentrazioaren funtziopean adierazi zen, nmol/min·mg proteina unitateetan.

COX aktibitatea. Gibel eta zakatz laginen homogeneizazioa (pH 7,2, 25 mM potasio fosfato, 10 µg fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF)/mL, 2 µg aprontinina/mL) burutu zen lehendabizi. Ondoren,

homogeneizaturiko laginen sonikazioa burutu zen 10 segundotan zehar 3 aldiz (120 W-tan, sonikazioen artean laginak izotzean minutu batez mantenduz). Jarraian laginen zentrifugazioa burutu zen (4°C, 15 minutu, 16000x g). Entzimaren aktibitatearen determinazioa mikroplaka espektrofotometro bat erabiliz burutu zen, 550 nm-tan, Ivanina *et al.*-ren metodoaren (Ivanina et al., 2011) moldaera bat jarraituz (Blanco-Rayón et al., 2019) (200 mM potasio fosfato (pH 7,2), 16 µM c zitokromo erreduzitu, 2µg/mL A antimizina). Aktibitatea laginaren proteina kontzentrazioaren funtziopean adierazi zen, U/mg proteina unitateetan.

EROD aktibitatea. Entzima honen aktibitatea neurtzeko IKZUS *research sea environment*TM-en CYP4501A1 EROD ACTIVITY kit-a erabili zen, horretarako, produktuaren gidaliburuko protokoloa jarraitu zelarik. Homogeneizatorako kit-aren A eta B 1:100 disoluzio indargetzailea eta zentrifugazioa 20 min, 9.000x g-tan burutu ziren. Entzimaren zinetika fluorimetroan burutu zen kitzikapena 535 nm eta igorpena 595 nm-tan zehaztuz. Aktibitatea lagin bakoitzaren entzimaren zinetika kurbaren maldatik eskuratu zen; hau laginaren proteina kontzentrazioaren funtziopean adierazi, eta resorufin estandar kurbaz baliatuz pmol resorufin/min/mg unitateetan adierazi zen.

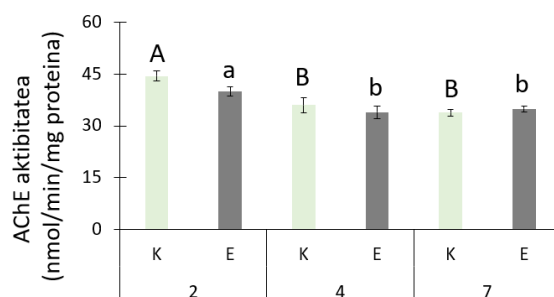
Analisi estatistikoak

Lortutako emaitzetan *outlier*-ak kendu ziren GraphPad Outlier calculator-a erabiliz. Analisi estatistikoak egiteko IBM® SPSS® Statistics programaren 25.0. bertsioa erabili zen. Entzima bakoitzeko lortutako datuen normaltasuna frogatzeko Shapiro-Wilk test-a erabili zen. Ondoren, entzima bakoitzarekin, egun bakoitzeko kontrol eta esposaturiko laginen aktibitateen arteko ezberdintasunak esanguratsuak ziren zehazteko analisiak burutu ziren: Student t-testa erabili zen datuen banaketa normala zuten kasuetan (AChE, GST eta EROD), eta Mann-Whitney U-testa banaketa ez-normala zuten kasuetan (CAT, SOD eta COX). Ehun ezberdinetan (zakatzak eta gibela) neurtutako entzimen (CAT, SOD, GST eta COX) aktibitatearen artean ezberdintasun esanguratsuak zeuden determinatzeko ere Student t-testa erabili zen datuen banaketa normala zuten kasuetan (GST) eta Mann-Whitney U-testa banaketa ez-normala izan zenetan (CAT, SOD eta COX). Azkenik, alde batetik kontrolen artean, eta bestetik, AMI taldekoen artean, denboran zeharreko (2, 4 eta 7 egunen artean) aldaketak aztertzeko, ANOVA (eta post hoc-erako Duncan) erabili zen banaketa normala zeukaten kasuetan (AChE, GST eta EROD) eta Kruskal Wallis (eta taldeen arteko ezberdintasunetarako Dunn) banaketa ez-normala zeukatenetan (CAT, SOD eta COX). Egindako analisi estatistiko guztietarako %95eko adierazgarritasun maila ($p < 0,05$) ezarri zen.

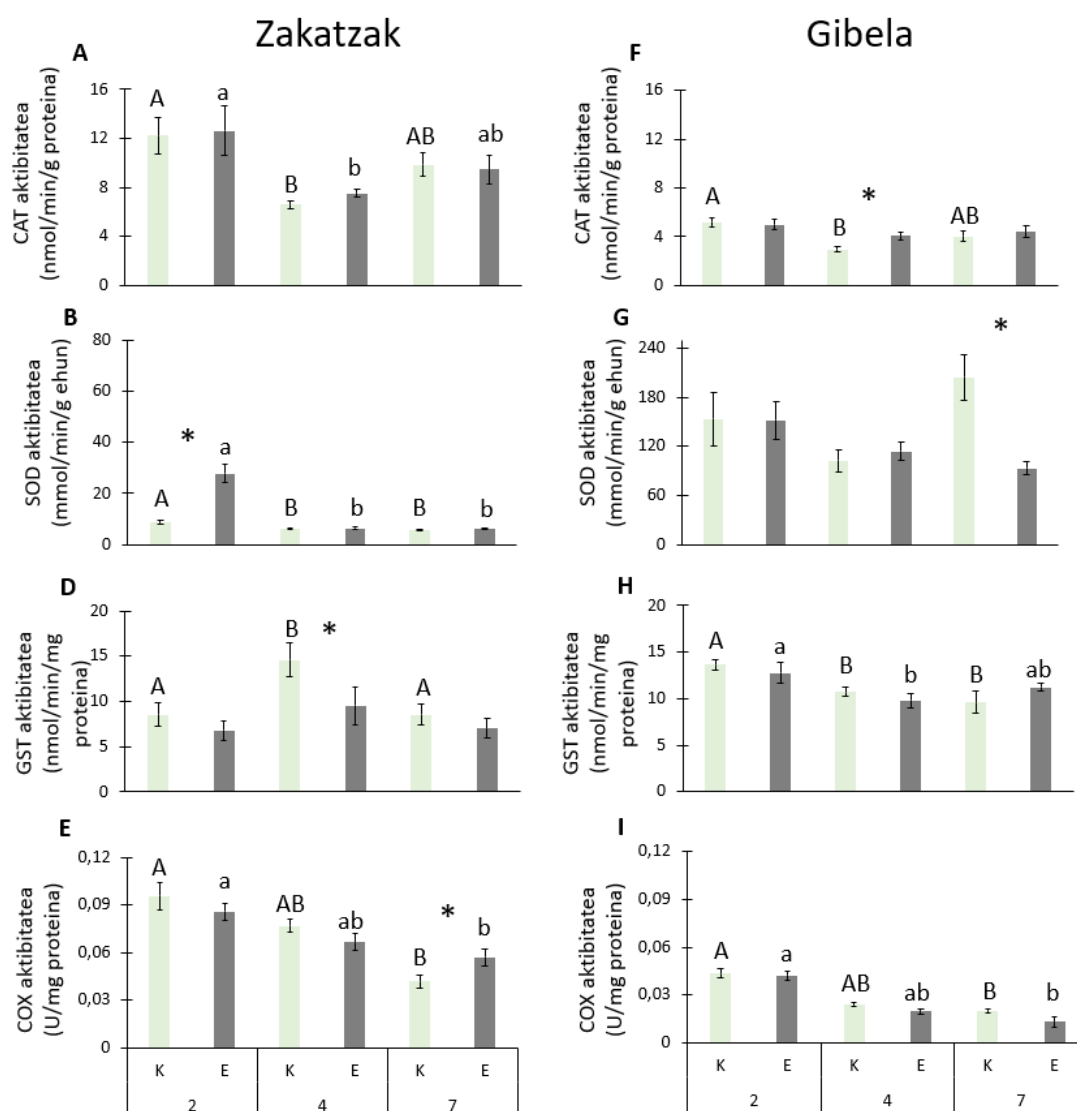
(4) EMAITZAK

Kontrol eta esposizio taldeen arteko ezberdintasunak

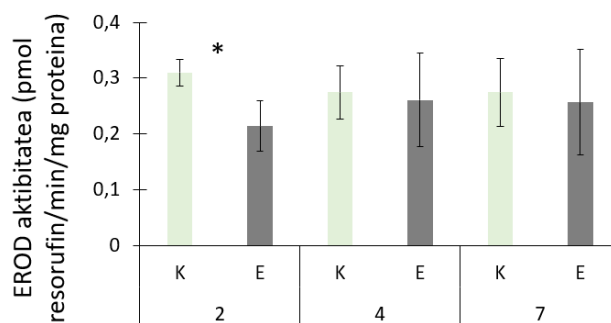
AChEren kasuan ez zen ezberdintasun esanguratsurik aurkitu kontrol eta esposizio taldeen artean (1. irudia). CATi dagokionez, ezberdintasun esanguratsuak gibelean, 4. egunean, soilik aurkitu ziren (~ x1,5 handiagoa esposizio taldean) (2. irudia, A & F). SODen, aldakortasun nabaria azaldu zen zakatzetan 2. egunean (esposizio taldean kontrolaren balioak hirukoiztu ziren) eta gibelean 7. egunean (kontrol taldean esposizioaren bikoitza) (2. irudia, B & G). GSTren aktibitate aldaketak zakatzetan, 4. egunean, soilik ikusi ziren, kontrol taldearen



1. irudia. *Sparus aurata* arrainen AChE entzimaren aktibitatea garunean 2, 4 eta 7 egunetan zehar amitriptilinapean egon ostean. Kontrol (K) arrainen aktibitatea gris argiz azaltzen da, eta AMIraiko esposizioa jasan duen taldearena (E) gris ilunez. Egun eta talde bakoitzeko batezbesteko balioak \pm bakoitzaren errore estandarra (errore-barraz adierazita) ikus daitezke. Hizkiek talde bereko (K edo E) egun ezberdinen arteko balioen ezberdintasunak adierazten dituzte (letra larriak K-rako eta xeheak E-rako).



2. irudia. *Sparus aurata* arrainen entzimen aktibitatea zakatzetan (A-E) eta gibelean (F-I) 2, 4 eta 7 egunetan zehar amitriptilinapean egon ostean. Kontrol (K) arrainen aktibitatea gris argiz azaltzen da, eta AMIraiko esposizioa jasan duen taldearena (E) gris ilunez. Egun eta talde bakoitzeko batezbesteko balioak \pm bakoitzaren errore estandarra (errore-barraz adierazita) ikus daitezke. Izartxoek (*) K eta E taldeko balioen artean ezberdintasun adierazgarriak daudela adierazten dute. Hizkiek talde bereko (K edo E) egun ezberdinen arteko balioen ezberdintasunak adierazten dituzte (letra larriak K-rako eta xeheak E-rako).



3. irudia. *Sparus aurata* arrainen EROD aktibitatea gibelean 2, 4 eta 7 egunetan zehar amitriptilinapean egon ostean. Kontrol (K) arrainen aktibitatea gris argiz azaltzen da, eta AMIraکو esposizioa jasan duen taldearena (E) gris ilunez. Eguna eta talde bakoitzeko batezbesteko balioak \pm bakoitzaren errore estandarra (errore-barrak adierazita) ikus daitezke. Izartxoak (*) bigarren eguneko K eta E taldeko balioen artean ezberdintasun adierazgarriak daudela adierazten du.

aktibitatea 1,5 aldiz handiagoa izan zelarik esposizio taldearekiko (2. irudia, D & H). COXen kasuan, desberdintasun esanguratsuak zakatzean soilik agertu ziren, 7. egunean esposizio taldeak aktibitate altuagoa erakutsi zuelarik ($\sim \times 1,5$) (2. irudia, E & I). Azkenik, ERODen aktibitate aldaketa esanguratsuak 2. egunean antzeman ziren, kontrol taldearen aktibitatea 1,5 aldiz handiagoa izan zelarik (3. irudia). Laburbilduz, kontrol eta AMI taldeen arteko aldaketa esanguratsuak ikusi dira zakatzetako SOD, GST eta COX, eta gibelean CAT, SOD eta EROD entzimen aktibitatean.

Egun ezberdinen kontrol taldeen arteko ezberdintasunak

Ehun bakoitzean 2, 4 eta 7 egunetan neurtutako kontrol-taldeen aktibitate balioen artean hainbat ezberdintasun adierazgarri azaldu ziren entzima guztien kasuan, ERODen izan ezik, non balio guztiak konstante mantendu ziren denboran zehar (3. irudia). Garunean neurtutako AChEren kontrol-taldeen aktibitateak behatzean 2. eguneko 4. eta 7. egunekin konparatuz esangarriki altuagoa zela ikus daiteke (1. irudia). Zakatzetan zein gibelean neurtutako kontrolen CAT aktibitatea adierazgarriki baxuagoa zen 4. egunean baino (2. irudia, A & F). SODen kasuan, zakatzetan 2. eguneko kontrolen aktibitatea beste biek konparatuta handiagoa zen, eta gibelean, hirurak berdintza mantendu ziren (2. irudia, B & G). Zakatzetan GSTren 4. eguneko kontrolaren balioa beste biekiko altuagoa zen, eta gibelean, ordea, 2. eguneko zen beste biekiko handiagoa (2. irudia, D & H). Azkenik, COXen, zakatz zein gibelean, 7. eguneko kontrolaren balioa 2. eguneko baino nabarmenki baxuagoa zen (2. irudia, E & I).

Egun ezberdinen esposizio taldeen arteko ezberdintasunak

Esposizio-taldeen egunen arteko aktibitate ezberdintasunari dagokionez, AChEren kasuan 2. eguneko balioa beste bi egunekin alderatuta altuagoa zen (1. irudia). Zakatzetan aztertutako CATen aktibitate ezberdintasunak azaldu ziren 2. eta 4. egunen artean; gibelean, ordea, ez zen CAT-en ezberdintasun esangaririk aurkitu hiru egunen artean (2. irudia, A & F), gibelean SOD eta zakatzetako GST aktibitateetan bezala (2. irudia, G & D). SODen zakatzetako neurketan, berriz, 2. eguneko balioa beste guztiak baino askoz ere handiagoa zela ikusi zen (2. irudia). Bestalde, gibelean GSTan 2. eta 4. egunen arteko aldaketak azaldu ziren (2. irudia). COXen gibel zein zakatzetako (2. irudia E & I) neurketek 2. eguneko aktibitatearen balioa 7. egunekoarekiko ezberdina

izan zela islatzen dute, bi kasuetan 2. eguneko altuagoa zelarik. Azkenik, ERODi dagokionez, ez zen inolako ezberdintasunik azaldu esposizio-taldeen balioen artean (3. irudia).

Gibel eta zakatzen aktibitateen arteko ezberdintasunak

Ezberdintasunak zehazteko, 2. eguneko kontrol taldearen balioak konparatu ziren. CAT eta COXen kasuan, aktibitate altuagoa lortu zen zakatzetan gibelean baino (2. irudia, A & F eta E & I), bi entzimen kasuan zakatzetako balioak gibelean baino 2-3 aldiz handiagoak izanik. Beste alde batetik, SODen aktibitatea altuagoa izan zen gibelean zakatzetan baino (2. irudia, B & G), bi ehunen artean ezberdintasun oso handiak lortu zirelarik (~ x18 gibelean). Azkenik, GSTri dagokionez, zakatz eta gibelean aurkitutako aktibitateak berdinak kontsideratu ziren (2. irudia, D & H). Gibel eta zakatzen artean ikusitako entzimen aktibitate ezberdintasunak (CAT, SOD eta COXen) kasu guztietan esposizio-taldez gain kontrolatan ere ikusi ziren, amitriptilina ez ziren faktoreek eragindako aldaketak zirela ondoriozta daitekeelarik.

(5) EZTABAIDA

AChE entzima garrantzitsua da neuronen arteko sinapsi kolinergikoetan eta sinapsi neuromuskularretan, azetilkolinaren degradazioa bideratzen baitu, horrela seinalea gelditzeko gai delarik. Entzima honen aktibitatearen aldaketak konposatu batek sortutako neurotoxizitatea neurtzeko erabiltzen dira (Moreira & Guilhermino, 2005; Sakar et al., 2006). Ikerketa honetan, beraz, AMIren neurotoxizitate potentziala determinatzeko erabili da. Garunean determinaturiko AChEren aktibitatean, ordea, kontrol (K) eta AMIraiko esposizioa jasan zuten taldeen (EAMI) artean ez da inolako ezberdintasunik aurkitu. Ziarrusta eta lankideek (2017) egindako ikerketan, AMIren kontzentrazio handienak (~15 ng/g-rainokoak) garunean zeudela ikusi zen, farmako psikoaktiboa eta bere itu-orano nagusia garuna izateagatik. Izan ere, bere hidrofobizitateak gaitasuna ematen dio barrera hematoentzefalikoa difusio-pasiboz zeharkatzeko (Ziarrusta et al., 2017). Garunean emandako AMI pilaketa dela eta, entzimaren aktibitatean eraginaren bat espero zen, hala ere, ez da halakorik ikusi, erabilitako kontzentrazioetan (0,2 µg/L) amitriptilina neurotoxizitate efekturik ez duela adieraziz. Setralinarekin egindako ikerketa batean (serotoninaren birxurgapena inhibitzen duen beste antidepresibo bat) AChEren aktibitate handipen bat ikusi zen 1, 2, 4 eta 7 eguneko esposizioaren ondoren (Xie et al., 2015). Antzeko efektua duen konposatua izanik, antzeko eragina esperoko litzateke AMIrekin eginiko neurketetan; hala ere, kontuan hartu behar da Xie eta lankideen (2015) ikerketan erabileriko antidepresibo kontzentrazioa >4,46 µg/L-koa zela. Honekin batera, Nunes-Tavares eta lankideek (2002) metodo fluorimetrikoen bidez amitriptilina moduko TCAek *Electrophorus electricus* arrainaren AChE inhibitzen zutela frogatu zuten, baina, aktibitatearen %50a inhibitzeko beharrezko TCA kontzentrazioa (IC₅₀) ~30 mg/L zela estimatu zuten. Bi kasuetan erabili ziren antidepresibo kontzentrazioak esperimendu honetan erabilitakoak (0,2 µg/L) baino askoz ere altuagoak izan ziren, ezberdintasun horrek AMIk AChEn efekturik eragin ez izana azal lezakeelarik. Gainera, bi ikerketetan erabilitako balioak ingurune naturaletan aurkitu direnak (223 ng/L-rainokoak (Baker & Kasprzyk-Hordern, 2011)) baino dezente altuagoak dira, eta ikerketa honetan erabilitakoa, berriz, ur-gainazaletan aurkitu diren balioen adierazgarria da.

Organismoen metabolismo aerobikoan ohikoa da egoera fisiologiko normaletan ROS espezieak sortzea, hauen oinarrizko sintesi horren aurka defentsa antioxidatzaileak daudelarik; horien artean garrantzitsuenetarikoak CAT, SOD eta GST dira. Estres egoeretan ROS kontzentrazioak emendatu egiten dira, horren aurrean sistema antioxidatzaileen gaitasun emendatze bat ematen delarik (Paris-Palacios et al., 2013). Hala ere, stres-maila handitzean, ROS sintesiak defentsa-antioxidatzaileak gaindi ditzake, eta sortutako desorekak zeluletako kalteak edota endekapen- eta hantura-gaixotasunak sortu (Aruoma, 1998; Lefer & Granger, 2000; Paris-Palacios et al., 2013; Uchida, 2000). Hainbat poluitzailek erredox homeostasian eragiten dute modu zuzen edo ez-zuzenean, honen desoreka eraginez. Hori dela eta, CAT, SOD eta GST entzimen aktibitateen aldaketak analizatu dira hurrengo orrialdetan zehar, amitriptilinareneko efektu oxidatzaileak aztertzeko.

CATi dagokionez, K eta EAMI taldeen arteko ezberdintasun esangarriak gibelean soilik aurkitu ziren: CATen aktibitatearen handipen iragankor bat neurtu zen EAMI taldean (K-n baino $\sim x1,5$ handiago), laugarren egunean. Hau da, AMIrekin kontaktua izan zuten arrainetan CATen aktibitatearen indukzio txiki bat eman zen, kontrol taldean eman ez zena. CATen aktibitatearen emendapena hainbat poluitzailearen presentzian gertatzen dela ikusi da; besteak beste, kadmioarekin (Souid et al., 2013) eta setralina antidepresiboarekin egindako ikerketetan (Xie et al., 2015). CATen aktibitatearen handipen hori estres oxidatzailearen handipen baten aurka defentsa antioxidatzailearen egokitzeko saiakera izango litzateke, zeinetan entzimak ROS maila jaisteko H_2O_2 -ren degradazio-tasa handituko lukeen (Xie et al., 2015). Aktibitate igoera honek, beraz, AMIk eragindako ROSen handipen bat islatuko luke.

Beste alde batetik, zazpigarren egunean gibelean SODen aktibitate jaitsiera nabaria ikusi zen EAMI-n, K-rekin konparatuta. AMIrekin tratatutako giza-fibroblastoetan egindako azterketetan (Moreno-Fernández et al., 2008), denboran zehar (24 h eta 48 h) SOD aktibitatearen handipen gradual bat ikusi zen. Ikerketa honetan, ordea, esan bezala, aktibitate igoeraren orde, murriztapen handi bat ematen zen. Badira kasuak non hemen bezalako SODen aktibitate beherakadak ere ikusi diren; besteak beste, arrainen kobrerako esposizio-esperimentuetan, organismo urtarrentzako toxikoa den konposatua (Vutukuru et al., 2006). Entzima antioxidatzaileen aktibitatearen murriztapena gehiegizko substratuaren ondoriozkoa (gehiegizko ROS maila) edo oxidatzaileek eragindako kalteen ondoriozkoa izan liteke (Vutukuru et al., 2006). CAT eta SOD entzimek sistema antioxidatzailean modu koordinatuan egiten dute lan, SODEk sortzen duen H_2O_2 -a CATek degradatzen duelako, beraz, askotan CAT eta SOD aktibitateak erlazionatuta egoten dira (Souid et al., 2013). Hau horrela izanda, 7. egunean eman zen SOD aktibitatearen jaitsiera egun berean ikusitako CATen aktibitatearekin erlazionaturik egon liteke (4. egunean CAT aktibitatea igo egiten zen, baina 7.ean kontrolarekiko berdintzen zen berriro ere). SODen aktibitatearen murrizpenak H_2O_2 gutxiagoren sorrera dagoela esan nahi du, beraz, CATen aktibitatea ere murriztagoa izango da, ez duelako hainbesteko substraturik degradatu behar izango. Gainera, SODen jaitsierak superoxido erradikal mailaren handipena dakar, CATen inhibizioa eragiteko gai den erradikala (Kono & Fridovich, 1982).

Zakatzetako SOD aktibitateari dagokionez, 2. egunean EAMI taldean K-rekiko igoera bat eman zen, baina zelulen kultiboetan ikusitako denboran zeharreko aktibitate emendapen graduala izan beharrean (Moreno-

Fernández et al., 2008), 4. eta 7. egunetan aktibitatea kontrolarekin berdindu zen, EAMI taldekoen balioa berriro txikitzen zelarik. Beste hainbat poluitzaile toxikoekin eginiko ikerketa batzuetan ere denboran zeharreko SODen aktibitatearen igoera gradualak ikusi dira (Žikić et al., 2001). Ikerketa honetan emandako bat-bateko aktibitate igoera iragankor hori azaltzeko pentsa liteke AMIrekiko esposizioaren lehenengo momentuetan SODen aktibitatearen emendatzea eragiten duen estres maila handipen bat ematen dela, baina 4. egunetik aurrera gehiegizko erradikalen sorrerak SODen ahalmena gainditu izana, aktibitatearen jaitsiera eraginez (gibelesko SODen aktibitatearekin azaldu den moduan).

GSTri dagokionez, alde batetik, gibelean ez zen ezberdintasun adierazgarririk lortu egun ezberdinetako K eta EAMI artean. Xie eta lankideek (2015) setralinarekin egindako ikerketan *Carassius auratus*-aren gibelean GSTren aktibitate handipen bat ikusi zen 1, 2, 4 eta 7 eguneko esposizioaren ondoren. AChE-rekin azaldu den moduan, antzeko efektua duen konposatua izanik, AMIrekin antzeko eraginak espero ziren. Hala ere, arestian esan bezala, erabilitako antidepressibo kontzentrazio ezberdintasunak (AMiren 0,2 µg/L setralinaren >4,46 µg/L aurrean) azal lezake bi ikerketetan ikusitako aktibitate aldakortasuna. Bestalde, zakatzetako GSTan, 4. egunean ezberdintasun nabarmen bat ikusi zen K eta EAMI artean, K-ren aktibitatea altuagoa izanik. Schmidt eta lankideek (2008) giza-zelulak imipraminarekin tratatzean (AMIren moduan, serotonina eta noradrenalinarekin birxurgatzea inhibitzen dituen antidepressiboa) GSTren mRNA mailaren murriztapena antzeman zuten. Antidepressibo hauek, beraz, gene adierazpena eta aktibitatea inhibitzeko gaitasuna dute. GSTak funtzio garrantzitsua du erreox potentzialaren homeostasian, GSHren eta xenobiotikoen edo osagai oxidatuen konjugazioa burutzen baitu (Vlahogianni et al., 2007), beraz, honen inhibizioak kalte larriak eragin litzake organismoetan.

Aurreko ikerketetan, amitriptilina giza- eta arratoi-zeluletan ROS mailak eta lipido peroxidazioa handitzen zituela, eta antioxidatzaileekin tratatzean AMIren efektuak gutxitzen zirela ikusi zen, estres oxidatzailearen homeostasian eragiten duen konposatua zela ondorioztatu zelarik (Bautista-Ferruffino et al., 2011; Moreno-Fernández et al., 2008; Slamon & Pentreath, 2000). Lan honetan lortutako datuak bat datoz datu horiekin, gibelesko CAT eta SOD eta zakatzetako SOD eta GST aktibitate aldaketek AMIk sistema-antioxidatzailean eragindako desoreka bat islatzen baitute, gehiegizko ROS mailek entzimen bidezko defentsen handipena zein inhibizioa eragin dutelarik. Esan bezala, entzima antioxidatzaileen aktibitate igoerek AMIk eragindako estres oxidatzailearen aurkako defentsaren moldatzea islatuko lukete, eta, jaitsierek, berriz, gehiegizko substratuaren ondoriozko (gehiagizko ROS) edo oxidatzaileek eragindako kalteen ondoriozko inhibizioa. Aktibitate jaitsierek garrantzi handia dute, arrainaren sistema-antioxidatzailearen kalte nabarmena eman dela isla baitezakete (Sedeño-Díaz & López-López, 2013). Izan ere, ROSen aurkako babes-mekanismoek gainezka egitean, lipidoen peroxidazioa (LPO) ematen da maiz, zeluletan estres oxidatzailearekin loturiko funtzio-galeraren arduradun garrantzitsuenetarikoa (García-Medina et al., 2017), LPO bidez sortzen diren konposatuak toxikoak baitira euren potentzial kartzinogeno eta genotoxikoak direla eta (García-Medina et al., 2017). Lan honetan, ez da LPOren determinaziorik burutu, baina SODen zein GSTren neurtutako aktibitate beherakada ikusita, lipidoen oxidazio maila eraldatuta espero liteke. Hau, ordea, uste bat soilik da, eta ezin da ziurtasunez

esan laginetan lipidoen peroxidazio maila neurtu arte; beraz, LPOa hurrengo ikerketetan aztertzeko bide interesgarria izan daiteke.

COX mitokondrioetako elektroio garraio katearen azken entzima konplexua da, metabolismo energetikoan paper garrantzitsua betetzen duena, eta ehun ezberdinen oxigeno kontsumo mailaren inguruko ideia ematen du (Hüttemann et al., 2007; Simon & Robin, 1971). Gibelean determinatutako COX aktibitateari dagokionez ez zen ezberdintasunik aurkitu K eta EAMI artean, baina zakatzetan neurtutakoan, ordea, 7. egunean EAMI taldeak K-k baino aktibitate altuagoa erakutsi zuen, oxigeno kontsumo maila handiagoa islatzen duelarik. Muskuiluetan COX emendapenak ikusi dira hipoxia egoeran, horrek oxigeno falta konpentsatzeko mekanismo moduan jarduten duela iradokiz (Ivanina et al., 2011). Hori jakinda, zakatzetan neurtutako aldaketetan AMIk metabolismo energetikoan eragina duela islatzen du.

ERODek gibeledako P4501A zitokromoaren aktibitatea islatzen du. Kutsatzaileen I transformazio-erreakzio fasean jarduten du, poluitzaileen disolbagarritasuna handituz, kanporaketa errazteko (Andersson & Förlin, 1992; Whyte et al., 2000). Gibelean, 2. egunean, EAMI arrinetan EROD aktibitatearen jaitsiera nabarmena neurtu zen K-rekin konparatuta. Hainbat ingurumen-kutsatzailearen aurrean (hala nola, hidrokarburo polizikliko aromatikoak) EROD aktibitatearen indukzioa ikusi da, baina badaude kasuak non, lan honetan bezala, ERODen aktibitatearen jaitsierak ere ikusi diren (besteak beste, organoeztainu konposatuen esposiziopean) (van der Oost et al., 2003; Whyte et al., 2000). Neurtutako datuek, beraz, amitriptilina gibeledako transformazio-erreakzioetan epe laburrera inhibizio-efektu bat eragiten duela islatzen dute, kalte metabolikoa eraginez.

Ziarrusta eta lankideek (2017) egindako aurreko analisietan, ehun ezberdinetan (gibel, zakatz zein garunean) AMI kontzentrazio handiena 7. egunean aurkitu zen, eta, ondorioz, biomarkatzaileetan ere aldaketa handienak azken egunean espero ziren. Ikerketa honetan, 7. egunean gibeledako SOD aktibitatean eta zakatzetako COXen aldaketak behatu dira, baina, gainerako entzimetan ez da kontzentrazioaren menpeko efektu gradualik ikusi. Eraginak lehenengo egunetan ere ikusi ahal izan direnez, amitriptilina efektua ez da metaturiko kontzentrazioaren guztiz menpekoa. Horretaz gain, AMIren metabolizazioak ere paper garrantzitsua izan lezake egun ezberdinetan emandako aktibitate aldaketetan.

Bi talde esperimentalen arteko aldaketa esanguratsuez gain, emaitzetan ikusi den moduan, kasu batzuetan K taldearen aktibitateak eta EAMIren aktibitateak ez dira modu berean eraldatu denboran zehar. Ezberdintasun horiek gibeledako CATen eta gibel zein zakatzetako GSTen ikusi dira. Aldakortasun hauek aurretik deskribatutako K eta EAMI arteko ezberdintasunei batu behar zaizkie, amitriptilina eragina ere suposatzen baitute: AMIk egoera normalean eman beharko litzatekeen egunen arteko aktibitate bariantza eraldatzen du.

(6) ONDORIOAK

Ikerketa honetan, amitriptilina (AMI) *Sparus aurata* arrain espeziean eragiten dituen erantzun biologikoak neurtu dira, biomarkatzaile biokimikoen bidez. Arrainak 7 egunez 0,2 µg/L AMIrekin jarraiki egon ostean, CAT, SOD, GST, COX eta EROD entzimen aktibitateetan hainbat aldaketa ikusi dira. AMIk arrainen gibel zein zakatzetan estres oxidatzailea handitzen duela, eta zakatzetan energia-metabolismoa eta gibelean

metabolismo orokorra eraldatzen dituela ondorioztatu da. Beste alde batetik, ordea, ez da neurotoxizitaterik detektatu, garunean neurtutako AChE aktibitateak ez baitu talde esperimentalen artean desberdintasun esanguratsurik erakutsi. Hala ere, kontuan hartu behar da ikerketa honetan AMIren epe-laburreko efektuak soilik neurtu direla, eta epe luzera izan ditzakeen efektuak neurtzeko esposizio-esperimentu luzeagoak burutu beharko dira. Ikerketa honetan eskuratutako informazioa, Ziarrustak eta lankideek aurreko ikerketetan eskuratutakoarekin batera (Ziarrusta et al., 2017, 2019), ingurumenarentzako adierazgarriak diren AMI kontzentrazioek arrainetan maila ezberdinetako efektuak eragin ditzaketela islatzen du. Gainera, ikerketa honetan erabilitako biomarkatzaile biokimikoak AMIren presentzia adierazteko baliagarriak izan ahal direla ikusi da; hala ere, ikusi den aldakortasuna hurrengo ikerketetan aztertzea ere gomendagarria da. AMI arrainetan efektu biologikoak eragiteko gai bada, seguruenik ingurune urtarretako gainerako organismo bizidunetan ere eragingo du; eta, gizakiok uretako produktuak kontsumitzen ditugunez, interesgarria litzateke uretan gertatzen den AMI eta beste farmakoen pilaketak gizakietara hedatzeko gaitasuna eta sortu ahal dituzten efektu kaltegarriak aztertzea. Ikerketa honetan amitriptilina bakarrik ikertu den arren, milaka dira egunero araztegietatik ur-gainazaletara igarotzen diren eta ekosistemetan toxizitatea eragiten duten konposatuak. Beraz, garrantzitsua da gizartean honen inguruko hausnarketa bultzatzea, eta organismo-urtarretan metaketak eta aipatutako efektuak saihesteko, araztegiatiko ur-garbiketa metodo eraginkorragoak bilatu beharko lirateke, gizakion aldetik medikamentuen sintesi eta erabilera kontrolatuago bat bultzatzeaz gain.

(7) BIBLIOGRAFIA

- Andersson, T., & Förlin, L. (1992). Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquat Toxicol*, 24, 1–20.
- Aruoma, O. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc*, 75(2), 199–212.
- Baker, D. R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2011). Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218(12), 1620–1631.
- Bautista-Ferrufino, M. R., Cordero, M. D., Sánchez-Alcázar, J. A., Illanes, M., Fernández-Rodríguez, A., Navas, P., & de Miguel, M. (2011). Amitriptyline induces coenzyme Q deficiency and oxidative damage in mouse lung and liver. *Toxicol Lett*, 204(1), 32–37.
- Bebiano, M. J., Company, R., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R. P., & Fiala-Médoni, A. (2005). Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiulus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat Toxicol*, 75, 354–373.
- Blanco-Rayón, E., Guilhermino, L., Irazola, M., Ivanina, A. V., Sokolova, I. M., Izagirre, U., & Marigómez, I. (2019). The influence of short-term experimental fasting on biomarker responsiveness in oil WAF exposed mussels. *Aquat Toxicol*, 206, 164–175.
- Blanco-Rayón, E. (2018). *Contribution to the development of Best Available Practices (BAPs) for a multi-biomarker approach in sentinel mussels based on a better understanding of the influence of confounding factors on biomarker values and responsiveness*. University of the Basque Country, PiE.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72(1–2), 248–254.
- Breyer-Pfaff, U. (2004). The metabolic fate of amitriptyline, nortriptyline and amitriptylinoxide in man. *Drug Metab Rev*, 36(3–4), 723–746.
- Calisto, V., & Esteves, V. I. (2009). Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere*, 77(10), 1257–1274.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In R. Greenwald (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. (pp. 283–284). CRC.

- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andreas, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7(2), 88–95.
- Estebe, J.-P., & Myers, R. R. (2004). Amitriptyline Neurotoxicity: Dose-related Pathology after Topical Application to Rat Sciatic Nerve. *Anesthesiology*, 100, 1519–1525.
- García-Medina, S., Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L. M., Ruiz-Lara, K., Islas-Flores, H., & Gasca-Pérez, E. (2017). Relationship between genotoxicity and oxidative stress induced by mercury on common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Aquat Toxicol*, 192, 207–215.
- Gillman, P. K. (2007). Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br J Pharmacol*, 151(6), 737–748.
- Guilhermino, L., Lopes, M. C., Carvalho, A. P., & Soares, A. M. V. M. (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 32(4), 727–738.
- Gunnarsson, L., Jauhainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., & Larsson, D. G. . (2008). Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments. *Environ Sci Technol*, 42(15), 5807–5813.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic and formation. *J Biol Chem*, 249, 7130–7139.
- Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2012). Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Anal Bioanal Chem*, 404, 2611–2624.
- Hüttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H., & Doan, J. W. (2007). Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1773(12), 1701–1720.
- ICES. (2012). *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects*. By Davies, I.M, & Vethaak, D. (eds). *ICES Cooperative Research Report*, No 315.
- Ivanina, A. V., Froelich, B., Williams, T., Sokolov, E. P., Oliver, J. D., & Sokolova, I. M. (2011). Interactive effects of cadmium and hypoxia on metabolic responses and bacterial loads of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin. *Chemosphere*, 82(3), 377–389.
- Kono, I., & Fridovich, Y. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem*, 257, 5751–5754.
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., Gagné, F., Louis, S., Patrick, C., & Sauvé, S. (2011). Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – Evidence of biological effects. *Chemosphere*, 83, 564–571.
- Lefer, D. J., & Granger, D. . (2000). Oxidative Stress and Cardiac Disease. *Ame J Med*, 109(4), 315–323.
- Maubach, K. A., Rupniak, N. M. J., Kramer, M. S., & Hill, R. G. (1999). Novel strategies for pharmacotherapy of depression. *Curr Opin Chem Biol*, 3(4), 481–488.
- McCarthy, J. F., & Shugart, L. R. (1990). *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Moore, R. A., Derry, S., Aldington, D., Cole, P., & Wiffen, P. J. (2012). Amitriptyline for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, 12.
- Moreira, S. M., & Guilhermino, L. (2005). The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione-S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest portuguese coast. *Environ Monit Assess*, 105, 309–325.
- Moreno-Fernández, A. M., Cordero, M. D., de Miguel, M., Delgado-Rufino, M. D., Sánchez-Alcázar, J. A., & Navas, P. (2008). Cytotoxic effects of amitriptyline in human fibroblasts. *Toxicology*, 243(1–2), 51–58.
- Mylan. (2020). *ENDEP (Amitriptyline hydrochloride tablet)*. <https://medicines.org.au/files/afpendep.pdf>
- Nunes-Tavares, N., Nery da Matta, A., Batista e Silva, C. M., Araújo, G. M. N., Louro, S. R. W., & Hassón-Voloch, A. (2002). Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(9), 1071–1079.
- Paris-Palacios, S., Delahaut, L., Carreras, A., Thomas, M., & Biagianti-Risbourg, S. (2013). Catalasic activity in fish liver: improvement of the UV to visible analytic method. *Fish Physiol Biochem*, 39, 957–966.
- Peakall, D. B. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicology*, 3, 157–160.
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar Environ Res*, 93, 106–117.
- Sakar, A., Ray, D., Shrivastava, A. N., & Sarker, S. (2006). Molecular Biomarkers: Their significance and application in

- marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, *15*, 333–340.
- Schmidt, A. J., Heiser, P., Hemmeter, U. M., Krieg, J., & Vedder, H. (2008). Effects of antidepressants on mRNA levels of antioxidant enzymes in human monocytic U-937 cells. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, *32*, 1567–1573.
- Sedeño-Díaz, J. E., & López-López, E. (2013). Freshwater Fish as Sentinel Organisms: From the Molecular to the Population Level, a Review. In H. Turker (Ed.), *New advances and contributions to fish biology* (p. 161). IntechOpen.
- Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Doubkova, V., Marsalek, P., Prokes, M., Tichy, F., Skladana, M., Fiorino, E., Mikula, P., Vecerek, V., Faggio, C., & Svobodova, Z. (2017). Effects of selected tricyclic antidepressants on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, *185*, 1072–1080.
- Simmons, D. B. D., McCallum, E. S., Balshine, S., Chandramouli, B., Cosgrove, J., & Sherry, J. P. (2017). Reduced anxiety is associated with the accumulation of six serotonin reuptake inhibitors in wastewater treatment effluent exposed goldfish *Carassius auratus*. *Sci Rep*, *7*, 1–11.
- Simon, L. M., & Robin, E. D. (1971). Relationship of Cytochrome total consumption activity to vertebrate total and organ oxygen consumption. *Int J Biochem*, *2*(11), 569–573.
- Slamon, N. D., & Pentreath, V. W. (2000). Antioxidant defense against antidepressants in C6 and 1321N1 cells. *Chem-Biol Interact*, *127*, 181–199.
- Soud, G., Souayed, N., Yaktiti, F., & Maaroufi, K. (2013). Ecotoxicology and Environmental Safety Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotox Environ Safe*, *89*, 1–7.
- Storey, K. B. (1996). Oxidative Stress: Animal Adaptations in Nature. *Braz J Med Biol Res*, *29*, 1715–1733.
- Uchida, K. (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Bio Med*, *28*(12), 1685–1696.
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, *13*, 57–149.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J., & Valavanidis, A. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar Pollut Bull*, *54*(9), 1361–1371.
- Vutukuru, S. S., Chintada, S., Madhavi, K. R., Rao, J. V., & Anjaneyulu, Y. (2006). Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in freshwater teleost fish. *Fish Physiol Biochem*, *32*, 221–229.
- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol*, *30*(4), 347–570.
- Xie, Z., Lu, G., Li, S., Nie, Y., Ma, B., & Liu, J. (2015). Behavioral and biochemical responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to sertraline. *Chemosphere*, *135*, 146–155.
- Yang, M., Qiu, W., Chen, J., Zhan, J., Pan, C., Lei, X., & Wu, M. (2014). Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline. *Aquat Toxicol*, *151*, 68–76.
- Ziarrusta, H., Mijangos, L., Izagirre, U., Plassmann, M. M., Benskin, J. P., Anakabe, E., Olivares, M., & Zuloaga, O. (2017). Bioconcentration and Biotransformation of Amitriptyline in Gilt-Head Bream. *Environ Sci Technol*, *51*(4), 2464–2471.
- Ziarrusta, H., Mijangos, L., Prieto, A., Etxebarria, N., Zuloaga, O., & Olivares, M. (2016). Determination of tricyclic antidepressants in biota tissue and environmental waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, *408*(4), 1205–1216.
- Ziarrusta, H., Ribbenstedt, A., Mijangos, L., Picart-Armada, S., Perera-Lluna, A., Prieto, A., Izagirre, U., Benskin, J. P., Olivares, M., Zuloaga, O., & Etxebarria, N. (2019). Amitriptyline at an Environmentally Relevant Concentration Alters the Profile of Metabolites Beyond Monoamines in Gilt-Head Bream. *Environ Toxicol Chem*, *38*(5), 965–977.
- Žikić, R. V., Štajn, A. Š., Pavlović, S. Z., Ognjanović, B. I., & Saičić, Z. S. (2001). Activities of Superoxide Dismutase and Catalase in Erythrocytes and Plasma Transaminases of Goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch) Exposed to Cadmium. *Physiol Res*, *50*, 105–111.