

## 20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

### **MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR: dos congéneres que difieren en un aminoácido y presentan diferente potencial tóxico en un modelo vegetal y uno animal.**

Malaissi, Luciano; [Lucianomalaissi09@hotmail.com](mailto:Lucianomalaissi09@hotmail.com); Juárez, Iván; [ivan\\_juarez@live.com.ar](mailto:ivan_juarez@live.com.ar);

Sedan, Daniela; [danielasedan@yahoo.com.ar](mailto:danielasedan@yahoo.com.ar)

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

---

#### Resumen

MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR son congéneres de hepatotoxinas llamadas Microcystinas presentes en los florecimientos cianobacterianos de la Cuenca del Plata; diferenciadas en la sustitución de Alanina por D-Leucina en la posición 1, involucrada en la unión al sitio activo de las proteínas fosfatasas; su principal mecanismo de acción. **El objetivo fue evaluar los efectos de exposiciones agudas a MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR, sobre un modelo animal (ratones N:NIH Swiss) y uno vegetal (Phaseolus vulgaris).** Hemos observado **variaciones en las dosis letales de [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR (50 µg/kg) respecto de las publicadas para MC-LR (100 µg/kg)**, presentando aumento del % en peso del hígado y hemorragias intrahepáticas en ratones expuestos a dosis de 50 a 200 µg[D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR/kg; y **un principio de esteatosis** luego de una **única dosis i.p. de 25 µg [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR/kg**, ausente en el mismo tratamiento con MC-LR. Los estudios en modelo vegetal, de contacto único durante la imbibición (3,5 y 15 ppm) también mostraron **diferencias en cuanto a la germinación, desarrollo y morfología de las plantas y niveles de TBARs; siendo más afectadas las tratadas con [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR** para una misma dosis. Los valores de **IC<sub>50</sub> para PP1 fueron 35,4 ppb para [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR y 10 ppb para MC-LR.** Al evaluar la actividad fosfatasa **en un homogenato de raíces se vio que [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR inhibió hasta un 30% la actividad de todas las fosfatasas** presentes; mientras que **MC-LR inhibió un 12%**. Nuestros resultados indican que **es necesario profundizar en la toxicidad de [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR, dado que evidentemente puede estar inhibiendo otras fosfatasas presentes, fundamentales para el funcionamiento de las células; que sumado al estrés oxidativo en vegetales podría explicar las diferencias de toxicidad entre ambas.**

**Palabras clave:** Microcystina-LR, [D-Leu<sup>1</sup>]Microcystina-LR, Toxicidad aguda, Ratones, Phaseolus vulgaris

## Introducción

Las cianobacterias son organismos procariontes fotosintetizadores que frecuentemente desarrollan florecimientos en lagos, lagunas, ríos y embalses; favorecidos por el cambio climático (Paerl y Huisman, 2008) y de eutrofización de esos cuerpos de agua dulce (Carmichael, 1989; Codd y col., 1989). Varias especies de cianobacterias tienen la capacidad de producir toxinas, llamadas cianotoxinas en su conjunto, las cuales son de diferente naturaleza química, mecanismos de acción y órgano blanco (Chorus y Batrman, 1999). Dentro de éstas las más frecuentemente halladas son las Microcistinas (MCs). Las MCs son heptapéptidos cíclicos, sintetizados principalmente por cianobacterias del género *Microcystis*. Microcistina-LR (MC-LR) y una variante autóctona de ésta, la [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR, que presenta una sustitución de Alanina por D-leucina en la posición 1 de la molécula, involucrada en la unión covalente de la toxina al sitio activo de las proteínas fosfatasa, principal mecanismo de acción de estas toxinas, se encuentran entre las más tóxicas y ampliamente distribuidas en la cuenca del Río de la Plata (De León y col., 2001; Andrinolo y col., 2007, Echenique y col., 2008) y Río Uruguay (Concordia, Embalse Salto Grande), entre otros (Park y col., 2001; Rosso y col., 2014).

Los principales mecanismos de acción de las MCs, aunque no han sido totalmente dilucidados, son la inhibición específica de las proteínas fosfatasa, principalmente PP1 y PP2A, por unión covalente de la toxina a residuos de Cisteína (Cys) presentes en el sitio activo de las subunidades catalíticas de la enzima (Craig y Holmes, 2000); y la generación de estrés oxidativo mediante inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gehring, 2004).

Numerosos estudios se han llevado a cabo sobre la toxicología de MC-LR sobre animales, principalmente en ratas, ratones y peces; donde se han descrito daños no solo en el hígado sino también en el riñón, intestino delgado, pulmón y sistema inmune de los animales tratados (Milutinovic y col., 2003; Guzman y Solter, 2002; Ding y Ong, 2003; Chen y col., 2004; Zhao y col., 2008; Soares y col., 2007; Andrinolo y col., 2008; Sedan y col., 2010; Lezcano y col., 2012; Sedan y col., 2013).

Una intoxicación aguda con MCs produce inflamación hepática, degeneración focal de los hepatocitos y depósitos de hemosiderina (Fawell y col., 1999), como así también una disrupción de la estructura de los hepatocitos, pérdida de la estructura sinusoidal, aumentos del peso del hígado acompañado de una marcada hemorragia, shock

hemodinámico, falla cardíaca y posterior muerte (Chorus y Batrman, 1999). Mientras que en estudios previos, realizados con exposiciones crónicas de MC-LR en ratones (Andrinolo, y col., 2008), se ha encontrado que se produce un patrón de daño diferente al observado en una exposición aguda, caracterizado por esteatosis hepática con elevación de las enzimas séricas marcadoras de daño hepático (FAL y TGO) y aumentos de los niveles hepáticos de lípidos totales, neutros y polares; y aumento de los indicadores de daño oxidativo (TBARS y ROOHs) en hígado y riñones. En ambos tejidos el daño oxidativo se presentaba con intensidad y evolución temporal similar. Estos hallazgos son particularmente interesantes ya que además se ha demostrado que las alteraciones generadas son reversibles luego de la suspensión del contacto con la toxina (wash-out).

En cuanto a los estudios con estas toxinas sobre modelos vegetales, los trabajos realizados abordan principalmente una exposición de plantas por riego con florecimientos o con agua contaminada fundamentalmente con MC-LR y describen necrosis en hojas e inhibición del crecimiento, fotosíntesis y desarrollo de plantas, relacionado también con el estrés oxidativo generado, que deriva en alteraciones en la actividad de la

peroxidasa (POD) y superóxido dismutasa (SOD), dos enzimas antioxidantes (Kós y col., 1995; Abe y col., 1996; Kurki-Helasma y Meriluoto, 1998; McElhiney y col., 2001; Chen y col., 2004).

Sin embargo, la información toxicológica respecto de [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR con la que contamos hasta el momento es escasa (Matthiensen y col., 2000).

Teniendo en cuenta los mecanismos de acción atribuidos a las MCs, su vinculación con los daños observados y la escasa información con la que contamos sobre los efectos tóxicos de [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR, es necesario avanzar en el estudio de los efectos tóxicos diferenciales que presentan los dos congéneres de MCs más comúnmente hallados en la cuenca del plata, MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR, sobre modelos vegetales y animales con la intención de discriminar si dichos efectos son similares o de diferente intensidad para iguales dosis de cada una de estas cianotoxinas.

### Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Evaluar los efectos de exposiciones agudas a las toxinas MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR, sobre un modelo animal (ratones N:NIH Swiss) y sobre uno vegetal (*Phaseolus vulgaris*).

- Evaluar aspectos vinculados al mecanismo de acción de estas toxinas, como los efectos inhibitorios sobre diversas proteínas fosfatasa.

### **Materiales y Métodos**

Extracción y purificación de MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]-Microcystina-LR mediante HPLC: [D-Leu<sup>1</sup>]-Microcystina-LR y MC-LR fueron purificadas a partir de un florecimiento recolectado del Río de la Plata. Las células fueron lisadas mediante ciclos de sonicación (Omni-Ruptor 400, 15 min, pulsos 50%, potencia 60%), luego se realizó una extracción con Cloroformo/Metanol (50/50 v/v) y la fase acuosa se concentró en rotavapor. El extracto acuoso obtenido se pasó por un filtro Sep-Pack, el cual retiene las toxinas que fueron eluidas posteriormente con metanol 80%. La purificación de las toxinas se llevó a cabo mediante la técnica semipreparativa HPLC (Shimadzu 20A) empleando una columna TERMO Hyperprep HS C18 (250 X 10 mm, 12 µm), loop de 500 µl, detección UV-DAD ( $\lambda = 238$  nm), fase móvil A: Agua (0,05% ácido trifluoro-acético (TFA)), B: Acetonitrilo (0,05% TFA), gradiente de elución: primeros 5 min a 35% B, a los 10 min se alcanza el 55%B y finalmente de los 20 min a los 30 min 35% de B. Las toxinas aisladas fueron caracterizadas mediante HPLC con detección UV-DAD ( $\lambda = 238$  nm)

según Barco y col. (2002) empleando un standard de Sigma.

#### Diseño experimental:

##### Exposición aguda en modelo animal:

Se utilizaron 6 grupos de 4 ratones cada uno (N:NIH Swiss) los cuales fueron inyectados intraperitonealmente con solución fisiológica estéril (control) y con diferentes concentraciones de [DLeu<sup>1</sup>]MC-LR (25, 50, 100 y 200 µg/kg) y MC-LR (100 µg/kg). Se observó la respuesta de los ratones y se determinó el tiempo de muerte. Los que sobrevivieron fueron sacrificados por dislocación cervical, junto con los controles 24 Hs. después de la inyección. Luego de la necropsia se extrajo el hígado y se procesó adecuadamente para realizar determinaciones histológicas mediante tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) (Andrinolo y col., 2008).

##### Exposición aguda en modelo vegetal:

Se emplearon 5 grupos de semillas de *Phaseolus vulgaris*, los cuales fueron expuestos durante la etapa de imbibición a 3,5 ppm y 15 ppm de [DLeu<sup>1</sup>]MC-LR o MC-LR. Como control se empleó agua libre de MCs.

Para ello se colocó cada semilla en un tubo de ensayo con 800 µl de soluciones de MC-LR o [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR de concentración adecuada o agua libre de

MCs. Los tubos así preparados se colocaron en una cámara de temperatura (24°C) durante 24 Hs. Luego, cada grupo de semillas se depositó en arena humedecida con agua libre de MCs y fue mantenido en condiciones de temperatura constante (24°C) y ciclos de luz/oscuridad (14/10 Hs.) con una intensidad de luz de 42  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 10 días para permitir la germinación de las mismas y el posterior desarrollo de las plántulas. Se realizó observación macroscópica diaria de las semillas durante todo el ensayo. Luego de 10 días de desarrollo, se llevó a cabo la toma de muestra determinando sobre las plántulas la longitud de los tallos y raíces principales; largo y ancho de las hojas así como el peso de los tallos, raíces, hojas y cotiledones. Se tomaron fotografías de cada uno de las estructuras de las plántulas. Una hoja de cada planta de los distintos tratamientos fue procesada para la determinación de clorofila. Con las muestras obtenidas se realizaron pools de raíces, hojas, tallos y cotiledones los cuales fueron homogeneizados empleando buffer fosfato 20 mM a pH 7 (3 ml/gr de peso).

#### Determinaciones bioquímicas en tejidos de las semillas tratadas:

La peroxidación lipídica se determinó mediante la técnica de TBARs (Oyhawa,

1979), los niveles de clorofila en hojas fueron determinados según el método descrito por Lichtenthaler 1987 y calculados según las ecuaciones que se muestran a continuación.

$$C_a = 11.24A_{661.6} - 2.04A_{644.8}$$

$$C_b = 20.13A_{644.8} - 4.19A_{661.6}$$

$$C_{a+b} = 7.05A_{661.6} + 18.09A_{644.8}$$

La actividad de PP1 (SIGMA, catalytic subunit) y de un homogenato de raíz de *P. vulgaris* no expuesta a MCs se determinó utilizando el sustrato no específico, p-nitrofenil-fosfato (pNPP) según Lezcano y col. (2012)

#### Análisis estadístico:

Las muestras se analizaron individualmente por triplicado. Los resultados se informaron como la media  $\pm$  SD. Los datos obtenidos fueron analizados en base al test ANOVA mediante el programa Origin (versión 8.0).

### **Resultados y discusión**

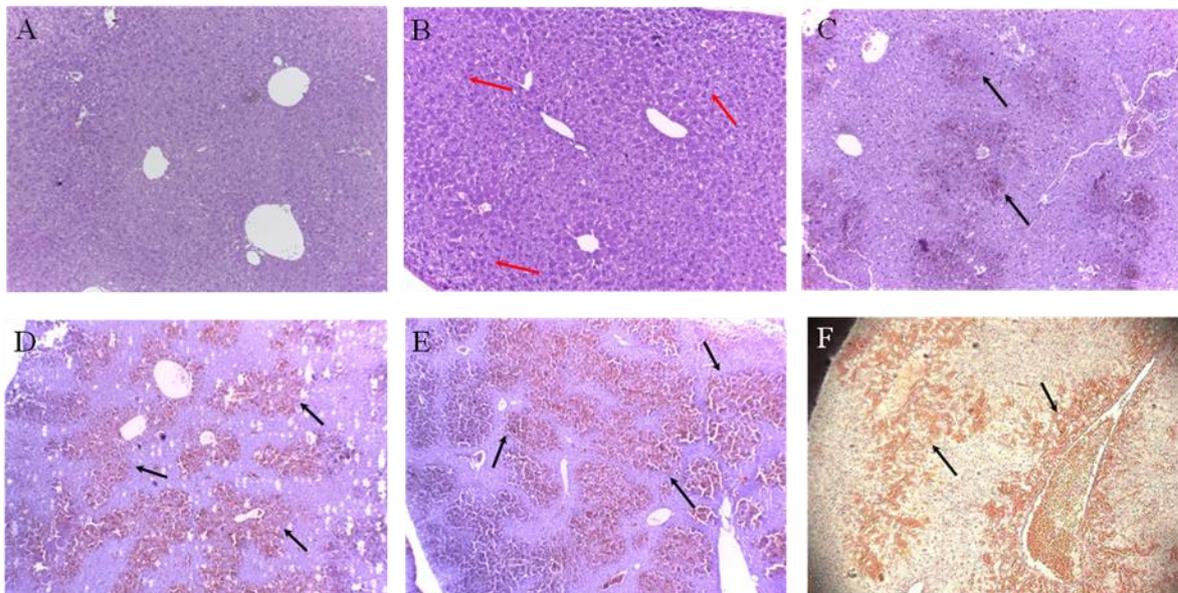
#### 1.- Estudios toxicológicos en modelo animal:

Se realizaron estudios de exposición aguda por vía intraperitoneal en ratones N:NIH Swiss tratados con 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}[\text{D-Leu}^1]\text{MC-LR/kg}$  y 100  $\mu\text{gMC-LR/kg}$ . Los animales tratados con una única administración de 50, 100 y 200  $\mu\text{g}[\text{D-Leu}^1]\text{MC-LR/kg}$  y con 100  $\mu\text{gMC-LR/kg}$  murieron entre los  $212 \pm 43$  minutos y  $94 \pm 11$  minutos post-inyección. Mientras que los animales tratados con 25  $\mu\text{g}[\text{D-Leu}^1]\text{MC-LR/kg}$ , no murieron y fueron sacrificados a las 24 Hs. post-inyección para su estudio histológico. Luego de la necropsia se observaron hígados agrandados, negruzcos y hemorrágicos en los animales tratados con 50, 100 y 200  $\mu\text{g}[\text{D-Leu}^1]\text{MC-LR/kg}$  y con 100  $\mu\text{gMC-LR/kg}$ ; siendo el porcentaje en peso del

hígado mayor al 7% en todos los casos. Los animales tratados con 25  $\mu\text{g}[\text{D-Leu}^1]\text{MC-LR/kg}$  presentaron un porcentaje en peso del hígado de 6,4%; estando el hígado, en este caso, agrandado pero sin características hemorrágicas a nivel macroscópico.

### 1.1.-Alteraciones histológicas en hígados:

En la figura 1 se presentan cortes histológicos representativos de hígados de los animales control y tratados con las distintas dosis de Microcystinas. Vemos que todas las dosis de  $[\text{D-Leu}^1]\text{MC-LR}$  (Fig. 1 B, C, D, E) empleadas en este estudio mostraron alteraciones histológicas en el hígado respecto del control (Fig. A) que presenta una

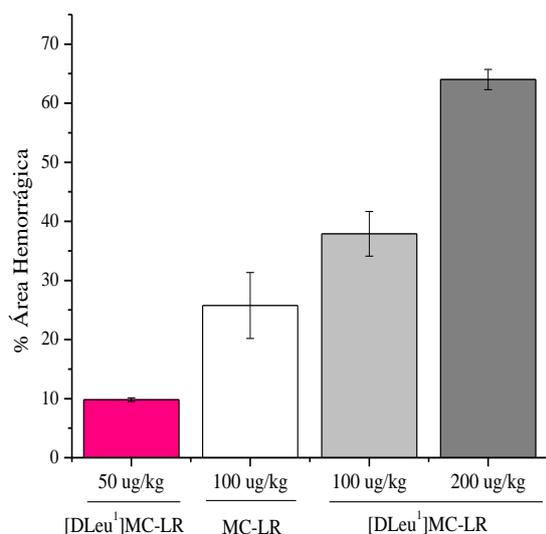


**Figura 1:** Cortes histológicos teñidos con H&E de hígados de ratones control (A) y tratados con una única administración i.p. de 25 (B), 50 (C), 100 (D), 200 (E)  $\mu\text{g}[\text{D-Leu}^1]\text{MC-LR/kg}$  y 100 (F)  $\mu\text{gMC-LR/kg}$ . Las flechas rojas indican zonas de acumulación de lípidos (principio de esteatosis) y las flechas negras indican zonas hemorrágicas.

estructura normal con hepatocitos dispuestos en forma radiada a partir de los vasos.

El daño producido por [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR luego de una única inyección de 50, 100 o 200 µg/Kg está caracterizado por hemorragias centrolobulillares y necrosis de tejido hepático con pérdida de hepatocitos (Fig. 1C, 1D y 1E). Estos daños resultan dosis dependientes ya que la intensidad de los mismos aumenta con la dosis, determinando áreas hemorrágicas% de  $9,80 \pm 0,31$ ;  $37,90 \pm 3,77$  y  $64,00 \pm 1,72$  para las dosis de 50, 100 y 200 µg[D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR/kg respectivamente (Fig. 2).

Así mismo, observamos alteraciones hemorrágicas de similares características a las descritas previamente en el hígado de los animales tratados con 100 µgMC-



**Figura 2:** Área hemorrágica (%) en hígados de ratones tratados con 50, 100 y 200 µg [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR /kg y 100 µgMC-LR /kg.

LR/kg (Fig. 1F), siendo en este caso el área hemorrágica % de  $25,76 \pm 5,58$  % (Fig. 2). Por otro lado, una única administración intraperitoneal de 25 µg[D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR/kg produce un aumento en la acumulación de lípido centrolobulillar, observado como microvacuolización intracitoplasmática que no se ha teñido con H-E, correspondiente con un principio de esteatosis; mientras que no se observó fibrosis, ectasia (congestión vascular), ni hemorragias ya que no se detectan elementos figurados de la sangre en el parénquima (Fig. 1B).

Nuestros resultados indican que tanto [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR como MC-LR son hepatotoxinas, ya que el daño fundamental en este estudio agudo fue en hígado, no encontrándose alteraciones histológicas en ninguno de los órganos estudiados. Las dosis de 50, 100 y 200 µg[D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR/kg resultan ser letales y así mismo, si bien presentan el mismo tipo de lesión (hemorragia centrolobulillar), existe una dosis dependencia en cuanto a la extensión de esa lesión, ya que a medida que aumenta la dosis, las áreas hemorrágicas porcentuales resultan mayores, como así también la necrosis tisular. A su vez, si comparamos los porcentajes de área hemorrágica obtenido para las mismas dosis de tratamientos (100 µg/kg), pero con las dos toxinas, vemos que el de MC-LR es casi un 12%

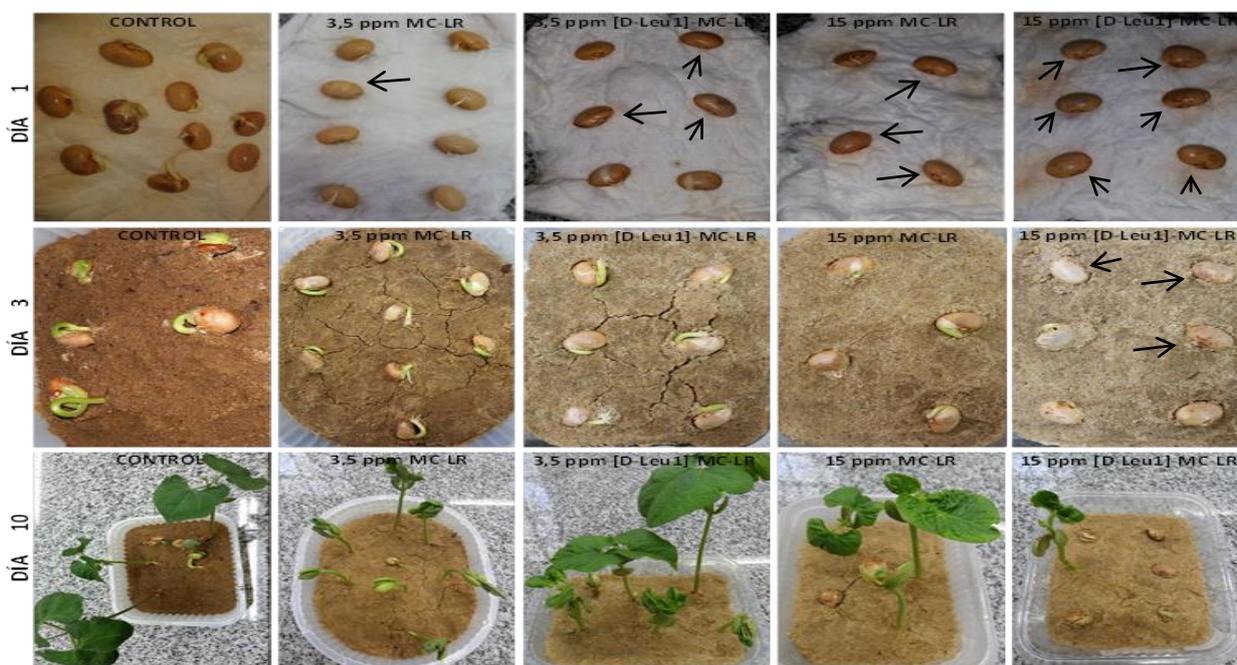
menor que el producido por la toxina [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR.

Nuestros resultados en conjunto indican la posibilidad de que existan diferencias en las LD50 de ambas toxinas, ya que se propone una LD50 de 100 µg/kg para MC-LR (Matthiensen y col., 2000) mientras que, para [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR, según nuestros resultados podría ser menor; encontrándose entre los 25 y 50 µg/kg. Así mismo encontramos diferencias en las alteraciones provocadas por dosis no letales (25 µg/kg) ya que con MC-LR se observan alteraciones luego de 14 dosis intraperitoneales de 25 µg/kg (Andrinolo y col., 2008), mientras que en el caso de [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR, luego de una única

administración intraperitoneal de 25 µg/kg se observa esteatosis centrolobulillar.

## 2.- Estudios toxicológicos en modelo vegetal:

Se realizaron estudios de una única exposición de 3,5 y 15 ppm de [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR y MC-LR, durante la etapa de imbibición de semillas de *Phaseolus vulgaris*.



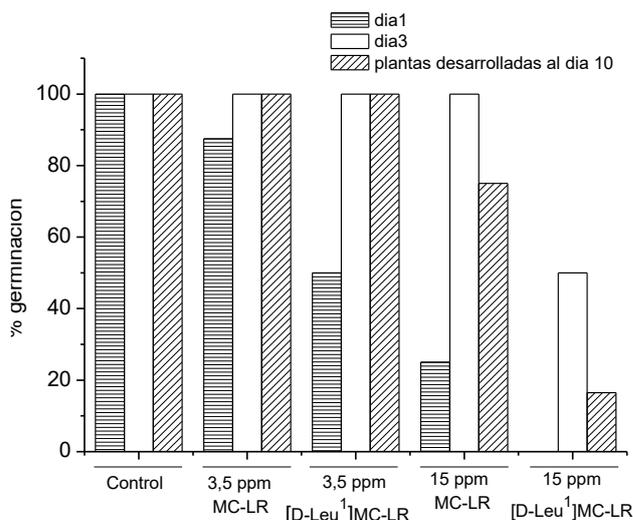
**Figura 3:** Imágenes representativas del desarrollo de las semillas y plántulas tratadas con 3,5 ppm, 15 ppm de MC-LR o [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR, y controles durante los días posteriores a la imbibición (días 1, 3 y 10). Las flechas indican las semillas no germinadas.

### 2.1.- Alteraciones en el crecimiento y desarrollo de plántulas:

Los grupos tratados con las concentraciones más altas de toxina (15 ppm de [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR y MC-LR) fueron los más afectados en su germinación (Fig. 3). Ambos grupos presentaron un retraso en el tiempo de germinación dado que las semillas desarrollaron radículas 3 días después de la imbibición mientras que los controles las presentaron al día siguiente.

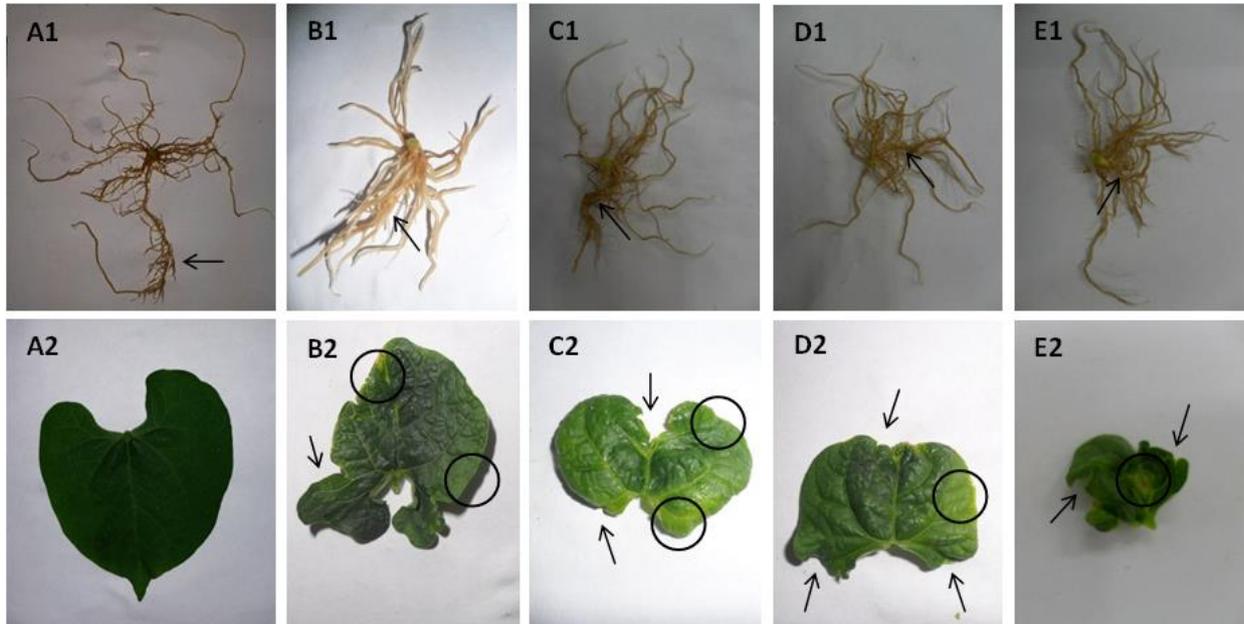
En este sentido cabe destacar que al día 3 todas las semillas tratadas con 15 ppm de MC-LR presentaron radículas, mientras que en el caso de las tratadas con 15 ppm de [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR solo el 50% presentaron radículas (Fig. 4). Asimismo en ninguno de estos dos grupos la totalidad de las semillas germinadas completó el desarrollo, siendo mayor este efecto para 15 ppm de [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR ya que produjo un % de desarrollo de plántulas al día 10 de 16,5% en comparación con la misma concentración de MC-LR (75%). En el caso de las semillas expuestas a 3,5 ppm de toxina se registró en el día 1 un 87% de germinación para el tratamiento con MC-LR y 50 % para [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR; valores mayores que los obtenidos con 15 ppm de estas toxinas (25% para MC-LR y 0% para [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR) (Fig. 4).

Luego de 3 días, a diferencia de lo ocurrido con el tratamiento con 15 ppm [D-



**Figura 4:** Porcentaje de germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris* luego de 1 día (rayado horizontal) o 3 días (barras blancas) posteriores a la imbibición, y porcentaje de plantas desarrolladas luego de 10 días (rayado oblicuo).

Leu<sup>1</sup>]-MC-LR, todas las semillas tratadas con 3,5 ppm de ambas toxinas germinaron y desarrollaron plántulas luego de 10 días. En la figura 5 se presentan fotos representativas de raíces y hojas de las plántulas con 10 días de desarrollo para los tratamientos con toxina y controles.

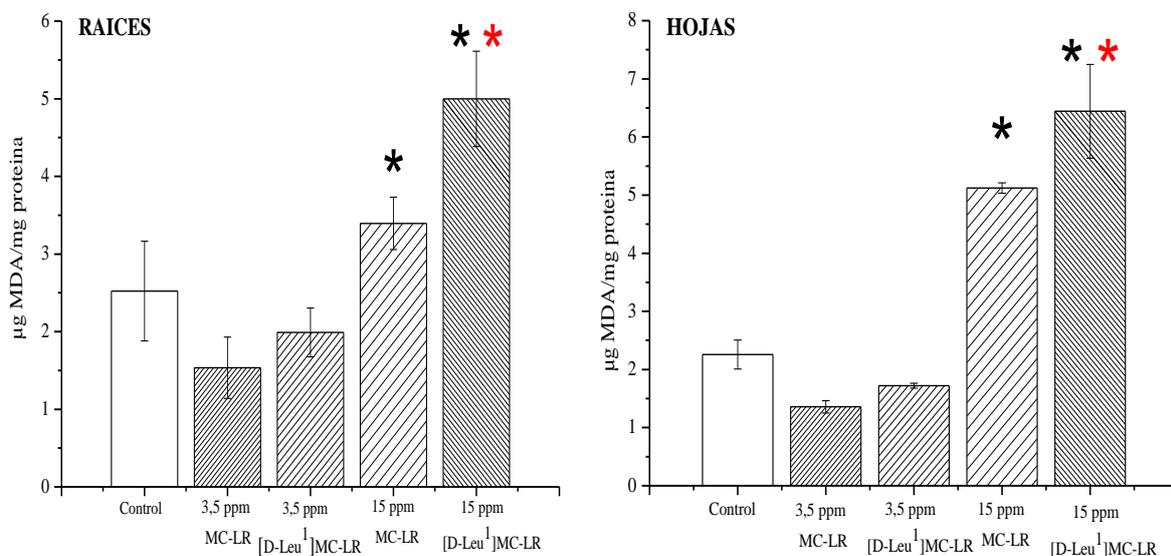


**Figura 5:** Imágenes representativas de raíces y hojas obtenidas de plántulas control (A1 y A2), tratadas con 3,5 ppm de MC-LR (B1 y B2), 3,5 ppm de [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR (C1 y C2), 15 ppm de MC-LR (D1 y D2) y 15 ppm de [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR (E1 y E2). Las flechas indican las raíces principales y zonas con cambios morfológicos en hojas y los círculos las regiones con disminución de pigmentos.

La longitud de la raíz principal fue menor en todas las plántulas de los distintos tratamientos con respecto al control. Las provenientes de los tratamientos con 3,5 ppm de MC-LR y de [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR presentaron un mayor número de raíces laterales en comparación con el control. Las plántulas que lograron desarrollarse con los tratamientos con 15 ppm de MC-LR (3 de 4) y [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR (1 de 6) también presentaron un aumento del número de raíces laterales respecto del control.

Las hojas de las plantas controles son de color verde intenso homogéneo y presentan formas acorazonadas de bordes lisos. Mientras que las de los

tratamientos con 3,5 ppm de MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR fueron más pequeñas y mostraron una alteración general en su forma, con bordes rugosos e irregulares y zonas con clorosis (disminución de la pigmentación) en la periferia de las hojas (*círculos en Fig. 5*). Estas características se vieron incrementadas en los tratamientos con 15 ppm de MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR.



**Figura 6:** Peroxidación lipídica medida como µg malondialdehído (MDA)/mg proteína en hojas y raíces. (\*) indica diferencias significativas en los niveles de MDA con respecto al control y (\*) respecto al tratamiento con 15 ppm de MC-LR en base al test ANOVA ( $p < 0.05$ ).

Nuestros resultados indican una alteración concreta a nivel macroscópico luego del tratamiento por único contacto con ambas toxinas estudiadas; existiendo, al igual que en el modelo animal descrito previamente una mayor intensidad de daño en los ejemplares tratados con [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR.

## 2.2.- Alteraciones bioquímicas en modelo vegetal:

### 2.2.1.- Peroxidación lipídica:

Teniendo en cuenta que el favorecimiento de la formación de ROS es uno de los mecanismos de acción reconocidos para estas toxinas, evaluamos los niveles de hidroperóxidos en los dos tejidos vegetales que se vieron mayormente afectados por los tratamientos, raíces y hojas.

Los niveles de hidroperóxidos mostraron aumentos significativos en hojas y raíces de las plántulas provenientes de la semillas tratadas con 15 ppm de MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR (Fig. 6), mientras que las tratadas con 3.5 ppm de toxina no mostraron diferencias significativas con respecto al control.

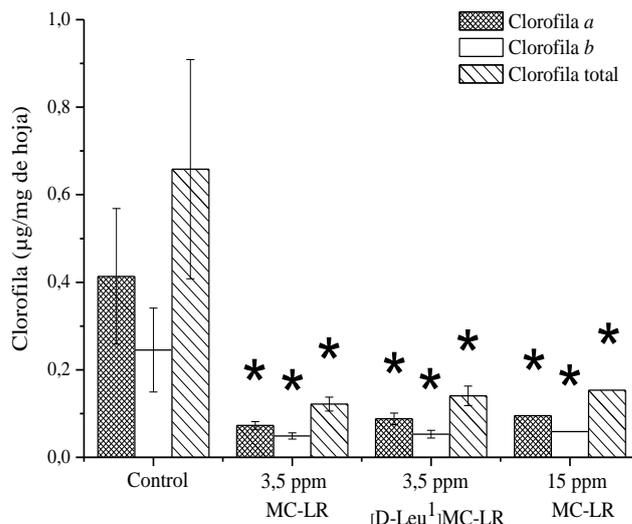
A su vez, hay una diferencia significativa en los niveles de hidroperóxidos obtenidos en los tratamientos de 15 ppm para ambas toxinas, siendo los niveles presentes en la planta tratada con [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR, mayores en comparación con los de MC-LR.

### 2.2.2.- Clorofila a, b y total:

Dada la alteración a nivel macroscópico observada en cuanto a la coloración de las hojas y las zonas de clorosis presentes en las plántulas tratadas con las toxinas, realizamos una medición de las distintas clorofilas presentes en las hojas.

Los niveles de clorofila a, b y total fueron menores para todos los tratamientos con toxina respecto del control (Fig. 7), pero no han mostrado diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de toxinas empleadas, ni entre las toxinas MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR.

Las alteraciones observadas a nivel macroscópico se vinculan con los hallazgos a nivel de los parámetros bioquímicos analizados; ya que las zonas de clorosis observadas en las hojas tienen su correlato en los niveles de clorofila disminuidos. Esta disminución, a su vez, se correlaciona con un ambiente pro-oxidativo que degrade a la clorofila, tal como el que ocurre luego del tratamiento de las semillas con estas toxinas y como queda evidenciado por el aumento de peroxidación lipídica encontrado especialmente para altas concentraciones de estas toxinas.



**Figura 7:** Niveles de clorofila (µg/mg de hoja) total (barras a rayas), a (barras a cuadros) y b (barras lisas) en hojas de plántulas tratadas con diferentes concentraciones de MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR. (\*) Indica diferencias significativas respecto del control en base al test ANOVA (p<0.05).

### 3.- Efectos de [D-Leu<sup>1</sup>]-MC-LR y MCLR sobre actividad de proteínas fosfatasa:

Realizamos la evaluación de los efectos de ambas toxinas sobre la actividad de una de las proteínas fosfatasa identificadas como diana en el mecanismo de acción de las mismas (PP1 comercial) y sobre la actividad fosfatasa total presente en un tejido vegetal (raíces); enfrentando estos materiales a concentraciones de toxinas entre 0,1 ppb y 1 ppm.

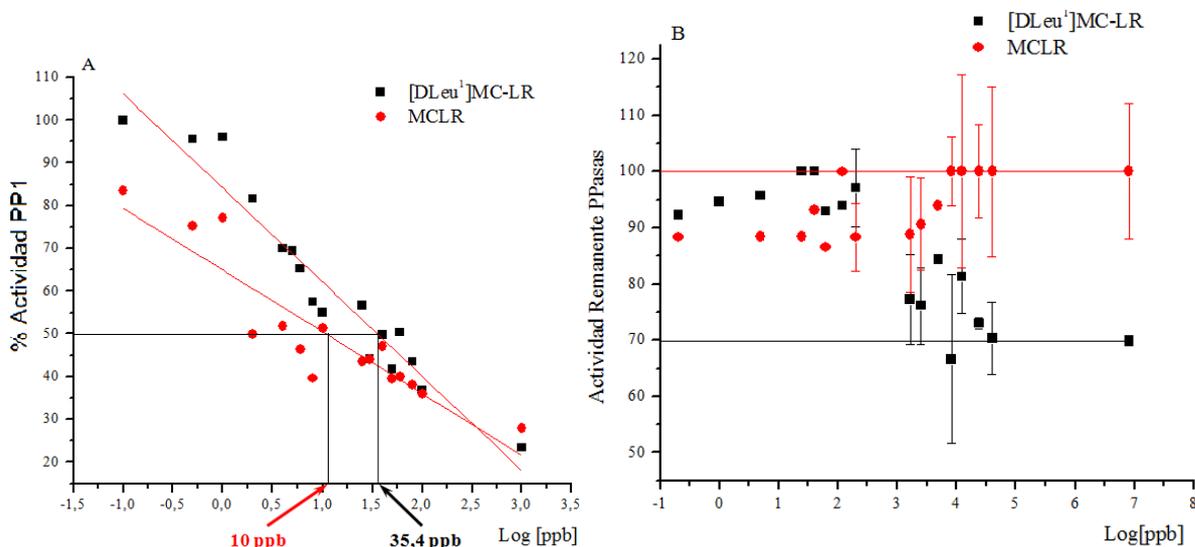
La actividad de PP1 se vio disminuida a concentraciones crecientes de ambas toxinas (Fig. 8.A) Sin embargo, se observó diferencia en la IC50 obtenida para cada

una de ellas; siendo de 10 ppb para MC-LR y de 35,4 ppb para [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR.

Al evaluar la actividad remanente de fosfatasa en raíces, frente a diferentes concentraciones de ambas toxinas (Fig. 8.B), se puede observar que la máxima inhibición en el caso de los tratamientos con MC-LR alcanza un 12%, mientras que en el caso de [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR el porcentaje de inhibición de proteínas fosfatasa es de un 30%.

Nuestros resultados, a diferencia de lo observado por Matthiensen y col. (2000), indican que estas dos toxinas si bien comparten los efectos inhibitorios sobre las proteínas fosfatasa PP1 y PP2A, presentan diferencias en cuanto a la

Leu<sup>1</sup>]MC-LR (IC<sub>50</sub> = 34.5ppb), si sólo consideramos los efectos sobre PP1 en particular, vinculada tradicionalmente a los mecanismos de acción de MCs. Sin embargo, los resultados de la inhibición de la actividad fosfatasa total presente en un tejido, como puede ser raíces, nos indican que la potencia de los efectos inhibitorios se invierte; siendo más importante para [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR (70% actividad remanente) que para MC-LR (88% actividad remanente). En este último caso debemos tener en cuenta que mediante la determinación de actividad fosfatasa que se llevó a cabo con un sustrato no específico como el p-nitrofenilfosfato estamos midiendo la actividad de todas



**Figura 8:** (A) IC<sub>50</sub> de MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR frente a PP1. (B) Actividad remanente de fosfatasa frente a concentraciones crecientes de MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR.

potencia de inhibición sobre éstas; siendo más importante la inhibición producida por MC-LR (IC<sub>50</sub> = 10ppb) que la de [D-

las fosfatasa presentes en el tejido y no solamente la actividad de PP1 y PP2A. Por lo tanto, el hecho de que la inhibición

con [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR sea mayor en esta situación, podría indicar que esta toxina además de inhibir PP1 y PP2A podría tener acciones inhibitorias sobre otras proteínas fosfatasa diferentes de PP1 y PP2A; o que al menos, MC-LR no inhibe a las otras proteínas fosfatasa presentes en el tejido de manera tan pronunciada como lo [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR.

Esta situación de inhibición más extendida en cuanto a la actividad de las proteínas fosfatasa podría dejar a la célula en una situación de hiper-fosforilación más pronunciada que genere mayores alteraciones en las vías celulares reguladas por procesos de fosforilación/desfosforilación, fundamentales para el correcto desarrollo y funcionamiento celular; y podría explicar la diferencia en cuanto a los efectos tóxicos que presentamos en este trabajo luego de una exposición aguda a estos dos congéneres de MCs, llevada a cabo en un modelo animal y en un modelo vegetal; donde los daños observados para una misma dosis resultan más intensos para [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR que para MC-LR.

### Conclusiones

Nuestros resultados acerca de la evaluación de los efectos tóxicos de una exposición aguda mediante un único contacto a diferentes dosis o concentraciones de MC-LR y [D-Leu<sup>1</sup>]MC-

LR indican que si bien estas toxinas presentan ligeras diferencias estructurales, como la sustitución de un solo aminoácido en la posición 1 de la molécula, la diferencia en cuanto a la potencia tóxica de las mismas resulta relevante.

Esta diferencia en toxicidad se evidenció tanto en un modelo animal, donde si bien el órgano blanco de ambas fue el hígado y el patrón de daño fue similar; la intensidad del mismo fue mayor para [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR que para MC-LR. Esta misma situación se observó en los estudios sobre un modelo vegetal presentados en este trabajo. Por lo tanto las alteraciones encontradas resultan concentración y congéneres dependiente.

Los hallazgos bioquímicos en los ensayos de peroxidación lipídica y actividad fosfatasa, los principales mecanismos de acción de estas toxinas, podrían explicar los resultados observados en cuanto a la diferencia de intensidad de efectos tóxicos entre ambos congéneres.

Por lo tanto, resulta necesario continuar avanzando en el conocimiento de los mecanismos por los cuales ambas toxinas generan los daños, tal como la dilucidación de cuales proteínas fosfatasa son inhibidas de forma diferencial por [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR; así como sobre diversas condiciones de exposición de animales y vegetales a estas toxinas

de forma aislada y en conjunto, teniendo en cuenta que frecuentemente se encuentran presentes en florecimientos en cuerpos de agua de la región y que resultan un riesgo para la población que entra en contacto con dichos cuerpos de agua.

### Bibliografía

- Abe, T., Lawson, T., Weyers, J.D.B., Codd, G.A., 1996. Microcystin- LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytologist* 133, 651-658.
- Andrinolo D, Pereira P, Giannuzzi L, Aura C, Massera S, Caneo M; Caixach J, Barco M & Echenique R. 2007. Occurrence of *Microcystis aeruginosa* and microcystins in Rio De La Plata River (Argentina). *Acta Toxicológica Argentina*, 15: 13-18
- Andrinolo, D., Sedan, D., Telese, L., Aura, C., Maser, S., Giannuzzi, L., Marra, C., Alaniz, M.T. 2008. Recovery after damage produced by subchronic intoxication with the cyanotoxin microcystin LR. *Toxicon*. 51, 457–467.
- Barco, M., Rivera, J., Caixach, J., 2002. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 959, 103–111.
- Carmichael, W.W., 1989. Fresh water cyanobacteria (blue-green algae) toxins. In: Own by, C.A., Odell, G.V. (Eds.), *Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics*, Pergamon Press, Oxford, pp. 3–16.
- Chen, J.Z., Song, L., Dai, E., Gan, N., Liu, Z., 2004. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassicanapus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon* 43, 393–400.
- Chorus I, Bartram J. 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. F & FN Spon, London.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Brooks, W.P., 1989. Cyanobacterial toxins in water. *WaterSci. Technol.* 21, 1–13.
- Craig, M. and Holmes C.F.B. 2000. *Freshwater Hepatotoxins: Microcystin and Nodularin, Mechanisms of Toxicity and Effects on Health*. In: L.M. Botana (Ed.) *Seafood and freshwater toxins*. Marcel Dekker, New York. pp 643-671.
- De León L. & Yunes J. 2001. First report of a *Microcystis aeruginosa* toxic bloom in La Plata River. *Environmental Toxicology*, 16 (2): 110-112
- Ding, W.X., Shen, H.M., Zhu, H.G., Ong, C.N., 1998. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ Res.* 78(1), 12-8.

- Echenique R, Rodríguez J, Caneo M, Gianuzzi L, Barco M, Rivera J, Caixach J & Andrinolo D. 2008. Microcystins in the drinking water supply in the cities of Ensenada and La Plata (Argentina). *Anais do XICBFic Livros do Museu Nacional, Brasil*: 125-129
- Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. *Hum Exp Toxicol*. 18(3):162-7.
- Gehring MM. 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Letters*, 57(1-3): 1-8
- Kós, P., Gorzó, G., Surányi, G., Borbély, G. 1995. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry* 225, 49-53.
- Kurki-Helasma, K., Meriluoto, J., 1998. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon* 36, 1921–1926.
- Lezcano, N., Sedan, D., Lucotti, I., Giannuzzi, L., Vittone, L., Andrinolo, D. and Mundiña-Weilenmann C. 2012. Subchronic microcystin-LR exposure increased hepatic apoptosis and induced compensatory mechanisms in mice. *J Biochem Mol Toxicol*. Vol: 26 No: 4, pp 131-138.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology Plant Cell Membranes*, 350-382.
- Matthiensen, A., Beattie, K. A., Yunes, J. S., Kaya, K., Codd, G. A. 2000. [D-Leu1]-Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry* 55: 383-387.
- McElhiney, J., Lawton, L.A., Leifert, C., 2001. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* 39, 1411–1420.
- Milutinovic, A., Zivin, M., Zorc-Pleskovic, R., Sedmak, B., Suput, D., 2003. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins-LR and -YR. *Toxicon* 42, 281–288.
- Oyhawa, H., Oshishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipoperoxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358
- Park, H., Namikoshi, M., Brittain, S.M., Carmichael, W.W., Murphy, T., 2001. [D-Leu1] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. *Toxicon*; 39(6): 855-862.
- Pearl, H., Huisman, J., 2008. Blooms like it hot. *Science*, vol. 320, 57-58.

- Rosso, L., Sedan, D., Kolman, M., Caixach, J., Flores, C., Oteiza, J.M., Salerno, G., Echenique, R., Giannuzzi, L., Andrinolo, D. 2014. *Microcystis aeruginosa* strain [D-Leu1] Mcyst-LR producer, from Buenos Aires province, Argentina. *Journal of Coastal Life Medicine* 2(4): 287-296.
- Sedan D, Andrinolo D, Telese L, Giannuzzi L, Alaniz MT & Marra CA. 2010. Alteration and recovery of the antioxidant system induced by sub-chronic exposure to microcystin-LR in mice: Its relation to liver lipid composition. *Toxicon*, 55: 333–342
- Sedan, D., Giannuzzi, L., Rosso, L., Marra, C. A., & Andrinolo, D. (2013). Biomarkers of prolonged exposure to microcystin-LR in mice. *Toxicon*, 68, 9-17.
- Soares R, Cagido V, Ferraro R, Meyer-Fernandes J, Rocco P, Zin W & Azevedo S. 2007. Effects of microcystin-LR on mouse lungs. *Toxicon*, 50: 330–338
- Zhao, Y., Xie, P., Tang, R., Zhang, X., Li, L., Li, D. 2008. In vivo studies on the toxic effects of microcystins on mitochondrial electron transport chain and ion regulation in liver and heart of rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 148: 204-210.