

**Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.**

**Núcleo Disciplinario/Comité Académico: PRODUCTOS NATURALES BIOACTIVOS Y SUS APLICACIONES.**

**Título: RECUPERACIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO PRODUCIDO POR INTOXICACIONES SUBCRONICAS CON LA CIANOTOXINA MICROCYSTINA-LR, UN INHIBIDOR DE PP2A.**

**Autores:** Sedan, Daniela

Telese, Luis

Giannuzzi, Leda

Andrinolo, Darío

Aura, Claudia

**E-Mail de los autores:** [danielasedan@yahoo.com.ar](mailto:danielasedan@yahoo.com.ar)

[lht15\\_5@yahoo.com.ar](mailto:lht15_5@yahoo.com.ar)

**Palabras Clave:** Microcystina, Cianobacterias

**Área Temática:** Salud

#### INTRODUCCIÓN:

Los florecimientos de cianobacterias existentes en cuerpos de agua dulce, principalmente debido a la fuerte eutrofización de los mismos, son los responsables de la síntesis de un variado grupo de cianotoxinas. Las Microcystinas pertenecen a este grupo y son las toxinas encontradas con mayor frecuencia. Se clasifican de acuerdo a su órgano blanco como hepatotoxinas y hasta el momento se han identificado al menos 50 congéneres de Microcystinas. Todas ellas son heptapéptidos monocíclicos de estructura general ciclo (D-Ala-X-D-MeAsp-Y-Adda-D-Glu-Mdha), donde X e Y son aminoácidos variables, Mdha es Metildehidroalanina y Adda es un aminoácido característico de 20 carbonos (3-amino-9-metoxi-2,6,8 trimetil-10fenil-4,6ácido diecadenónico). Las distintas Microcystinas difieren entre sí en el grado de metilación, la configuración de Adda o los aminoácidos que ocupan las posiciones X o Y. (Rinehart et al, 1994). La Microcystina-LR (Myc-LR), la más tóxica y comúnmente hallada en los cuerpos de agua dulce, presenta en las posiciones X e Y Leucina y Arginina respectivamente.

Las Microcystinas inhiben específicamente la actividad de las proteínas fosfatasa de tipo I y IIA mediante la unión covalente de la toxina a las subunidades catalíticas de la enzima. En general se une a residuos de Cisteína (Cys) presentes en la enzima aunque también pueden unirse a grupos -SH presentes en compuestos como glutatión reducido (GSH). Estas toxinas también generan estrés oxidativo evidenciado por un aumento en la producción de especies de

oxígeno reactivas (ROS) y de los niveles de GSH intracelular, lo cual induce un aumento en la peroxidación lipídica (Bouaïcha et al .2004).

La presencia de éstas toxinas en el agua potable ha sido fuente de intoxicaciones agudas y crónicas. En febrero de 1996 en Caruaru (Brasil), pacientes de un centro de diálisis fueron dializados con agua que se encontraba contaminada con Microcystinas, 100 de estos pacientes desarrollaron falla hepática aguda y 56 pacientes murieron en Diciembre de ese año. Los análisis practicados en suero e hígado de estos pacientes determinaron que el principal factor que contribuyó a la muerte de los pacientes fue la exposición intravenosa a Microcystinas durante el proceso de diálisis (Carmichael et al, 1997)

Los daños hepáticos asociados con la intoxicación aguda se caracterizan por inflamación, degeneración focal de hepatocitos, depósitos de hemosiderina, pérdida de estructura sinusoidal, aumento de peso del hígado, marcada hemorragia intrahepática, shock hemodinámico, falla cardíaca y muerte (Hooser et al , 1990).

La exposición de grupos humanos a estas toxinas no ha sido suficientemente estudiada. Las condiciones ambientales características de la época estival en zonas templadas favorecen particularmente el desarrollo de florecimientos de cianobacterias, en consecuencia la población podría estar expuesta a intoxicaciones subcrónicas e intermitentes debido a la aparición de estas toxinas en la red de agua potable como sucede en las ciudades de Ensenada y La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina.

La presencia de estas toxinas en cuerpos de agua utilizados para el consumo humano ha sido fuertemente correlacionada con una alta incidencia de cáncer primario de hígado (Carmichael et al, 1997).

En el presente trabajo se realizaron estudios de exposición subcrónica a Myc-LR administrando dosis subletales de 25µg/kg cada 48 hs. durante un mes, seguido de períodos de 1 y 2 meses sin exposición a la toxina (wash-out) con la intención de determinar los daños producidos en hígado y riñón de los animales tratados, así como la posibilidad de reversión de los mismos. Con tal fin se analizaron los pesos corporales y del hígado de los animales, se realizaron estudios histopatológicos sobre los hígados y riñones de los ratones sometidos al procedimiento, determinaciones bioquímicas de marcadores plasmáticos característicos de daño hepático y función renal; y mediciones de contenido de lípidos totales, fosfolípidos y lípidos neutros en hígado.

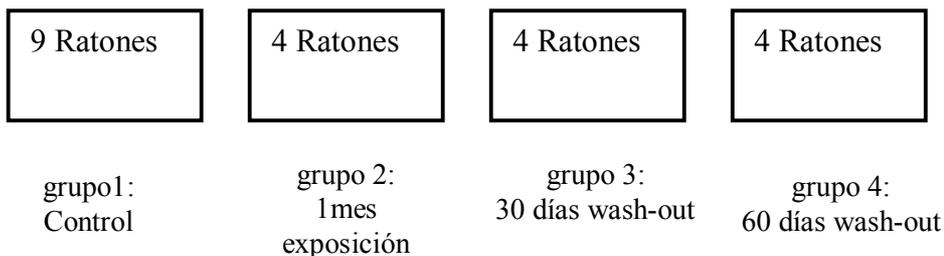
## DESARROLLO:

### Materiales y Métodos:

#### Animales:

Se utilizaron 21 ratones machos adultos (20-22 gr) procedentes del lote N:NIH-S obtenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP

Para el ensayo se utilizaron 4 grupos con la siguiente disposición de los animales:



#### Diseño Experimental:

##### Dosis de Myc-LR empleada:

La dosis de 25 µg/kg fue elegida teniendo en cuenta el valor de la  $DL_{50} = 50$  µg/kg con la intención de generar un daño evidente en el hígado, para luego poder observar la recuperación.

##### Intoxicación subcrónica:

Los animales de los grupos 2, 3 y 4 fueron tratados con dosis de 25 µg/Kg de Myc-LR inyectadas intraperitonealmente cada 48 hs durante 1 mes. Los especímenes control se inyectaron con una cantidad equivalente de solución fisiológica estéril, administrada con la misma frecuencia y durante el mismo período de tiempo. Los ratones de la jaula 2 fueron sacrificados al cumplirse el mes de inyección. El grupo de la jaula 3 se sacrificó después de 30 días sin administración de la toxina (wash-out) y el grupo 4 después de 60 días de wash-out. De cada uno de estos animales, incluidos los controles, se extrajeron muestras de sangre empleando citrato de sodio como anticoagulante antes de que fueran sacrificados y sometidos a necropsia. Los hígados obtenidos se pesaron y se fraccionaron, almacenando uno de los lóbulos inmediatamente en solución de formol al 15% para realizar el correspondiente estudio histológico, y el otro lóbulo se colocó en buffer antioxidante para determinación de lípidos. Los riñones de los especímenes estudiados fueron almacenados en solución de formol al 15% y sometidos a técnicas histológicas.

### Purificación de Myc-LR:

La toxina usada en este trabajo fue aislada de un florecimiento de *Microcystis aeruginosa* recolectado del Río de la Plata. Las células se lisaron mediante 3 ciclos de congelado-descongelado, luego se realizó una extracción con Cloroformo/Metanol (50/50 v/v) y la fase acuosa se concentró en rotovapor. La purificación de la toxina se llevó a cabo mediante la técnica semipreparativa HPLC con un 98% de pureza. Para ello se empleó una columna TERMO Hyperprep HS C18 (250x10 mm), realizando una corrida semipreparativa con loop de 500µl, régimen isocrático y detección UV-visible ( $\lambda= 238\text{nm}$ ). La identidad de la toxina fue confirmada mediante cromatografía Líquida de Alta resolución con detección Masa-Masa, modo ionización positiva (CL/ESI (+) -MS-MS) en el laboratorio de Espectrometría de Masas. Departamento de Ecotecnología del Instituto de Investigaciones Químicas de Barcelona. Barcelona, España.

### Ensayos Bioquímicos:

Sobre el plasma obtenido de las muestras de sangre extraídas de los ratones estudiados, se realizaron ensayos enzimático-colorimétricos utilizando kits comerciales para determinar los niveles en sangre de las enzimas Fosfatasa Alcalina (FAL), Transaminasas Hepáticas TGO y TGP, así como los niveles de urea y creatinina.

### Técnicas Histológicas:

Los hígados formolados fueron fijados e incluidos en parafina. Se obtuvieron secciones de 3 µm con un micrótopo, se practicaron las siguientes tinciones y se observaron al microscopio óptico.

#### *\* Tinción de Hematoxilina-Eosina:*

La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico perteneciente a los xantenos. Los núcleos se observan de color azul, los citoplasmas en rosa y los glóbulos rojos en tono rojo-anaranjado.

#### *\* Técnica de Ácido Periódico-Schiff (PAS):*

Se emplea para determinar la presencia de moléculas como glucógeno, glucoproteínas y glucosaminoglucanos. El ácido periódico rompe la unión de los anillos de las hexosas o los enlaces de las hexoaminas de los glucosaminoglucanos formando grupos aldehído que reaccionan con el reactivo de Schiff (leucofucsina o bisulfato de fucsina) dando un color rojo-fucsia.

#### *\* Tinción de Gomori:*

Las tinciones tricrómicas se utilizan para el estudio del tejido conectivo. La técnica de Gomori se desarrolla en un solo paso que combina la tinción de los tejidos citoplásmico y conectivo con solución de ácido fosfotúngstico/ ácido acético. Los núcleos se tiñen con hematoxilina férrica, seguida de tinción con cromotropo R2 (se tiñen las fibras citoplásmicas) y Fast Green FCF (se tiñen las fibras del tejido conectivo). Los núcleos se verán de color azul a negro, el tejido conectivo en color verde y el citoplasma rojo.

#### Determinación de Lípidos:

La extracción de lípidos se realiza siguiendo el método de Folch et al, 1957. Los fosfolípidos y lípidos neutros se separaron de los extractos anteriores mediante cromatografía de microcolumna descrito por Hanahan et al, 1957. Las fases orgánicas conteniendo los lípidos neutros o polares fueron luego sometidas a los procesos cromatográficos descritos por Malins et al, 1960 y Neskovic et al, 1968, obteniéndose una eficiencia en recuperación de lípidos neutros del 89% y de fosfolípidos del 96%.

Los lípidos totales y los neutros fueron estimados gravimétricamente por evaporación bajo N<sub>2</sub> hasta peso constante (Marra, C., 1990). Los fosfolípidos se midieron también como contenido de fósforo (P.S. Chen, 1956) luego de la mineralización de una alícuota de la muestra.

#### RESULTADOS:

##### Pesos de hígados y ratones:

El aumento de peso de los animales tratados no difiere significativamente del encontrado en los ratones control (Fig. 1). En concordancia con esto la apariencia y el comportamiento de los animales inyectados con Myc-LR fueron completamente normales y no existieron signos ni síntomas que permitieran diferenciarlos del grupo control.

Sin embargo se registraron variaciones significativas en cuanto al peso y coloración de los hígados de los ratones expuestos a la toxina, siendo estos más oscuros, respecto de los controles (Fig. 1).

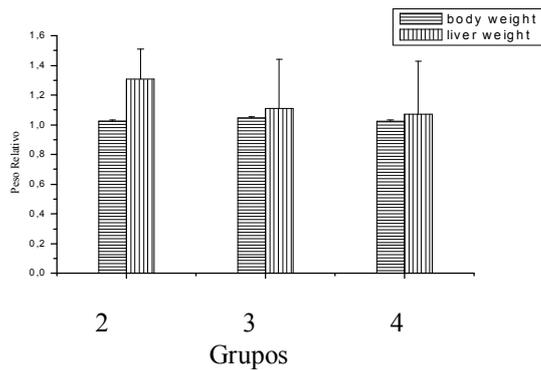
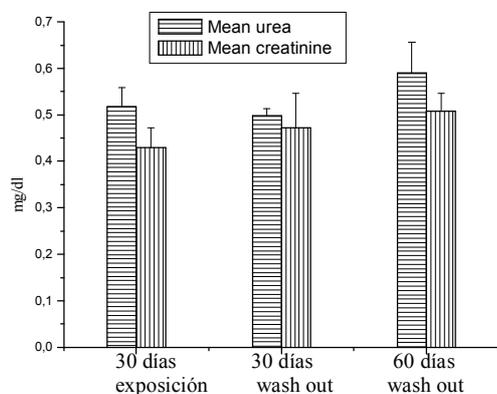


Fig.1 Peso corporal y de hígado normalizados

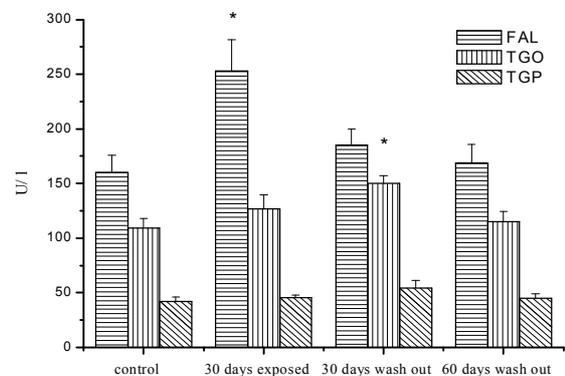
Ensayos bioquímicos:

Los niveles plasmáticos de FAL presentaron un significativo incremento respecto de los valores de los controles al finalizar el mes de exposición, que revierte hasta alcanzar valores normales durante el tiempo de wash-out (Fig. 2b). En el caso de los niveles de TGO se ha registrado un aumento significativo durante los primeros 30 días de recuperación, que luego baja hasta alcanzar registros normales (Fig.2b).

Así mismo no se encontraron alteraciones significativas en los valores de TGP, urea y creatinina (Fig. 2 a y b).



a) Urea y Creatinina plasmáticas



b) FAL, TGO, TGP plasmáticas.

Fig. 2: Evolución de los marcadores de función hepática y renal durante el tiempo de experimentación. Los cambios significativos se indican con asteriscos.

Estudios histológicos:

No se observaron alteraciones histopatológicas a nivel renal, mientras que el daño hepático encontrado fue importante.

A diferencia de los cortes controles donde se observaron hepatocitos y sinusoides normales con una clara disposición radial de las células en torno al vaso principal (Fig. 3a), tejido

conjuntivo homogéneamente distribuido en el parénquima y formando un denso anillo en la pared del vaso (Fig. 4a); en los cortes de hígados, teñidos con la técnica Hematoxilina-Eosina, de los animales sometidos a un mes de tratamiento con la toxina (Fig.4b) se ha observado la presencia de intensa vacuolización citoplasmática, binucleación acompañada de discariosis nuclear, núcleos visiblemente aumentados en tamaño, con vesiculación y replegados hacia la periferia de la célula debido a que las vacuolas ocupaban la mayor parte del citoplasma. Presentaban también una importante pérdida de la estructura hepática denotada por una clara alteración en los sinusoides hepáticos. Así mismo no se ha observado fibrosis, congestión vascular (ectasia) ni hemorragia intrahepática.

En concordancia con estas observaciones, hemos apreciado en los cortes teñidos con la técnica de Gomori (Fig. 4b) que el tejido conjuntivo forma un denso anillo en torno a la luz del vaso, similar al observado en los cortes provenientes de ratones control (Fig. 5a), de tal forma que no existe disrupción de los vasos ni procesos hemorrágicos como los observados en ensayos agudos. También encontramos una importante disminución del tejido conectivo que forma la trama extracelular del parénquima hepático.

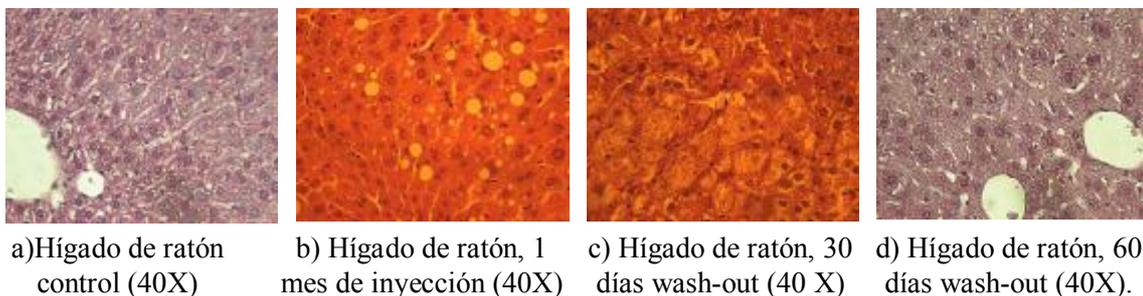


Fig. 3 Técnica Hematoxilina-Eosina

En los cortes obtenidos de los animales sometidos a 30 días de wash-out (Fig.3c), hemos observado que los daños revierten parcialmente ya que en estos casos encontramos microvacuolas que no son capaces de producir deformación en los núcleos, células espumosas, discariosis, hiperchromacia nuclear y atipia reactiva leve como indicios de recuperación hepática a nivel celular. Sin embargo no se observaron mejorías en la estructura extracelular de tejido conjuntivo (Fig.4c).

Luego de 60 días de wash-out la recuperación se hace mucho más evidente (Fig.3d), ya no se observaron vacuolas intracelulares, el material nuclear se encontraba homogéneamente condensado sin vesiculaciones, y se produjo una reaparición parcial de las estructuras sinusoidales aunque más dilatadas que las normales debido probablemente al estrés sufrido por las células durante el tratamiento con Myc-LR. En concordancia con lo observado, vemos

que la estructura de sostén hepática muestra indicios de una leve recuperación (Fig.4d) ya que se ha evidenciado tejido conjuntivo en torno a los sinusoides dilatados, si bien el mismo no forma aún una red continua como ocurre en un hígado normal (Fig.4a).

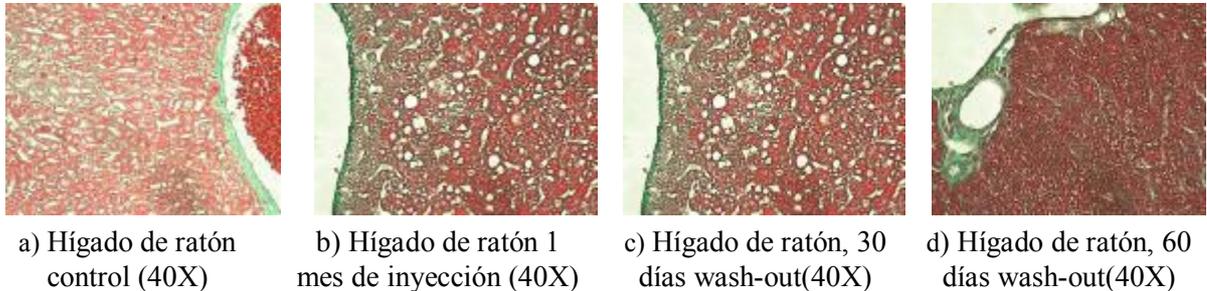


Fig. 4 Técnica de Gomori

Las vacuolas observadas son consecuencia de la acumulación intracitoplasmática anormal de lípidos o glucógeno. La ausencia de coloración en las vacuolas en los hígados de animales tratados con Myc-LR durante un mes y teñidos con la técnica de PAS (Fig.5) es indicativo de la ausencia de glucógeno, glucoproteínas y glucosaminoglucanos en el interior de las mismas. De modo que estas vacuolas se deben a una acumulación excesiva de lípidos en los hepatocitos durante la exposición del animal a la toxina.

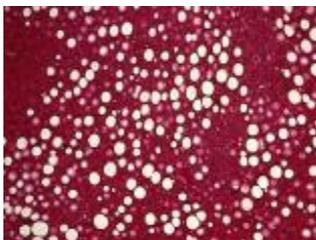


Fig.5 Técnica de PAS  
Hígado de ratón 1 mes de inyección (40 X) Vacuolas sin coloración

#### Determinación de Lípidos:

Los animales tratados durante un mes con la toxina presentaron un notable aumento en el contenido hepático de lípidos totales comparado con los niveles encontrados en los ratones que no fueron expuestos a Myc-LR. Esta condición persiste luego de 30 días de interrupción de la exposición a la toxina y alcanza nuevamente los valores controles después de 60 días de recuperación.. En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en la cuantificación de lípidos contenidos en los hígados de ratones controles y expuestos a la toxina.

Resulta evidente que el aumento de lípidos totales se debe fundamentalmente a un aumento de lípidos neutros y polares (fosfolípidos). Es interesante notar que luego de 30 días de recuperación los niveles de los lípidos neutros se mantienen elevados, mientras que los lípidos polares se acercan a los valores normales. Los lípidos polares y neutros retornan a niveles normales luego de 60 días de interrupción de la exposición a la toxina.

|                 | Tratamiento con Myc-LR |              | Recuperación (Wash-out) |               |             |             |
|-----------------|------------------------|--------------|-------------------------|---------------|-------------|-------------|
|                 | 30 días                |              | 30 días                 |               | 60 días     |             |
|                 | Control                | Grupo2       | Control                 | Grupo3        | Control     | Grupo 4     |
| Lípidos Totales | 138.1 ± 6.6            | 189.5 ± 9.0* | 96.5 ± 8.3              | 206.0 ± 17.0* | 122.5 ± 4.9 | 138.5 ± 6.6 |
| Lípidos Polares | 76.3 ± 2.9             | 113.8 ± 4.1* | 81.0 ± 3.0              | 95.3 ± 4.0    | 73.3 ± 2.1  | 80.2 ± 3.6  |
| Lípidos Neutros | 53.5 ± 4.4             | 60.7 ± 2.6*  | 55.1 ± 3.0              | 65.7 ± 4.5*   | 55.9 ± 3.5  | 53.6 ± 4.0  |

Tabla 1 Lípidos totales, neutros y polares en homogenatos de hígado de ratones control y expuestos a toxina. Los resultados se obtuvieron a partir de 3-4 determinaciones independientes por duplicado ± SD. Las diferencias significativas entre los animales expuestos a toxina y los controles se indicaron con un asterisco ( $p < 0.01$  o menores). Datos expresados en  $\mu\text{moles} / \text{mg}$  proteína.

#### DISCUSIÓN:

La exposición subcrónica a Myc-LR en la dosis utilizada en este estudio, no causa muerte ni síntomas clínicos de intoxicación, sin embargo afecta seriamente la integridad y función hepática mientras que no afecta significativamente ni el funcionamiento ni la estructura renal.

Debido a que no se presentan variaciones destacables en los pesos de los animales respecto de los normales, este parámetro no es un buen indicador de exposición subcrónica a la toxina.

Histológicamente la lesión hepática se hace muy evidente, los aumentos en los niveles de contenido lipídico hepático están en buena correlación con las macrovacuolas observadas en los cortes histológicos en los animales sometidos a un mes de tratamiento con Microcystina-LR. La persistencia de estos valores elevados durante los primeros 30 días de recuperación tiene correlato en las microvacuolas y células espumosas observadas en los cortes histológicos de los hígados de los animales expuestos a Myc-LR, correspondientes a este período.

Así mismo se observa una clara recuperación hepática, sobre todo a nivel celular.

El aumento de las enzimas hepáticas, FAL y TGO, está en concordancia y es un indicador más del importante daño producido en este órgano, así como de la recuperación observada al suspender la exposición a la toxina; período en el cual dichos parámetros retornan a valores normales.

La presencia de vacuolas lipídicas y su posterior desaparición, indican una influencia directa y reversible sobre el metabolismo lipídico en el hígado.

La estructura histológica normal observada a nivel renal concuerda con la ausencia de alteraciones significativas de los valores plasmáticos de urea y creatinina, siendo éstos últimos marcadores bioquímicos utilizados frecuentemente con el fin de evaluar el funcionamiento renal.

#### CONCLUSIÓN:

La presencia de importantes florecimientos de *Microcystis aeruginosa* en la cuenca del Plata, durante la época estival, es uno de los principales problemas sanitarios y ambientales que enfrenta hoy esta zona.

La población entra en contacto con estas toxinas al utilizar estos cuerpos de agua dulce para recreación o como fuente para la obtención de agua potable. De hecho, se han detectado niveles de toxinas en el agua potable de las ciudades de Ensenada y La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina, varias veces superiores a los recomendados por la OMS durante los meses de enero y febrero de 2005 y enero de 2006 (Andrinolo et al 2006). La exposición de personas y animales a niveles subletales de Myc-LR puede pasar desapercibida debido a la ausencia de síntomas clínicos en las intoxicaciones subcrónicas. Por esto estudiar el daño producido, en las condiciones planteadas, permitiría comprender mejor los mecanismos por los cuales la toxina produce dicho daño. A partir de ahí encontrar marcadores de exposición específicos a microcystinas, sería de suma importancia para viabilizar estudios epidemiológicos y cuantificar los niveles de exposición humana y animal; datos imprescindibles para una correcta evaluación del riesgo.

#### REFERENCIAS:

Rinehart, K.L., Namikoshi, M., Choi, B.W. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 6, 159–176, 1994. Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>

Bouaïcha, N., Maatouk, I. Microcystin-LR and Nodularin induced intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes, 2004. Disponible en <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>.

Carmichael, W., Azevedo, S., Jochimsen, E., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G., Eaglesham, G. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil, 1997. Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>.

Hooser S.B. V.R. Basgall E.J, Carmichael. W.W, and Haschek W.N (1990) Microcystin-LR- induced ultrastructural changes in rats. *Vet Pathol* 27, 9-15. Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>

Carmichael W. The cyanotoxins. *Adv Bot Res* 27: 1997. Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>.

- J. Folch, M. Lees, G.A.S. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509; 1957. Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>
- D.J. Hanahan, J.C. Dittnar, E. Warashima, A column chromatographic separation of classes of phospholipids, *J. Biol. Chem.* **228**: 685-690; 1957. Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>
- D.C. Malins, H.K. Mangold, Analysis of complex lipid mixtures by thin layer chromatographic and complementary methods, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **37**: 576-582; 1960. Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>
- N.M. Neskovic, D.M. Kostic, Quantitative analysis of rat liver phospholipids by a two-step thin-layer chromatography procedure, *J. Chromat.* **35**: 297-300; 1968. Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>
- C.A. Marra, M.J.T. de Alaniz, Mineralocorticoids modify rat liver  $\Delta 6$  desaturase activity and other parameters of lipid metabolism, *Biochem. Int.* **22**: 483-493; 1990. Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>
- P.S. Chen, T.Y. Toribara, H. Warner, Microdetermination of Phosphorus, *Anal. Chem.* **33**: 1405-1406; 1956. . Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>
- Andrinolo, D., G. Carvajal, J. Rodriguez, L. Giannuzzi, M. Barco, J. Rivera, J. Caixach, M. Caneo y R. Echenique. Congreso Brasileiro de Ficología & Simposio Latino-americano de algas nocivas, Itajaí, Brasil, marzo 2006. Disponible en <[www.biblioteca.secyt.gov.ar](http://www.biblioteca.secyt.gov.ar)>