

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,
BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL



“INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO EN TILAPIAS
(*Oreochromis sp.*) EXPUESTAS A MICROCISTINAS Y POTENCIAL
UTILIDAD DE ANTIOXIDANTES EN LA DIETA”

Memoria que presenta

ANA ISABEL PRIETO ORTEGA

para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla

Directora

Directora

Directora

Fdo. ANA M^a CAMEÁN

Fdo. ISABEL M^a MORENO

Fdo. M^a ANGELES JOS

Sevilla, 2008

FACULTAD DE FARMACIA
C / Profesor García González, 2.
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 6762
Fax: 954 23 37 65



ANA MARÍA CAMEÁN FERNÁNDEZ, Catedrática del Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla, ISABEL MARÍA MORENO NAVARRO, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla y M^a ANGELES JOS GALLEGRO, Profesora Contratado Doctor del Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral “INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO EN TILAPIAS (*Oreochromis* sp.) EXPUESTAS A MICROCISTINAS Y POTENCIAL UTILIDAD DE ANTIOXIDANTES EN LA DIETA”, ha sido realizada por la Lda. D^a ANA ISABEL PRIETO ORTEGA en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firmamos en Sevilla, Febrero 2008

Directora

Directora

Directora

Fdo. ANA M^a CAMEÁN

Fdo. ISABEL M^a MORENO

Fdo. M^a ANGELES JOS

AREA DE TOXICOLOGIA

FACULTAD DE FARMACIA
C / Profesor García González, 2.
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 6762
Fax: 954 23 37 65



D. ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, Director del Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada “INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO EN TILAPIAS (*Oreochromis* sp.) EXPUESTAS A MICROCISTINAS Y POTENCIAL UTILIDAD DE ANTIOXIDANTES EN LA DIETA”, presentada por la Lda. D^a. ANA ISABEL PRIETO ORTEGA para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, Febrero de 2008

Fdo. Alberto Machado de la Quintana

AREA DE TOXICOLOGIA

FACULTAD DE FARMACIA
C / Profesor García González, 2.
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 6762
Fax: 954 23 37 65



Este trabajo ha sido realizado en el Área de Toxicología del Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla y financiado por los proyectos de investigación CICYT (AGL 2002-02622) y CICYT (AGL 2006-06523/ALI), además ha contado con la ayuda económica de la Fundación Farmacéutica Avenzoar proporcionada mediante la concesión de una beca para el año 2005.

*A mis padres
y a Javi*

Saber

*Los que saben sólo saben
lo que se puede aprender,
mínimas cosas que caben
en la poquedad del ser.*

*Pero ese todo saber
que al ser humano trasciende
y luz remota se enciende
en el misterio infinito,
¿en qué libros está escrito?
¿quién lo enseña y quién lo aprende?*

Amador Galván.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todas las personas que con su ayuda, tanto en el ámbito personal como profesional, han colaborado en la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar a mis directores de tesis, a la Dra. Ana María Cameán Fernández, por aceptarme y recibirme con los brazos abiertos para formar parte de su grupo de investigación. Por su capacidad inagotable de trabajo que nos ha hecho ir siempre hacia delante. Por su ánimo, su comprensión y como no, por haber sabido transmitir sus conocimientos y experiencia regalándome en cada momento el consejo más adecuado. A la Dra. Ángeles Jos Gallego, por su tesón y generosidad, su apoyo continuo y ayuda incondicional durante todo el trabajo realizado. Quiero agradecerle además su amistad y confianza. A la Dra. Isabel M^a Moreno Navarro, gracias por su asesoramiento continuo, por su ayuda y esfuerzo que han hecho posible la escritura de esta memoria y sobre todo muchas gracias por tener siempre una sonrisa y un ratito para dedicarme. Y por supuesto, no me podía olvidar de la Dra. Pichardo, mi amiga y compañera Silvia, tú fuiste la primera persona que pensaste en mí para desempeñar este trabajo y gracias a ti hoy presento esta tesis. Muchas gracias a las cuatro por el apoyo tanto profesional como personal.

Quisiera también dar las gracias, por la ayuda y apoyo que me han brindado, a todos mis compañeros de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, de forma muy especial:

- A mis compañeras del Área de Toxicología: Mercedes, Loyda, Isa Clara y María por la ayuda que me habéis prestado y los momentos de ánimo que me habéis dado.
- A los compañeros del Área de Bromatología, en especial a las Dras Ana María Troncoso y Carmen García Parrilla, y a todo su equipo por su ayuda y generosidad.
- A Félix, nuestro Técnico de Laboratorio, muchas gracias por estar siempre dispuesto a ayudar en todo lo que se ha ido necesitando, especialmente en el cuidado de los peces, y por su sonrisa y ánimos constantes.
- Al Departamento de Fisiología, especialmente a la Dra. Carmen Vázquez y al Dr. Alfonso Mate por ofrecerme su asesoramiento y su apoyo. Gracias también José Luis, M^a José y Ana por estar dispuestos a ofrecerme vuestra ayuda de forma desinteresada en todo momento.
- A todos los compañeros del Área de Bioquímica por ofrecer tanto sus conocimientos como los medios materiales que hayamos podido necesitar para la realización de esta tesis.
- A las Dras María Teresa Morales y Maravilla Boccio, por compartir conmigo sus conocimientos y por su amistad, al igual que todo el departamento de Análisis Químico.
- A Mati, que desde los laboratorios ha prestado siempre su ayuda en el cuidado y vigilancia de los peces.
- A Carmen Peña, Carmen Fernández y Rosa Pimenta, gracias por ayudarme desde la Secretaría del Departamento y por mostrar interés sincero en resolver todos los problemas que me han ido surgiendo.

- A todo el personal de la biblioteca, por su ayuda en la búsqueda bibliográfica y por acogerme para escribir parte de esta memoria.

Quería agradecer de forma muy especial a toda mi familia, en particular a mis padres y hermanos, por apoyarme siempre y confiar sinceramente en mí; y sobretodo, por su cariño.

A Javi por su paciencia y comprensión, y por apoyarme siempre de forma incondicional, haciéndome ver el lado mas positivo de las cosas; gracias por hacerme la vida más feliz.

A todos mis amigos Rocío, Rociíto, Macarena, M^a Carmen, Paqui, Ana Mari, Antonio, Chiqui, Nacho, Javier y Luis, especialmente a Vivi, M^a Ángeles y Rosa que, por sus circunstancias personales, han logrado comprender mejor mis inquietudes y preocupaciones. Muchas gracias por escucharme siempre que lo he necesitado.

A mi amiga Carmen Cuadri porque, aunque nos veamos pocas veces, siempre has estado ahí.

En definitiva, a todas las personas que directa o indirectamente me han ayudado a que hoy tenga escrito el Informe de mi Tesis Doctoral.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

I- INTRODUCCIÓN

1- CIANOBACTERIAS: MICROCISTINAS	1
1.1. FLORACIONES DE CIANOBACTERIAS EN EL MEDIO AMBIENTE	1
1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CIANOTOXINAS	5
1.3. ESTRUCTURA DE LAS MICROCISTINAS	11
1.4. PRODUCCIÓN DE MICROCISTINAS	16
1.5 EXPOSICIÓN	21
1.6. EFECTOS TÓXICOS DE LAS MICROCISTINAS	26
o 1.6.1. Efectos en humanos	27
o 1.6.2. Estudios en animales terrestres	30
o 1.6.3. Efectos en organismos acuáticos	33
o 1.6.4. Estudios <i>in vitro</i>	51
1.7. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS	53
o 1.7.1. Inhibición de fosfatasas de proteínas	56
o 1.7.2. Estimulación del metabolismo del ácido araquidónico	59
o 1.7.3. Apoptosis	60
o 1.7.4. Estrés oxidativo	62
1.8. TRATAMIENTO	72
1.9. LEGISLACIÓN SOBRE LAS MICROCISTINAS	74
1.10. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MICROCISTINAS	76
2- LA TILAPIA (<i>Oreochromis sp.</i>)	83
3- VITAMINA E, GLUTATIÓN Y OTRAS SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES	90
II- OBJETIVOS	105

III- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. EQUIPOS Y MATERIALES DE USO GENERAL.....	107
o 3.1.1. Índice de aparatos utilizados.....	107
o 3.1.2. Índice de reactivos utilizados.....	108
3.2. MODELO EXPERIMENTAL.....	110
3.3. RECOGIDA DE FLORACIONES DE CIANOBACTERIAS Y DETERMINACIÓN DE MICROCISTINAS.....	111
3.4. MÉTODO EXPERIMENTAL.....	113
3.4.1. Pautas de tratamiento y grupos de experimentación.....	114
o 3.4.1.1. Exposición subcrónica durante 14 y 21 días/ vía oral (triturado y no triturado)/ MC-LR.....	114
o 3.4.1.2. Exposición i.p. aguda (dosis única) de MC-LR y MC-RR/ sacrificio a los 7 días.....	117
o 3.4.1.3. Exposición aguda (dosis única)/ vía oral (triturado)/ MC- LR/ sacrificio a las 24 y 72 horas.....	119
o 3.4.1.4. Exposición aguda (dosis única)/ vía oral (triturado)/ MC- LR / dos dosis de vitamina E (200 y 700 mg/kg dieta)/ sacrificio a las 24 horas.....	121
o 3.4.1.5. Exposición aguda (dosis única)/ vía oral (triturado)/ MC- LR / una dosis de vitamina E (700 mg/kg dieta)/ sacrificio a las 24, 48 y 72 horas.....	124
3.4.2. Sacrificio de los animales, recogida y preparación de las muestras.....	127
3.5. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.....	128
3.5.1. Determinación de la concentración de proteínas totales.....	128
3.5.2. Estado de peroxidación lipídica (LPO).....	129
3.5.3. Oxidación de proteínas: cuantificación de grupos carbonilos.....	132
3.5.4. Determinación de las actividades de marcadores enzimáticos del estrés oxidativo.....	133
o 3.5.4.1. Determinación de la actividad Superóxido Dismutasa (SOD).....	133

○ 3.5.4.2. Determinación de la actividad Catalasa (CAT)	136
○ 3.5.4.3. Determinación de la actividad Glutación Peroxidasa (GPx)...	137
○ 3.5.4.4. Determinación de la actividad Glutación Reductasa (GR).....	139
3.5.5. Determinación de antioxidantes no enzimáticos: glutación (KIT GSH/GSSG)	140
3.5.6. Determinación de MC-LR (KIT ELISA)	142
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	146

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA DURANTE 14 Y 21 DÍAS/ VÍA ORAL (TRITURADO Y NO TRITURADO)/ MC-LR	148
○ 4.1.1. Características generales de los peces.....	148
○ 4.1.2. Medida de la LPO	150
○ 4.1.3. Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR	152
○ 4.1.4. Discusión de los resultados	158
4.2. EXPOSICIÓN I.P. AGUDA (DOSIS ÚNICA) DE MC-LR Y MC-RR/ SACRIFICIO A LOS 7 DÍAS	164
○ 4.2.1. Características generales de los peces.....	164
○ 4.2.2. Medida de la LPO	166
○ 4.2.3. Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR	168
○ 4.2.4. Discusión de los resultados	174
4.3. EXPOSICIÓN AGUDA (DOSIS ÚNICA)/ VÍA ORAL (TRITURADO)/ MC-LR/ SACRIFICIO A LAS 24 Y 72 HORAS	180
○ 4.3.1. Características generales de los peces.....	180
○ 4.3.2. Medida de la LPO	182
○ 4.3.3. Medida de la oxidación de proteínas: determinación de grupos carbonilos.....	184

○ 4.3.4. Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR	186
○ 4.3.5. Determinación de MC-LR en las muestras: Test ELISA.....	192
○ 4.3.6. Discusión de los resultados	193
4.4. EXPOSICIÓN AGUDA (DOSIS ÚNICA)/ VÍA ORAL (TRITURADO)/ MC-LR/ DOS DOSIS DE VITAMINA E (200 y 700 mg/kg dieta)/ SACRIFICIO A LAS 24 HORAS	198
○ 4.4.1. Características generales de los peces	198
○ 4.4.2. Medida de la LPO	200
○ 4.4.3. Medida de la oxidación de proteínas: determinación de grupos carbonilos	202
○ 4.4.4. Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR	203
○ 4.4.5. Discusión de los resultados	209
4.5. EXPOSICIÓN AGUDA (DOSIS ÚNICA)/ VÍA ORAL (TRITURADO)/ MC-LR/ UNA DOSIS DE VITAMINA E (700 mg/kg dieta)/ SACRIFICIO A LAS 24, 48 Y 72 HORAS	213
○ 4.5.1. Características generales de los peces	213
○ 4.5.2. Medida de la LPO	218
○ 4.5.3. Medida de la oxidación de proteínas: determinación de grupos carbonilos	220
○ 4.5.4. Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR	221
○ 4.5.5. Medida de glutatión reducido (GSH)	227
○ 4.5.6. Discusión de los resultados	228
V- DISCUSIÓN GENERAL	233
VI- CONCLUSIONES	237

VII- BIBLIOGRAFÍA	241
VIII- ANEXO	273

- Jos A, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vázquez CM, Moreno IM, Cameán AM (2005). Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* 72, 261-271.
- Prieto AI, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Cameán AM (2006). Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquatic Toxicology* 77, 314-321.
- Prieto AI, Pichardo S, Jos A, Moreno IM, Cameán AM (2007). Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* 84, 337-345.
- Prieto AI, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Cameán AM (2007). Protective role of vitamine E on the microcystin induced oxidative stress in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* (aceptado octubre 2007).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura FI-1: Mapa del mundo donde aparecen los lugares en los que se han detectado floraciones de cianobacterias que contienen Microcistinas...	2
Figura FI-2: Típico paisaje de aguas eutróficas pobladas de cianobacterias. Río Alcarrache a su paso por la localidad de Villanueva del Fresno (Badajoz)	5
Figura FI-3: Estructura química de las hepatotoxinas.....	10
Figura FI-4 Estructura peptídica de las MC	11
Figura FI-5: Estructura química general de las MC	12
Figura FI-6: Resumen de los factores a nivel genético, celular y poblacional que afectan a la producción de MC (Zurawell y col., 2005)	17
Figura FI-7: Modelo biosintético propuesto para MC-LR (Zurawell y col., 2005) ...	18
Figura FI-8: Esquema de los mecanismos fisiopatológicos de acción tóxica de MC en peces (Malbrouck y Kestemont, 2005)	47
Figura FI-9: Mecanismos de acción de las Microcistinas.....	55
Figura FI-10: Inhibición de las fosfatasa de proteínas debido a MC	56
Figura FI-11: Principales sistemas enzimáticos antioxidantes celulares	70
Figura FI-12: Tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.).....	83
Figura FI-13: Cultivo de tilapias (<i>Oreochromis</i> sp.) en tanques	89
Figura FI-14: Estructura química de la vitamina E.....	91
Figura FI-15: Glutatión reducido y glutatión oxidado	95
Figura FI-16: Estructura química de la silimarina.....	97
Figura FI-17: Estructura química de la melatonina	98

Figura FI-18: Selenoproteínas en mamíferos	99
Figura FI-19: Estructura química de la cisteína	102
Figura FI-20: Estructura química de la vitamina C.....	103
Figura FM-1: Esquema de la exposición oral subcrónica de tilapias a 60 µg MC- LR/pez/día durante 14 y 21 días	114
Figura FM-2: Esquema de la exposición intraperitoneal aguda de tilapias a 500 µg MC-LR ó MC-RR/pez	117
Figura FM-3: Esquema de la exposición oral aguda de tilapias a 120 µg MC- LR/pez/sacrificio a las 24 y 72 horas tras la exposición.....	119
Figura FM-4: Esquema de la exposición oral aguda de tilapias a 120 µg MC- LR/pez en dosis única con suplemento de dos dosis diferentes de vitamina E (200 mg/kg dieta o 700 mg/kg dieta)	121
Figura FM-5: Esquema de la exposición oral aguda de tilapias a 120 µg MC- LR/pez en dosis única con suplemento de 700 mg de vitamina E/kg dieta durante periodos experimentales de 24, 48 y 72 horas	124
Figura FM-6: Reactivos del Kit de ELISA para MC	143
Figura FR-1: Valores de LPO (µmol ATB/g tejido) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 60 µg/pez/ día) para dos formas de administración oral: triturado y no triturado	151
Figura FR-2: Valores de la actividad SOD (U/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 60 µg/ pez/ día) para dos formas de administración oral: triturada y no triturada	154
Figura FR-3: Valores de la actividad CAT (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 60 µg/ pez/ día) para dos formas de administración oral: triturado y no triturado	155

Figura FR-4: Valores de la actividad GPx (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR 60 µg/ pez/ día) para dos formas de administración oral: triturado y no triturado 156

Figura FR-5: Valores de la actividad GR en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR 60 µg/pez/ día) para dos formas de administración oral: triturado y no triturado 157

Figura FR-6: Los valores de LPO (µmol ATB/g tejido) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos de forma aguda a 500 µg/ Kg MC-RL ó 500 µg/ Kg MC-RR 167

Figura FR-7: Valores de actividad SOD (U/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos de forma aguda a 500 µg/ Kg MC-RL ó 500 µg/ Kg MC-RR 170

Figura FR-8: Valores de la actividad de CAT (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos de forma aguda a 500 µg/ Kg MC-RL ó 500 µg/ Kg MC-RR 171

Figura FR-9: Valores de actividad de GPx (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos de forma aguda a 500 µg/ Kg MC-RL ó 500 µg/ Kg MC-RR 172

Figura FR-10: Valores de actividad de GR (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos de forma aguda a 500 µg/ Kg MC-RL ó 500 µg/ Kg MC-RR 173

Figura FR-11: Valores de LPO (nmol ATB/g tejido) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas de la exposición..... 183

Figura FR-12: Valores de la actividad SOD (U/mg proteína) en hígado, riñón (U/mg proteína) y branquias (mU/mg proteína) de peces control y

peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 $\mu\text{g/pez}$) de forma aguda, para dos periodos experimentales (24 y 72 horas).....	188
Figura FR-13: Valores de la actividad CAT (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 $\mu\text{g/pez}$) de forma aguda, para dos periodos experimentales (24 y 72 horas).....	189
Figura FR-14: Valores de la actividad GPx (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 $\mu\text{g/pez}$) de forma aguda, para dos periodos experimentales (24 y 72 horas).....	190
Figura FR-15: Valores de la actividad GR (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 $\mu\text{g/pez}$) de forma aguda, para dos periodos experimentales (24 y 72 horas).....	191
Figura FR-16: Valores de LPO (nmol ATB/g tejido) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 $\mu\text{g/pez}$) por vía oral de forma aguda, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta)	201
Figura FR-17: Valores de la actividad SOD (U/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 $\mu\text{g/pez}$) por vía oral de forma aguda, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta)	205
Figura FR-18: Valores de la actividad CAT (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 $\mu\text{g/pez}$) por vía oral de forma aguda, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta)	206

Figura FR-19: Valores de la actividad GPx (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) por vía oral de forma aguda, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta) 207

Figura FR-20: Valores de la actividad GR (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) por vía oral de forma aguda, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta) 208

Figura FR-21: Valores de LPO (nmol ATB/g tejido) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas) 219

Figura FR-22: Valores de la actividad SOD (U/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas)..... 223

Figura FR-23: Valores de la actividad CAT en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas) 224

Figura FR-24: Valores de la actividad GPx en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas) 225

Figura FR-25: Valores de la actividad GR en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas).....226

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla TI-1: Diferentes toxinas de cianobacteria, principales productores, estructura tóxica, principales efectos tóxicos y forma de biotransformación	7
Tabla TI-2: Variantes de Microcistinas que difieren en los aminoácidos de las posiciones 2 y 4 y su toxicidad	15
Tabla TI-3: Principales vías de exposición a Microcistinas y efectos tóxicos derivados	22
Tabla TI-4: Principales síntomas y efectos tóxicos producidos por las MC observados en el hombre.....	29
Tabla TI-5: Acumulación de MC observada en estudios de campo en tejidos, sangre o heces de peces, dependiendo de la concentración de toxinas o de células de cianobacterias presentes en el agua.....	36
Tabla TI-6: Acumulación de MC observada en estudios experimentales en tejidos, sangre o heces de peces, dependiendo de la concentración de toxinas administrada.....	37
Tabla TI-7: Principales patologías producidas por MC en hígado y riñón de peces (Zurawell y col., 2005).....	41
Tabla TI-8: Efectos de las MC en el metabolismo de peces según la concentración de toxinas administradas y la vía de exposición	42
Tabla TI-9: Efectos de las MC en los estadios tempranos de vida de peces, dependiente de las especies, estado de desarrollo, y las dosis administradas	49
Tabla TI-10: Comparación entre los métodos biológicos de análisis de MC (McElhiney y Lawton, 2005).....	77
Tabla TM-1: Numeración de los diferentes grupos experimentales según el tipo de tratamiento con dos dosis diferentes de vitamina E (200 mg/kg dieta o 700 mg/kg dieta)	122

Tabla TM-2: Numeración de los diferentes grupos experimentales según el tipo de tratamiento y periodo experimental (24, 48 y 72 horas)	125
Tabla TR-1: Características generales de los peces control y los expuestos al liofilizado de células de cianobacterias (60 µg de MC-LR/pez/día) por vía oral durante 14 y 21 días	149
Tabla TR-2: Características generales de los peces control y de los expuestos por vía intraperitoneal a diferentes tipos de toxinas MC-LR y MC-RR	165
Tabla TR-3: Características generales de los peces control y los expuestos por vía oral al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/ pez) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas de la exposición al tóxico	181
Tabla TR-4: Valores de oxidación de proteínas (nmoles grupos carbonilos/mg proteína) en peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas de la exposición al tóxico	184
Tabla TR-5: Cantidad de MC medida mediante el Test de Elisa en peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas de la exposición al tóxico	192
Tabla TR-6: Características generales de los peces control y los expuestos al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/ pez) pretratados y sin pretratar con diferentes dosis de vitamina E (200 mg vit E/kg dieta y 700 mg vit E*/kg dieta)	199
Tabla TR-7: Valores de oxidación de proteínas en hígado de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda por vía oral, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta)	202
Tabla TR-8: Características generales de los peces control y los expuestos al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/ pez) pretratados con 700 mg vitamina E/ kg dieta y sacrificados tras 24 horas de la exposición	214

Tabla TR-9: Características generales de los peces control y los expuestos al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/ pez) pretratados con 700 mg vitamina E/ kg dieta y sacrificados tras 48 horas de la exposición	215
Tabla TR-10: Características generales de los peces control y los expuestos al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/ pez) pretratados con 700 mg vitamina E/ kg dieta y sacrificados tras 72 horas de la exposición	216
Tabla TR-11: Valores de oxidación de proteínas en peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con 700mg/kg dieta de vitamina E para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas)	220
Tabla TR-12: Valores de Glutación reducido (GSH) en hígado de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas).....	227

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

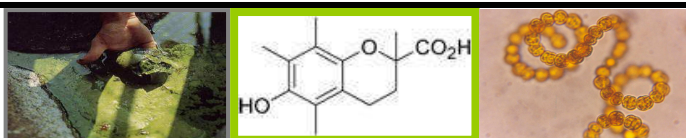
- µg: microgramo
µL: microlitro
µM: micromolar
8-OHdG: 8-desoxilguanosina
Abs: absorbancia
Adda: ácido 3-amino 9-metoxi 2,6,8-trimetil 10-fenildeca 4,6-dienoico
ADN: ácido desoxilribonucleico
ADP: adenosín difosfato
ALT: alanina transferasa
ANOVA: análisis de varianza
AST: aspartato transferasa
ATB: ácido tiobarbitúrico
ATP: adenosín trifosfato
BHT: butilhidroxitolueno
c GSH-Px: glutatión peroxidasa citosólica
C.V.: coeficiente de variación
CAT: catalasa
CBB: reactivo Coomassie Brilliant Blue
cGSH-Px: glutatión peroxidasa citosólica
Cl⁻: ión cloro
cm: centímetros
CoA: coenzima A
Col.: colaboradores
CTE: cadena de transporte electrónico
D.O.: densidad óptica
D-Glu: D-glucosa
Dil: dilución
DL₅₀: dosis letal 50
D-Me Asp: ácido D-metil aspártico
DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

e GSH-Px: glutatión peroxidasa intracelular
EC: Comunidad Europea
EDTA: ácido etilen diamino tetracético
EEUU: Estados Unidos
ELISA: ensayo de inmunoafinidad
equiv/g: equivalente por gramo
ERO: especies reactivas de oxígeno
FAO: Organización Intergubernamental para la agricultura y la alimentación
FapyG: 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
Fur: proteína reguladora de la absorción de hierro
g: gramo
gi GSH-Px: glutatión peroxidasa gastrointestinal
GOT: aspartato amino transferasa
GPx: glutatión peroxidasa
GR: glutatión reductasa
GSH: glutatión reducido
GSSG: glutatión oxidado
GST: glutatión s transferasa
h: horas
Ha: hectáreas
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-MS: cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas
HPLC-UV: cromatografía líquida de alta resolución-espectroscopía ultravioleta visible
i.p.: intraperitoneal
IARC: agencia internacional de investigaciones sobre el cáncer
ID I, ID II, ID III: Tipos I, II y III de iodotironina deionidasas
IDT: ingesta diaria tolerable
Ig E: inmunoglobulina E
Kg: kilogramo
L: litro
LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas
LDH: lactato deshidrogenasa

LPO: peroxidación lipídica
LPS: lipopolisacáridos
M₂VP: 1-metil-2-vinilpiridina trifluorometanosulfonato
MALDI-TOF-MS: matriz asistida por desorción/ionización de láser asociado a un analizador de tiempo de vuelo-espectrometría de masas
MC: microcistinas
MC-AR: microcistina-AR
MC-LF: microcistina-LF
MC-LR: microcistina-LR
MC-M(O)R: microcistina metionina sulfóxido y arginina
MC-RR: microcistina-RR
MC-YR: microcistina-YR
MDA: malonildialdehído
Mdha: metildehidroalanina
mg: miligramo
min: minuto
mM: milimolar
MPA: ácido metafosfórico
MPT: permeabilidad transmembrana
mU: miliunidades
n: número
NADPH: β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
nm: nanómetros
NPLD: enfermedad denominada “Netpen Liver Disease”
NP-SH: grupos sulfidrilos no proteicos
OATP: polipéptidos transportadores de aniones orgánicos
°C: grado centígrado
OMS: Organización Mundial de la Salud
Pi: fósforo inorgánico
PA: fosfatasa alcalina
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pH GSH-Px: glutatión peroxidasa fosfolípido hidroperóxido

PP1: fosfatasa de proteínas 1
PP2A: fosfatasa de proteínas 2A
ppm: partes por millón
PUFA: ácidos grasos poliinsaturados
R: arginina
RE: retículo endoplásmico
RER: retículo endoplásmico rugoso
rpm: revoluciones por minuto
S.E.: error estándar
s: segundo
SDS: dodecilsulfato sódico
Ser: serotonina
SOD: superóxido dismutasa
TEP: 1,1,3,3-tetraetoxipropano
Thr: treonina
TM: toneladas métricas
TNF- α : factor de necrosis tumoral- α
TNF- β 1: factor de necrosis tumoral- β 1
TRIS: trihidroximetil amino metano
TXB: tromboxano
Tyr: tirosina
U: unidad
UI: unidad internacional
USEPA: Agencia para la protección de la contaminación ambiental de los Estados Unidos
vit C: vitamina C
vit E: vitamina E
Y: tirosina
 γ -GT: γ glutamil transferasa
 ϵ : coeficiente de extinción

INTRODUCCIÓN



1- CIANOBACTERIAS: MICROCISTINAS

1.1. FLORACIONES DE CIANOBACTERIAS EN EL MEDIO AMBIENTE

Las cianobacterias son protofitas pigmentadas, grupo de vegetales con una organización sencilla y primitiva que se sitúan en el límite entre el reino animal y vegetal. Cuentan con aproximadamente 150 géneros y unas 2000 especies y su crecimiento de forma masiva recibe el nombre de floración o afloramiento (“bloom”). Las floraciones de cianobacterias se disponen en la superficie de las masas de aguas formando una lámina verde más o menos viscosa que puede tener aspecto de espuma (Pizzolon, 1996). Con frecuencia dominan el fitoplancton en aguas templadas ricas en nutrientes, como por ejemplo, los lagos eutróficos durante el verano o lagos subtropicales eutróficos perennes (Sommer y col., 1986; Zohary y Robarts, 1989; Mez y col., 1998).

La primera vez que se informó en la literatura científica sobre la presencia de floraciones de cianobacterias, fue en el sur de Australia hace 128 años (Francis, 1878). La localización de floraciones en Europa (Aboal y Puig, 2005), América del Norte (Rinta-Kanto y col., 2005), Australia (Kankaanpää y col., 2005), Asia (Xie y col., 2005; Chen y Xie, 2005, Song y col., 2007) y África (Ballot y col., 2005; Sabour y col., 2005) indican que el crecimiento de cianobacterias puede ocurrir en un amplio rango de condiciones ambientales y prácticamente en todas las partes del mundo (**Figura FI-1**), siendo, no obstante, más frecuentes en regiones tropicales y subtropicales (Kotak y col., 1995; Sivonen y Jones, 1999; Park y col., 1998; 2001; Magalhaes y col., 2001; Wiedner y col., 2001; Frank y col., 2002; Vieira y col., 2005).

En Europa se han detectado floraciones en numerosos países (Codd y col., 1999; Pomati y col., 2000; Blom y col., 2001; Lankoff y col., 2003; Tuomainen y col., 2003; Karlsson y col., 2004; Jurczak y col., 2005; Mankiewicz y col., 2005). A pesar de esta ubicuidad, los estudios acerca de la toxicidad de floraciones en la región Mediterránea son escasos, a excepción de las llevadas a cabo en Portugal, Francia, Marruecos y España (Vasconcelos 1999; Vasconcelos 2001; Oudra y col., 2001; Moreno y col., 2003a; 2004; Janna-Para y col., 2004; Aboal y Puig, 2005; Martins y col., 2005; Sabour y col., 2005). También se ha detectado la presencia de cianobacterias en Turquía (Albay y col., 2005).



Figura FI-1: Mapa del mundo donde aparecen los lugares en los que se han detectado floraciones de cianobacterias que contienen Microcistinas.

Las primeras evidencias de floraciones tóxicas de cianobacterias en la Península Ibérica datan de la década de los 90, en aguas portuguesas. Diversas floraciones detectadas en el río Guadiana provocaron mortandad de peces y episodios de gastroenteritis en humanos en la zona sur,

concretamente en Mértola (Vasconcelos, 1999; 2001). En España, sin embargo, este fenómeno ha estado menos documentado (García-Villada y col., 2004), siendo en fechas más recientes cuando se abordan los trabajos de identificación y cuantificación de algunas de las toxinas producidas por éstas, las microcistinas (MC) (Aguete y col., 2003), involucradas en zonas diversas como: embalses de Cataluña, río Tajo (Barco y col., 2002; 2005), río Segura (Aboal y Puig, 2005) y embalses de la zona centro de Madrid (Ouahid y col., 2005).

Investigaciones llevadas a cabo por nuestro equipo, en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Franca (Unidad de Ecotoxicología del Instituto de Salud Ricardo Jorge de Lisboa), nos han permitido detectar floraciones tóxicas en el río Guadiana, cuyas aguas se destinan al riego de cultivos, actividades recreacionales y prácticas deportivas (pesca). Se cuantificaron concentraciones de MC, superiores al límite máximo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (valores guía de 1,0 µg/L de MC-LR en aguas de bebida en exposiciones a corto plazo y 0,1 µg/L en exposiciones a largo plazo); se aislaron y cultivaron las distintas especies implicadas, siendo el perfil toxicológico de tres estirpes de *M. aeruginosa* muy variable (Moreno y col., 2003a; 2004). Se concluyó que:

- * la aparición amplia y repentina de variaciones en la densidad fitoplanctónica de estas aguas, dependiendo de la distribución temporal y espacial de los sitios de muestreo, repercute en la dificultad de definir una estrategia adecuada de muestreo;
- * al menos algunas de las floraciones tóxicas detectadas en el Guadiana en su curso por el sur de Portugal pueden tener su origen corriente arriba, en la parte española;
- * se producen variaciones tóxicas inter e intra especies de cianobacterias dentro de una misma floración, lo que demuestra la

naturaleza totalmente impredecible en lo que respecta a la toxicidad global de las aguas en las que se producen.

Se ha estimado que aproximadamente el 25-75% de las floraciones son tóxicas (Lawton y Codd, 1991; Chorus y col., 2001).

En general, las floraciones suelen presentarse como resultado del aumento de la eutrofización, habitualmente de naturaleza antropogénica, de los ecosistemas acuáticos (Sivonen y Jones, 1999; Mankiewicz y col., 2001). Ésto es cada vez más frecuente principalmente en algunas regiones donde el crecimiento de la actividad agrícola e industrialización no han estado seguidos por un desarrollo adecuado de los tratamientos de aguas residuales (Azevedo y col., 2002). Algunos autores sugieren que es posible que todas las reservas de agua del mundo puedan tener cianobacterias en un momento dado (Sivonen, 1996; Fastner y col., 1999; Mankiewicz y col., 2001). Sin embargo, la presencia de cianobacterias tóxicas no siempre está asociada a actividades humanas que provocan eutrofización (Sivonen y Jones, 1999) encontrándose floraciones de cianobacterias en aguas oligotróficas de alta montaña (Sivonen y Jones, 1999), e incluso en aguas a temperaturas tan bajas como las antárticas (Hitzfeld y col., 2000) (**Figura FI-2**).

Las condiciones más idóneas, aunque no exclusivas para el crecimiento de cianobacterias y consecuente producción de floraciones son: una columna de agua templada estable, altas concentraciones de nutrientes (fósforo, nitrógeno y compuestos orgánicos), baja relación de nitrógeno disponible en comparación con el fósforo (bajo N: P), alto pH, baja disponibilidad de CO₂ y baja relación de nutrientes frente a un abundante zooplancton. Sin embargo, no se ha señalado ninguno de estos factores

como única causa de la proliferación de cianobacterias (Chorus y Bartram, 1999).



Figura FI-2: Típico paisaje de aguas eutróficas pobladas de cianobacterias. Río Alcarrache a su paso por la localidad de Villanueva del Fresno (Badajoz).

1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CIANOTOXINAS

Las floraciones de cianobacterias se están convirtiendo en un importante problema de la calidad del agua en muchos países del mundo (Park y col., 1996) debido a la producción de diversas cianotoxinas que las convierten en un riesgo para la salud, tanto para humanos como para diversas especies animales (Premazzi y Volterra, 1993; Falconer y col., 1994; Resson y col., 1994; Jochimsen y col., 1998; Pouria y col., 1998; Chorus y col., 2000; Jacquet y col., 2004).

Las intoxicaciones debidas a estas cianotoxinas pueden producirse por la ingestión de las células intactas de cianobacterias o bien de las toxinas extracelulares, como ocurre con las MC (Yu, 1989; Peñaloza y col., 1990; Andersen y col., 1993; Carmichael y Falconer, 1993; Jochimsen y col., 1998; Zimba y col., 2001), ya que éstas son liberadas al agua tras la ruptura celular (Li y col., 2003).

Las cianotoxinas son muy diversas tanto en su estructura química como en su toxicidad (Briand y col., 2003) y tradicionalmente se han clasificado atendiendo a sus efectos tóxicos como (de Figueiredo y col., 2004; Teneva y col., 2005):

- * **Dermatotoxinas:** lipopolisacáridos, lyngbyatoxina-a, aplisiatoxinas.
- * **Neurotoxinas:** anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas.
- * **Hepatotoxinas:** microcistinas, nodularina, cilindrospermopsina.

(Tabla TI-1)

Grupo de toxinas	Productores (género)	Estructura tóxica de la molécula	Efectos	Biotransformación
Anatoxinas	<i>Anabaena</i>		Inhibición de la actividad Acetilcolinesterasa (Ach)	Citocromo P-450, GST
Anatoxin-a(s)	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Planktothrix, Oscillatoria, Microcystis</i>		Unión irreversible a los receptores nicotínicos de acetilcolina	Citocromo P-450, GST
Cilindrospermopsinas	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia, Raphidiopsis, Anabaena</i>	Presencia de hidroxilos en puentes de uracilo o estado ceto enólico del grupo uracilo	Inhibición biosíntesis de proteínas, daño citogenético en el ADN	Citocromo P-450
Lipopolisacáridos (LPS)	<i>Anabaena, Anacystis, Microcystis, Nodularia</i>	Compuestos de ácidos grasos	Irritante potencial, afectando a los tejidos expuestos	Vía alternativa de desacilación lisosomal
Microcistinas	<i>Microcystis, Anabaena, Plankthotrix</i>	Grupo Adda	Inhibición de las fosfatasas de proteína (PP1 y PP2A)	GST
Nodularinas	<i>Nodularia</i>	Grupo Adda	Inhibición de las fosfatasas de proteína (PP1 y PP2A)	GST
Saxitoxinas	Dinoflagelados (<i>Protogonyaulax, Alexandrium, Gymnodinium, Pyrodinium</i>) Cianobacterias (<i>Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i>)		Unión y bloqueo de canales de sodio en células nerviosas	GST

Tabla TI-1: Diferentes toxinas de cianobacterias, principales productores, estructura tóxica, principales efectos tóxicos y biotransformación.

Las dermatotoxinas están producidas por cianobacterias marinas, principalmente las pertenecientes a los géneros *Lyngbya* y *Schizothrix*. Estas toxinas causan dermatitis severa por contacto e irritación de los ojos y tracto respiratorio (Arthur, 2002). Los lipopolisacáridos (LPS) endotóxicos tienen acción sobre el sistema inmunitario (involucrados en shock séptico) y también afectan a los sistemas de detoxificación de diferentes organismos (Wiegand y Pflugmacher, 2004). En peces, los LPS de cianobacterias disminuyen las actividades GST soluble y de membrana, disminuyendo así la capacidad de metabolización y eliminación de MC.

Las neurotoxinas bloquean la neurotransmisión y causan la muerte por una rápida parálisis respiratoria (Sivonen, 1998). Son de estructura alcaloide, existiendo distintos tipos.

La anatoxina-a y homoanatoxina-a están estructuralmente relacionadas con los agonistas nicotínicos que se unen a los receptores nicotínicos de acetilcolina, y provocan una sobreestimulación de las células musculares (McElhiney y Lawton, 2005). La anatoxina-a(s) es un éster de fosfato de la N-hidroxiguanina cíclica (Sivonen y Jones, 1999), y tiene un mecanismo de acción similar a los insecticidas organofosforados como el paratión y malatión, inhibiendo irreversiblemente la enzima acetilcolinesterasa, por lo que interfiere en la contracción muscular, causando fatiga y fallo muscular (Carmichael, 1994).

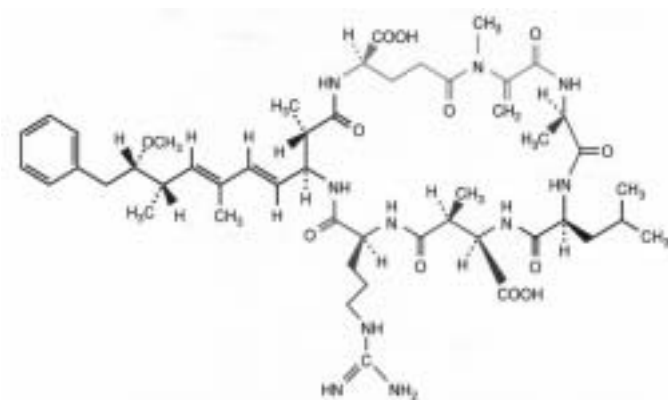
El grupo de las saxitoxinas o toxinas paralizantes (Paralytic shellfish poison, PSP) son neurotoxinas con estructura de alcaloides que bloquean selectivamente los canales de sodio dependientes de voltaje e impiden la propagación del impulso nervioso entre neuronas, provocando que las células del músculo no reciban la estimulación y por tanto permanezcan paralizadas (Kao, 1993). Las PSP fueron identificadas originariamente en el

medio marino, donde se han asociado con algunas especies de dinoflagelados (Sivonen y Jones, 1999) y bacterias (Hold y col., 2001).

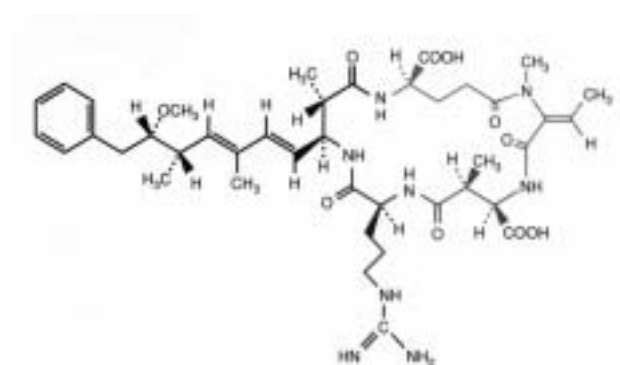
Dentro de las hepatotoxinas se diferencian los siguientes tipos que se detallan a continuación.

Las cilindrospermopsinas son alcaloides cíclicos derivados de la guanidina capaces de inhibir la síntesis de proteínas. Son producidas por *Cylindrospermopsis raciborskii* (Sivonen, 1996) y otras especies del género *Cylindrospermum* (Stirling y Quilliam, 2001). Son compuestos citotóxicos que aparentemente interfieren en la síntesis de glutatión en hepatocitos, afectando al hígado, y también al riñón, pulmón, glándulas adrenales e intestino (Sukenik y col., 1998). La toxicidad de las cilindrospermopsinas parece depender de su transformación metabólica en el hígado por el citocromo P-450, observándose que los metabolitos producidos son más potentes que el compuesto de partida, formándose aductos con el ADN en hígado de ratones y sugiriéndose actividad sobre el sistema inmunitario (Carmichael, 1997; Li y col., 2001).

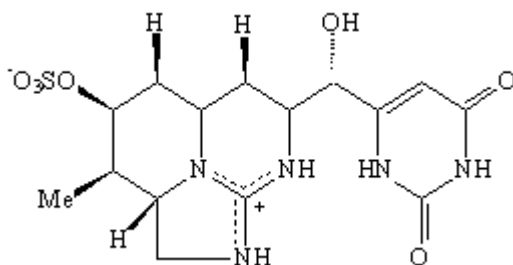
Las MC y nodularinas son peptidos cíclicos que tienen un mecanismo de toxicidad similar, pudiendo ser transportadas activamente por los “polipéptidos transportadores de aniones orgánicos” (OATP) que además de transportar sales biliares, permiten el paso de otros compuestos como las MC (Fischer y col., 2005). Por esta razón afecta preferentemente a los órganos que expresen dicho transportador como es el caso del hígado (Jacquemin y col., 1994). Además, son inhibidores de las fosfatasa de proteínas 1 y 2A (PP1 y PP2A) y potentes promotores de tumores en el hígado (Sivonen y Jones, 1999; Humpage y col., 2000). La estructura química de estos compuestos podemos observarla en la **Figura FI-3**.



Estructura de la Microcistina-LR



Estructura de la Nodularina



Estructura de la Cilindropermopsina

Figura FI-3: Estructura química de las hepatotoxinas.

Las MC son hepatotoxinas a las que se les ha dedicado gran atención por su capacidad de producir intoxicaciones agudas y crónicas (Zurawell y col., 2005), y en especial por su actividad potencial como promotores de tumores cancerígenos en humanos expuestos de forma crónica a bajas concentraciones en el agua de bebida (Ueno y col., 1996; Zhou y col., 2002). Todo esto convierte la producción de las MC en un serio problema de salud pública y para el medio ambiente (Song y col., 2007).

Las MC son toxinas producidas por especies de cianobacterias pertenecientes a distintos géneros como son *Microcystis*, *Anabaena*, *Plankltothrix* (*P. agardhii* y *P. rubescens*), *Oscillatoria*, *Anabaenopsis*, *Nostoc* (*N. rivulare*), *Aphanizomenon* (*Aph. flos-aque*) e incluso géneros terrestres como *Hapalosiphon* (Codd, 1995; Dow y Swoboda, 2000; Kaebernick y Neilan, 2001), destacando *Microcystis aeruginosa* como una de las principales especies productoras (Dawson, 1998; Chorus, 2001).

1.3. ESTRUCTURA DE LAS MICROCISTINAS

Las MC, estructuralmente, son heptapéptidos cíclicos compuestos por siete aminoácidos (Dawson, 1998) (**Figura FI-4**).

Ciclo (-D-Ala-L-X-D-eritro- β -Me-Asp-L-Y-Adda-D-Glu-Mdha)

1 2 3 4 5 6 7

Figura FI-4: Estructura peptídica de las MC

De los siete aminoácidos, cinco son prácticamente comunes a todas ellas, siendo éstos:

- 1: D-alanina
- 3: Ácido D-eritro- β -metil-aspártico (D-MeAsp)
- 5: Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico (Adda)
- 6: Ácido D-glutámico (D-Glu)
- 7: N-metildehidro-alanina (Mdha) (**Figura FI-5**)

El aminoácido Adda es el más característico de ellos y parece ser el responsable de la hepatotoxicidad (Dawson, 1998).

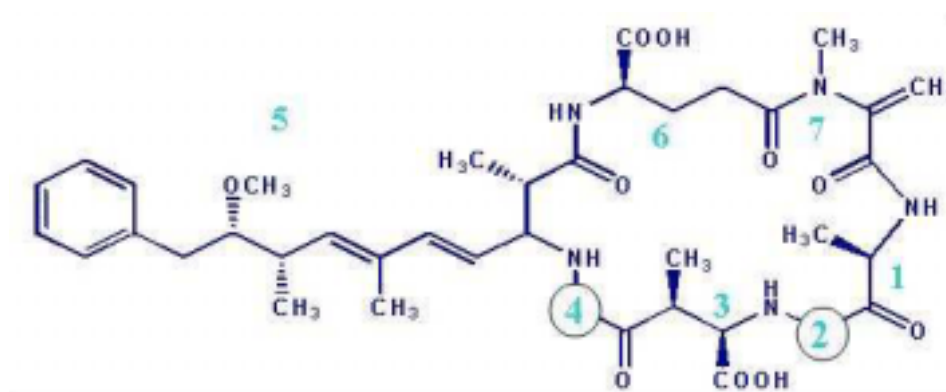


Figura FI-5: Estructura química general de las MC.

Actualmente hay identificadas más de 70 tipos diferentes de MC (Zurawell y col., 2005), en función de los distintos L-aminoácidos presentes en las posiciones 2 y 4 (**Tabla TI-2**), y de las desmetilaciones en los aminoácidos en posiciones 3 y 7 (Sivonen, 1998; Codd y col., 1999), además de los cambios que incluyen esterificaciones metílicas de D-Glu o las modificaciones de Mdha, con o sin desmetilación de D-MeAsp. Por último, existiendo también modificaciones del Adda, que encierran isomerizaciones geométricas del C-7, y desmetilaciones o sustituciones del

grupo metoxi con un grupo acetoxi en el C-9, con o sin variación de los aminoácidos 1, 3 y 7 (Zurawell y col., 2005).

En la posición 2, los L-aminoácidos más comunes son: leucina (L), arginina (R) y tirosina (Y), aunque también se han encontrados otros como fenilalanina (F), alanina (A), triptófano (W), etc. La sustitución más frecuente en la posición 4 es el aminoácido arginina (R), seguido de alanina (A), leucina (L), tirosina (Y), homoarginina (Har), etc. (Sivonen, 1998).

Estos aminoácidos presentes en las posiciones 2 y 4 se identifican con un sufijo de dos letras; por ejemplo, MC-LR contiene leucina (L) en la posición 2 y arginina (R) en la posición 4. Las toxinas más frecuentes en aguas naturales y de las que hay más estudios toxicológicos son MC-LR, MC-RR y MC-YR; no obstante, los estudios toxicológicos de MC-RR y principalmente de MC-YR son aún escasos.

Existen variaciones de la toxicidad de las distintas MC en función de los cambios en su molécula. Así, al sustituir el aminoácido hidrofóbico L-Leu en la posición 2 por otro L-aminoácido hidrofóbico (como alanina, fenilalanina o triptófano) la toxicidad se mantiene, pero si se sustituye por un aminoácido hidrofílico (como arginina) la toxicidad se ve drásticamente disminuida (Stotts y col., 1993). De esta forma, las MC que contienen sustituciones polares en los aminoácidos variables (posiciones 2 y 4), tales como MC-RR (arginina y arginina) y MC-M(O)R (metionina sulfóxido y arginina) son las menos tóxicas (**Tabla TI-2**). Las alteraciones en los residuos invariables pueden conducir a variaciones más o menos importantes en la toxicidad de las MC. Por ejemplo, la desmetilación de D-MeAsp o Mdha tiene poco efecto en la toxicidad; mientras que la esterificación del grupo libre carboxilo de D-Glu reduce la toxicidad

(Meriluoto y col., 1989; Harada y col., 1991; Namikoshi y col., 1992; Stotts y col., 1993). El reemplazo de Mdha por N-metilantionina también produce una reducción de la toxicidad. Cuando en el residuo Adda se sustituye el grupo metoxi por uno acetoxi o por la desmetilación en el carbono 9, no se ve afectada la toxicidad. Sin embargo, la isomerización del carbono 7 en Adda conduce a un análogo de MC de escasa toxicidad ($DL_{50} > 1200 \mu\text{g/Kg}$) (Harada y col., 1990).

Análogo	Estructura	PM ^(*)	Toxicidad ^a
MC-AR	Ciclo (-D-Ala-L-Ala-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	952	250
MC-FR	Ciclo (-D-Ala-L-Phe-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	1028	250
MC-HilR	Ciclo (-D-Ala-L-Hil-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	1008	100
MC-HytR	Ciclo (-D-Ala-L-Hty-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	1058	80-100
MC-LA	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Ala-Adda-D-Glu-Mdha-)	909	50
MC-Laba	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Aba-Adda-D-Glu-Mdha-)	923	Nd
MC-LF	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Phe-Adda-D-Glu-Mdha-)	985	Nd
MC-LL	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Leu-Adda-D-Glu-Mdha-)	951	Nd
MC-LM	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Met-Adda-D-Glu-Mdha-)	Nd	Nd
MC-LR	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	994	50
MC-LV	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Val-Adda-D-Glu-Mdha-)	Nd	Nd
MC-LW	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Trp-Adda-D-Glu-Mdha-)	1024	Nd
MC-LY	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Tyr-Adda-D-Glu-Mdha-)	1001	90
MC-M(O)R	Ciclo (-D-Ala-L-Met(O)-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	1028	700-800
MC-RA	Ciclo (-D-Ala-L-Arg-D-MeAsp-L-Ala-Adda-D-Glu-Mdha-)	953	Nd
MC-RR	Ciclo (-D-Ala-L-Arg-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	1037	500-800
MC-WR	Ciclo (-D-Ala-L-Try-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	1067	150-200
MC-YA	Ciclo (-D-Ala-L-Tyr-D-MeAsp-L-Ala-Adda-D-Glu-Mdha-)	959	60-70
MC-YM(O)	Ciclo (-D-Ala-L-Tyr-D-MeAsp-L-Met(O)-Adda-D-Glu-Mdha-)	1035	56-110
MC-YR	Ciclo (-D-Ala-L-Tyr-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	1044	150-200
MC-(H4)YR	Ciclo (-D-Ala-L-(H4)Tyr-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	1048	Nd

Aba: L-ácido aminobarbitúrico; Hil: L-homoleucina; Hty: L- homotirosina; M(O): metionina S-oxidada; (H4)Y: 1,2,3,4-tetrahidrotirosina

Nd: no disponible

(*) Peso Molecular

^a DL₅₀ intraperitoneal en ratón (µg/Kg)

Tomado de Zurawell y col., 2005

Tabla TI-2: Variantes de MC que difieren en los aminoácidos de las posiciones 2 y 4 y su toxicidad.

1.4. PRODUCCIÓN DE MICROCISTINAS

El/los mecanismo/s de producción de toxinas a partir de floraciones de cianobacterias están aún poco clarificados. Las MC se consideran metabolitos secundarios (Carmichael, 1992) y aunque no hay estudios concluyentes sobre la finalidad de su síntesis, los resultados de algunos estudios indican que podrían actuar como defensa contra posibles agresiones (Kurmayer y Jüttner, 1999; Henning y col., 2001), existiendo controversias acerca del papel fisiológico de las MC en la célula o fuera de ella (Sevilla, 2007). Dicho autor y el equipo de investigación de la Dra. Peleato han estudiado la posibilidad de que fuera una molécula de comunicación celular, cotejando la hipótesis de que las MC extracelulares pudieran desencadenar respuestas en otras células de la población. Observaron que no se producían cambios ni en la morfología ni en el crecimiento de las mismas y que además, tampoco se afectaba la síntesis de MC de las células tratadas.

La toxicidad de las cianobacterias es específica de cada cepa. Así, distintas cepas de una misma especie pueden no presentar toxicidad o ser neurotóxicas, hepatotóxicas, o bien neuro y hepatóxicas.

La producción de MC está regulada a 3 niveles (**Figura FI-6**):

1. Nivel genético: este es el factor crucial que determina la toxicidad de una cepa en particular.
2. Nivel celular: la producción de toxinas en cepas tóxicas está regulado por factores medioambientales. Sin embargo, el rango de su influencia no parece multiplicar la producción de MC en más de un factor de 10 (Sivonen y Jones, 1999).

3. Nivel poblacional: la toxicidad es relativa a la proporción de cepas tóxicas y no tóxicas de las comunidades de cianobacterias. Como las concentraciones de toxinas de cianobacterias pueden variar significativamente entre cepas (desde cero hasta más de varios miles de $\mu\text{g/g}$ de peso seco), la producción de toxinas en floraciones de cianobacterias puede variar más de 1000 veces.

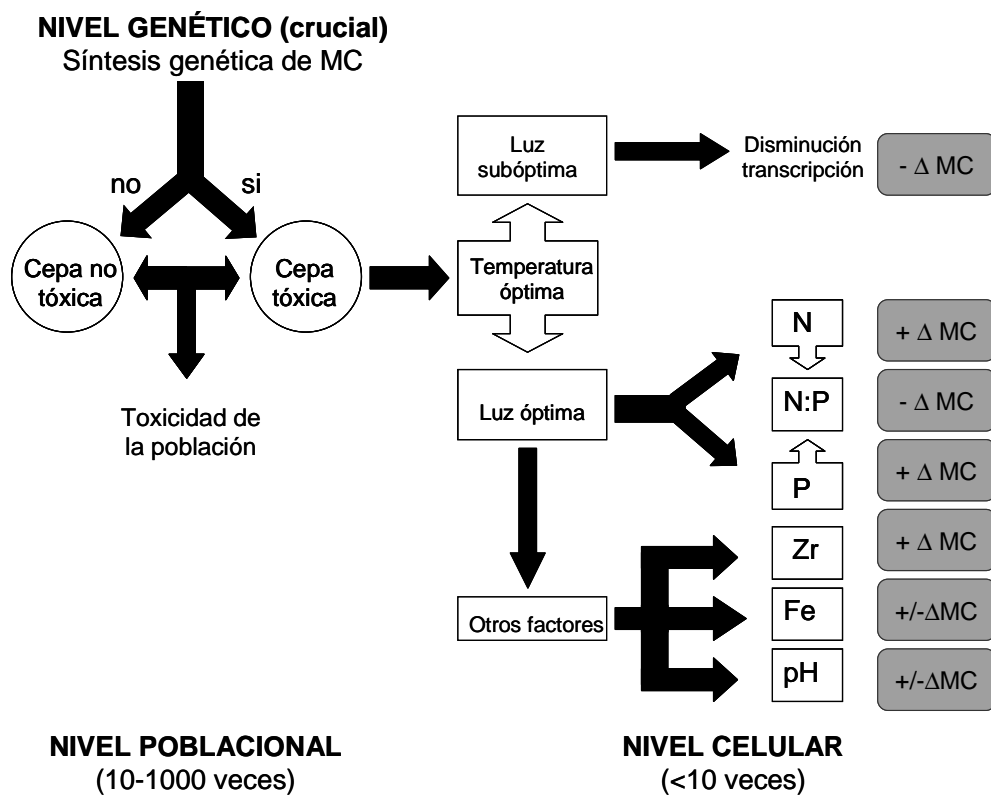


Figura FI-6: Resumen de los factores a nivel genético, celular y poblacional que afectan a la producción de MC. (Tomado de Zurawell y col., 2005).

Las MC son producidas de forma no ribosómica a través del complejo MC sintetasa (Kaebernick y Neilan, 2001), siendo su síntesis un proceso dependiente de energía (ATP) (Bickel y Lyck, 2001). El complejo de síntesis enzimática está codificado por el conjunto de genes *mcy* compuestos por dos operones (*mcyA-C* y *mcyD-J*) (Kaebernick y Neilan, 2001) que está presente en cepas tóxicas del género *Microcystis* y también en otras cepas productoras de MC como *Anabaena*, *Nostoc* y *Planktothrix* (Neilan y col., 1999) (**Figura FI-7**).

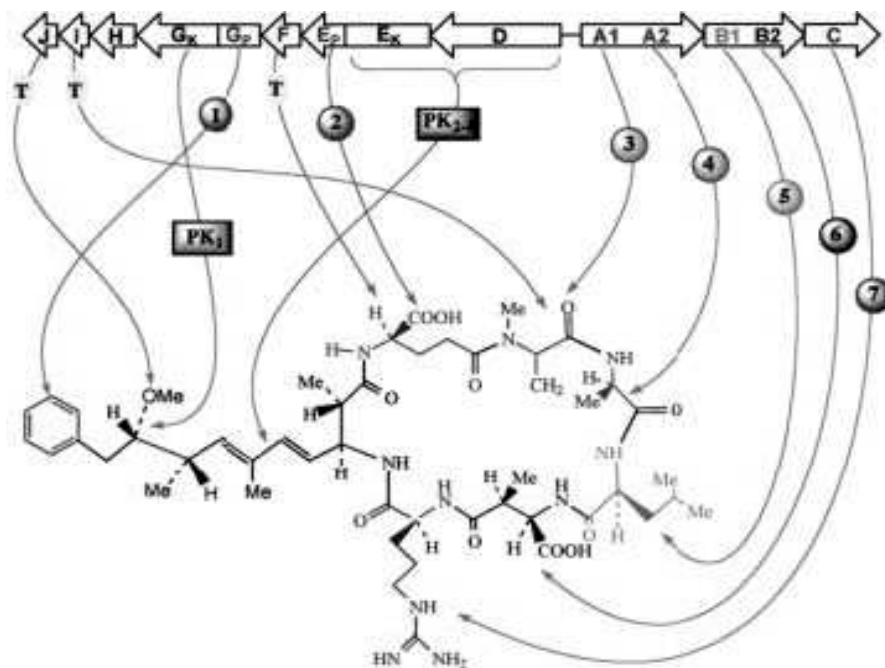


Figura FI-7: Modelo biosintético propuesto para MC-LR, mostrando la organización de los genes clusters *mcy* A-J y MC. Los círculos numerados indican el orden de aminoácidos incorporados en la creciente cadena sintetizada por los genes NRPS (*mcy* A, B, C, EP, GP). Dentro de *mcyA* y *mcyB* hay dos módulos A1/A2 y B1/B2, respectivamente. Los rectángulos numerados muestran el orden de la síntesis y formación de Adda (*mcy* GK, EK, D). Tomado de Kaebernick y Neilan (2001).

A pesar de la existencia de resultados contradictorios, son varios los factores que han demostrado influir en la síntesis de MC. En general, la síntesis de MC aumenta con el incremento de intensidad de luz o por la radiación (Wiedner y col., 2003). Además la calidad de la luz es un factor determinante, la luz azul no favorece la producción de toxinas mientras que la roja sí (Kaebernick y col., 2000). Así mismo, hay valores máximos de radiación por encima de los cuales la producción de MC queda inhibida (Wiedner y col., 2003). Sin embargo, otros estudios (Böttcher y col., 2001; Hesse y Kohl, 2001) concluyen que las variaciones en la intensidad de la luz en el medio ambiente tienen poca o ninguna relevancia en el contenido celular de MC y que las diferencias encontradas en la toxicidad de las floraciones constituidas por la misma especie de cianobacteria se deben principalmente a la velocidad de crecimiento y a las características tóxicas de las diferentes cepas.

La influencia de la temperatura e intensidad de la luz en la producción de MC podría ser un factor específico de cada especie o cepa, e incluso de las distintas toxinas. Así, la temperatura ha demostrado influir en el tipo de toxina producida, aumentándose la producción de MC-RR con altas temperaturas (>25°C), mientras que las bajas temperaturas favorecen la síntesis de MC-LR (Rapala y col., 1997). Posteriormente Rapala y Sivonen (1998) en un experimento similar con las mismas cepas, sugirieron que la producción de MC-LR estaba regulada en primera instancia por la luz, mientras que la producción de MC-RR se regía por la temperatura.

En floraciones de *M. aeruginosa*, cianobacteria no fijadora de nitrógeno, el contenido de MC aumenta a mayores proporciones de N: P (Utkilen y Gjølme, 1995; Lee y col., 2000), pero Long y col. (2001)

encontraron que el rápido crecimiento de células de *M. aeruginosa* bajo condiciones limitantes de nitrógeno está asociado con una mayor producción intracelular de MC. Por tanto, en general, la producción de MC en cepas de *Microcystis* parece verse influenciada por las concentraciones de nitrógeno y fósforo, siendo variable la respuesta, dependiendo de la cepa considerada (Vézic y col., 2002). Las cepas tóxicas de cianobacterias parecen tener unos requerimientos mayores de N y P que las cepas no tóxicas, posiblemente debido a la energía extra y materiales necesarios para la síntesis de las toxinas.

Estudios de laboratorio con *M. aeruginosa* PCC 7806 demuestran que la deficiencia de Fe disminuye el crecimiento y aumenta la síntesis de MC-LR (Sevilla, 2007). Peleato y su equipo han identificado una proteína dependiente de Fe, la Fur (Ferric Uptake Regulator), en dicha cepa de *Microcystis* (Martin-Luna y col., 2006a). Además proponen una regulación de la síntesis de MC vía Fur ya que ésta se une *in vitro* a regiones promotoras de los genes de biosíntesis de MC (Martin-Luna y col., 2006b).

En estudios de campo se ha comprobado que la concentración de MC en comunidades fitoplanctónicas naturales está relacionada con la producción celular de toxinas y con la biomasa de la especie productora de toxinas, que puede variar dinámicamente de forma temporal y espacial. En floraciones dominadas por una o dos cepas tóxicas, la toxicidad puede estar determinada por la biomasa de la principal cepa productora. Se ha comprobado que la concentración de MC-LR está altamente relacionada con la densidad y el biovolumen de *M. aeruginosa* (Kotak y col., 1995).

Concluyendo, la producción de toxinas en aguas naturales está influida por tres factores importantes (Kotak y col., 1995, 2000; Chorus, 2001):

1. La dinámica del fitoplancton, relativo a la abundancia de la biomasa en las especies productoras de toxinas,
2. La presencia variable de cepas de cianobacterias productoras y no productoras de toxinas, con diferentes características tóxicas y de crecimiento,
3. El efecto de factores medioambientales (concentración de nutrientes, temperatura, luz, metales, etc.).

1.5 EXPOSICIÓN

La exposición a MC puede ocurrir por diferentes vías: dérmica, inhalatoria, oral e intravenosa. En la **Tabla TI-3** se muestran las principales vías de exposición a MC en humanos y los principales efectos producidos.

En humanos la intoxicación directa vía oral por ingestión de aguas que contienen MC es poco probable, debido a las desagradables características de las mismas, generalmente aguas eutróficas. Sin embargo, se han producido brotes de gastroenteritis y hepatitis por el agua de bebida procedente de depósitos tratados con cloro en los que se ha inducido de forma natural o mediante la adición de cobre, la lisis de la célula y la liberación de las toxinas. Los síntomas más usuales fueron hepatomegalia, constipación, seguida de diarreas sanguinolentas y daño renal con pérdida de electrolitos, glucosa, cetonuria y deshidratación (Falconer, 1999).

Las exposiciones a aguas contaminadas con MC mientras se realizan actividades recreacionales han producido desde gastroenteritis e irritaciones cutáneas, hasta hepatitis y neumonía (Bell y Codd, 1994).

Las intoxicaciones más trágicas y masivas descritas han ocurrido en Brasil. La primera se produjo tras la ingestión de agua contaminada con cepas tóxicas de *Anabaena* y *Microcystis* en el que resultaron 2392 personas afectadas (Teixeira y col., 1993; Oliveira y col., 2005). El segundo episodio ocurrió en el centro de diálisis de Caruaru, Brasil, en el que 60 pacientes murieron por fallo hepático agudo, debido a la contaminación por MC del agua utilizada para la diálisis (Jochimsen y col., 1998; Pouria y col., 1998).

Vía de exposición	Exposición/Actividad	Efectos
Oral	Agua de bebida (ingestión accidental de floraciones o MC)	Hepatotoxicosis (agudas y crónicas)
	Alimentos contaminados (pescados, moluscos, plantas) Suplementos de algas	Transferencia a través de la cadena alimentaria
Piel y mucosas	Contacto directo (floraciones o MC)	Reacciones alérgicas, irritaciones
Inhalatoria	Duchas, baños y deportes acuáticos	Ruta minoritaria. Neumonía atípica, necrosis epitelio respiratorio

Tabla TI-3: Principales vías de exposición a MC y efectos tóxicos derivados.

Una de las vías de exposición de MC en el hombre es a través de la cadena alimentaria por la ingestión de peces y moluscos (Falconer y col., 1992a, Pillet y col., 1995, Vale y Sampayo, 2000) que han estado expuestos a cianobacterias y bioacumulado dichas toxinas. Se ha detectado la presencia de MC no sólo en vísceras, sino también en músculo de peces (Chen y col., 2007) y crustáceos, incluso en periodos de baja densidad de floración (Bury y col, 1995; Williams y col, 1997; Lawrence y Menard, 2001; Magalhaes y col, 2003).

La bioacumulación de las MC en peces y moluscos ha sido comprobada por diversos autores (Tencalla y col., 1994; Watanabe y col., 1997; Amorim y Vasconcelos, 1999; Thostrup y Christoffersen., 1999; Magalhaes y col., 2001; Lawrence y Menard., 2001; Mohamed y col., 2003; Xie y col., 2004; Vasconcelos y col., 2007). La mayoría de estos estudios han sido llevados a cabo en el laboratorio, existiendo pocos trabajos de campo realizados que permitan estimar el peligro real para la salud humana del consumo de animales acuáticos que previamente hayan ingerido MC (Magalhaes y col., 2003), destacando el más reciente de Song y col. (2007). Este hecho es importante porque las MC además de producirles efectos tóxicos a los propios peces y moluscos (Vasconcelos y col., 2007) que las ingieren, pueden acumularse en sus tejidos, transmitiéndose estas toxinas, mediante la cadena alimentaria, a los humanos (Mohamed y col., 2003). Datos obtenidos en el laboratorio muestran que tanto los moluscos (Amorim y Vasconcelos, 1999) como los peces fitoplanctívoros (Chen y col., 2007; Qiu y col., 2007) son resistentes a las MC, no detectándose mortandad o registrándose ésta en un rango muy bajo (Vasconcelos, 1995; Vasconcelos y col., 2001).

Se ha demostrado que la acumulación de MC en músculo de pescados (*Tilapia rendalli*) procedentes de lagos con floraciones de cianobacterias tóxicas, incluso en periodos de baja densidad de floración, puede conducir a valores muy próximos a la Ingesta Diaria Tolerable (IDT, 0,04 µg MC/kg para un peso medio de 60kg) establecida por la OMS para las MC (de Magalhaes y col., 2001). Existen estudios que comprueban la tendencia de acumulación de las MC en peces (lago Chaohu) observándose la mayor concentración de MC en músculo e hígado de peces carnívoros, seguidos de omnívoros y por último fitoplanctívoros y herbívoros (Xie y col., 2005). Zhao y col. (2006) demuestran una mayor acumulación de MC en hígado de tilapias expuestas de forma crónica a cianobacterias en la dieta, alcanzándose en músculo concentraciones superiores a la IDT recomendada por la OMS, no siendo adecuadas para el consumo humano. Estudios recientes, muestran que el 25% de las muestras de músculo de carpas expuestas a MC en el lago Taihu (China) superaban la IDT (Chen y col., 2007). En dicho lago, tras una evaluación del riesgo tóxico, Song y col. (2007) concluyen que el consumo de cuatro especies acuáticas diferentes no era seguro para la población humana, ya que en el 89,5% de los casos las concentraciones de MC fueron entre 2-23 veces más elevadas que la IDT anteriormente mencionada.

Teniendo en cuenta estos hechos, es necesario llevar a cabo un seguimiento de peces y otros animales acuáticos expuestos a cianobacterias. Para ello se requiere el desarrollo de programas de monitorización de fitoplancton tóxico tanto en piscifactorías como en ríos, embalses, etc., en los cuales se lleve a cabo el cultivo de peces o la pesca habitualmente. Igualmente, se debe disponer de métodos analítico-toxicológicos que permitan una adecuada monitorización de MC en peces y moluscos potencialmente contaminados. Asimismo debemos disponer de métodos que

permitan detectar efectos tóxicos tempranos en dichas especies, con el objetivo de o bien actuar de forma temprana e intentar paliar dichos efectos en peces o moluscos, o bien evitar que estos alimentos lleguen al consumidor.

Además, se puede producir una exposición a MC por la ingestión de legumbres y hortalizas que hayan sido regadas con aguas contaminadas debido a la acumulación de estas toxinas en el alimento (Codd y col., 1999). Este hecho se ha descrito en lechugas (Watanabe y col, 1997), habas francesas (Magalhaes y col; 2001), brotes de patata y semillas de mostaza (McElhiney y col., 2001), en arroz y colza (Chen y col., 2004) y en la cardamina (*Lepidium sativum*) (Stüven y Pflugmacher, 2007). Recientemente se han detectado MC en suplementos alimentarios procedentes de cianobacterias de aguas dulces. Concretamente se detectó la presencia de genes de MC sintetasa, confirmando posteriormente la existencia de MC por ELISA (Saker y col., 2005). Se ha podido evidenciar la presencia de MC-LR en el 57% de los suplementos dietéticos de cianobacterias analizados en un estudio llevado a cabo por Campos-Serrano y col., 2005. Recientemente, Pflugmacher y col. (2007) han demostrado la acumulación de estas toxinas (MC-LR, MC-LF y MC-LR con células libres de cianobacterias) en semillas de diversas especies de plantas importantes en agricultura (*Pisum sativum*, *Medicago sativa*, *Lens culinaris*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Glicine mays*...) existiendo una correlación entre dicha acumulación y los daños celulares detectados, como por ejemplo, la medida de peroxidación lipídica (LPO).

No sólo se ha demostrado su acumulación en plantas terrestres consumidas directamente por el hombre, sino también en plantas acuáticas

como *Ceratophyllum demersum* (Pflugmacher y col., 1998a; 2001; Pflugmacher, 2004) y *Lemna gibba* (Saqrane y col., 2007), con el consecuente daño celular en las distintas especies. Los efectos fisiológicos inducidos por la exposición crónica a MC confirman que las plantas acuáticas que coexisten con floraciones de cianobacterias pueden sufrir un importante impacto ecológico negativo representando un riesgo sanitario debido a la bioacumulación de toxinas y su biotransferencia a través de la cadena alimentaria (Saqrane y col., 2007).

1.6. EFECTOS TÓXICOS DE LAS MICROCISTINAS

Las MC son hepatotoxinas muy potentes en mamíferos y peces (Towner y col., 2002). En la mayoría de los países de todo el mundo se han producido intoxicaciones graves e incluso fatales en el ganado, animales domésticos y salvajes, peces y aves, debidas a floraciones de cianobacterias. La intoxicación aguda tiene como consecuencia principal la producción de hemorragia hepática, rápida desorganización de la arquitectura hepática y rotura de capilares sinusoidales. Por otro lado, la exposición crónica a MC provoca la degeneración generalizada de los hepatocitos acompañada de necrosis, fibrosis progresiva e infiltración de leucocitos mononucleares (Carmichael, 1992).

Las propiedades anfipáticas de las MC favorecen su penetración en las membranas celulares. Por otro lado, las MC son absorbidas fundamentalmente por un transportador específico de sales biliares localizado en el hepatocito (Runnegar y col., 1995) lo que facilita la entrada de las MC en el hígado y justifica su organotropía (Milutinovic y col., 2003). Este hecho se evidencia debido a que el transporte de MC es inhibido

por ácidos biliares. Actualmente se apunta a la presencia del polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP) como responsable del transporte de las MC al interior de las células (Hagenbuch y Meier, 2003; 2004) (ver apartado 1.7).

1.6.1. Efectos en humanos

Ya se ha comentado que debido al rechazo de la población a beber aguas contaminadas con cianobacterias por el mal olor y sabor producidos por éstas, no se han llegado a producir grandes fatalidades como resultado de la exposición a MC (Kotak, 1991), a excepción de las intoxicaciones ocurridas en Brasil, ya mencionadas. La primera de ellas ocurrió tras la ingestión de agua contaminada con cepas tóxicas de *Anabaena* y *Microcystis* en la que resultaron 2392 personas afectadas, de las cuales murieron 88 (Teixeira y col., 1993; Oliveira y col., 2005); y la otra, en febrero de 1996, en el centro de diálisis de Caruaru, en la que 126 pacientes presentaron diversos síntomas debidos a la contaminación del agua utilizada para la diálisis, de los cuales murieron 60, por fallo hepático agudo (Jochimsen y col., 1998; Pouria y col., 1998; Carmichael y col., 2001; Azevedo y col., 2002). Los síntomas iniciales fueron dolor de cabeza, malestar en los ojos, visión borrosa, náuseas y vómitos. Fue una intoxicación masiva, de forma que aproximadamente unos 100 pacientes sufrieron fallo hepático agudo, denominándose este hecho “Síndrome de Caruaru”. Estudios posteriores confirmaron la presencia de MC-LR, MC-YR y MC-AR tanto en hígado como en suero de los pacientes fallecidos en dicho episodio; asimismo, se demostró la presencia de MC-LR en el material de relleno de las columnas de filtración de agua empleadas para la hemodiálisis.

Los síntomas principales que presentan las personas que han estado en contacto con MC son: irritaciones de la piel y de los ojos, episodios alérgicos, fatiga, mareos y gastroenteritis agudas (**Tabla TI-4**). Cuando se ha producido la ingestión accidental de MC presentes en el agua de bebida, los síntomas más usuales han sido: dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarreas, tos seca, dolor de cabeza, neumonía atípica y elevación de enzimas hepáticas séricas como la γ -glutamyltransferasa (Carmichael, 1996a).

Por otro lado se ha demostrado una acción inmunomoduladora de MC-LR sobre los leucocitos polimorfonucleares humanos, a concentraciones por debajo del límite guía recomendado por la OMS, por lo que el consumo de aguas contaminadas con cianobacterias podría inducir una disminución de la resistencia a las infecciones, un aumento de la incidencia de tumores, episodios de alergia, etc. (Hernández y col., 2000).

El mayor riesgo tóxico deriva de la exposición crónica a MC, generalmente por consumo de agua de bebida contaminada. Diversos estudios epidemiológicos sugieren una mayor incidencia de carcinoma hepatocelular y colorrectal en zonas cuyas aguas de bebida están contaminadas por MC (Yu, 1995; Fujiki y col., 1996; Zhou y col., 2002). De hecho, la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC), ha clasificado recientemente a MC-LR como posible carcinógeno para humanos (Grupo 2B) y los extractos de *Microcystis* no son clasificables por su carcinogenicidad en humanos (Grupo 3) (<http://www.iarc.fr/>).

LUGAR DE ACCIÓN	SÍNTOMAS Y EFECTOS	REFERENCIAS
Piel, ojos, oídos y boca	Síntomas: irritación ocular, de oídos y de la piel, con descamación, erupciones y aparición de ampollas en la piel y en la boca.	Bell y Codd., 1994 Carmichael, 1996a
Hígado	Hepatitis con hepatomegalia y dolor abdominal. Elevados niveles de los enzimas hepáticos en suero.	Bell y Codd, 1994 Carmichael, 1996a Falconer, 1999
Riñón	Daño en riñón, con pérdida de electrolitos, glucosa, cetonas y sangre en la orina. Deshidratación.	Falconer, 1999
Tracto digestivo	Gastroenteritis con dolor abdominal, diarrea, vómitos y náuseas.	Jochimsen y col., 1998 Bell y Codd., 1994 Carmichael, 1996a
Tracto respiratorio	Dolor de garganta, tos seca, neumonía atípica.	Carmichael, 1996a
Otros efectos	Reacciones alérgicas: síntomas de asma y fiebre del heno. Incremento de los niveles de Ig E. Dolor de cabeza, mareos y letargo.	Bell y Codd, 1994 Carmichael, 1996a

Tabla TI-4: Principales síntomas y efectos tóxicos observados en el hombre.

También es de particular interés su capacidad teratogénica. Se considera que son necesarios estudios epidemiológicos en esta dirección, ya que se ha encontrado una relación entre exposición crónica a MC en el primer trimestre de embarazo por consumo de agua de bebida, y un aumento de defectos congénitos (Codd y col., 1999).

1.6.2. Estudios en animales terrestres

En la evaluación de la toxicidad de las MC se han calculado los valores de DL_{50} en diversos animales de experimentación. En ensayos realizados en nuestro laboratorio (Moreno y col., 2005a) se concluyó que la DL_{50} de MC-LR en rata por vía intraperitoneal (i.p.) fue de 106 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Este resultado fue similar a los referenciados por Miura y col., (1991) los cuales determinaron una DL_{50} de 122 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de MC-LR por vía i. p. para ratas alimentadas y de 72 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para ratas en ayunas. Sin embargo, es más elevado en comparación con los resultados obtenidos por otros autores, que refieren una DL_{50} de 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de MC-LR por vía i. p. (Dow y Swoboda, 2000). No obstante, todos estos valores se encuentran dentro del rango de 25-125 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de MC-LR por vía i.p. apuntado por Dawson (1998) y la OMS (1998).

Los valores de DL_{50} obtenidos en ratones oscilan entre 32,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de MC-LR por vía i. p. (Botes y col., 1985; Robinson y col., 1989). Incluso se han recogido valores de DL_{50} comprendidos entre 50 y 158 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Fawell y col., 1999), como apuntaron Kaya (1996) encontrando una DL_{50} vía i.p. de 110 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en ratones. MC-YR tiene una DL_{50} (i.p. en ratón) de 70 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y MC-RR de 300-600 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (OMS, 2003).

La toxicidad de MC-LR por vía inhalatoria es también elevada presentando una DL_{50} de 43 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en rata (Creasia, 1990), 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en administración intranasal (Fitzgeorge y col., 1994) y entre 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en administración intratraqueal (Ito y col., 2001). Sin embargo, esta toxina es mucho menos tóxica por ingestión oral (Ito y col., 1997), con una DL_{50} de 3000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en ratones (Fitzgeorge y col., 1994).

MC-LR es una de las MC más tóxicas en ratones adultos, sin embargo es poco tóxica para ratones recién nacidos. El sólo hecho de sustituir L-leucina por L-arginina, obteniéndose MC-RR, hace que se produzcan cambios en la toxicidad, ya que dicha toxina es menos tóxica en ratones adultos y por el contrario es muy tóxica en ratones recién nacidos (Stoner y col., 1989).

En la mayoría de las especies, pero sobre todo en mamíferos, el hígado es el órgano más afectado, mostrando una necrosis hemorrágica extensa y una disrupción de capilares sinusoidales (Kaya, 1996). El shock hemorrágico secundario a dicha necrosis hepatocelular y colapso del parénquima hepático conduce a la muerte (Theiss y Carmichael, 1985). Ésta se puede producir en pocas horas (4-24 horas) o en pocos días, y suele venir precedida por coma, temblor muscular, palidez y dificultad en la respiración. Se ha apuntado que MC-LR podría unirse a la enzima ATP sintetasa, pudiendo conducir a la apoptosis celular (Mikhailov y col., 2003). Otros efectos observados son: diarrea sanguinolenta, engrosamiento hepático y hemorragia intrahepática.

En los animales intoxicados, pueden encontrarse restos de algas en el estómago y en el tracto digestivo, al igual que en la boca, hocico y patas.

Uno de los primeros efectos (15-30 minutos) que se observan en la intoxicación por MC es una elevación en los niveles séricos de los ácidos biliares, fosfatasa alcalina (PA), γ -glutamyl transferasa (γ -GT) y aspartato aminotransferasa (GOT), además de un aumento en el número de glóbulos blancos (Carmichael, 1996a). Las MC tienen afinidad por los hepatocitos, razón por la cual se concentran en el hígado, y son activamente absorbidos por las células hepáticas (Dawson, 1998). Una vez en el hepatocito, forman aductos con las fosfatasas de proteínas PP1 y PP2A del citoplasma y el núcleo, como veremos en el apartado 1.7.1 de mecanismos de acción, inhibiéndolas y conduciendo a la disrupción de la arquitectura hepática y necrosis difusa hepatocelular lo que permite el paso de la sangre a los espacios intersticiales, causando una hemorragia intrahepática severa en la región centrilobular. Esto conduce a una hepatomegalia y disminución de la presión arterial de sangre, lo que puede llegar a producir incluso la muerte por shock hipovolémico (Beasley y col., 2000; Fitzgerald, 2001).

Debido al fallo de la gluconeogénesis hepática y otros mecanismos que controlan el metabolismo de la glucosa, puede producirse una severa hipoglucemia que complicaría aún más el cuadro clínico (Runnegar y col., 1987; Beasley y col., 2000).

Las MC no son hidrolizadas por las peptidasas intestinales y concretamente MC-LR se absorbe por el intestino (Dow y Swoboda, 2000). De esta forma, aunque el primer efecto observado de la intoxicación de MC sea en el hígado, también se afectan otros órganos como son el tracto intestinal y los riñones (Milutinovic y col., 2003; Botha 2004b; Moreno y col., 2005a).

Los efectos gastrointestinales incluyen deformación de los enterocitos, gastroenteritis y hemorragia, lo que sería una consecuencia directa de la absorción de la toxina vía epitelio intestinal (Falconer y col., 1992b; Chorus y col., 2000). Los efectos en el riñón consisten en lesiones en el glomérulo y túbulo colector, con aumento de la urea, creatinina y potasio en sangre (Beasley y col., 2000; Milutinovic y col., 2002).

Se ha demostrado que los extractos de *Microcystis* contienen compuestos teratogénicos para mamíferos expuestos por vía i.p. o por incubación con los embriones de ratón (Bu y col., 2006; Ding y col., 2006); pero no se sabe aún si estos efectos son debidos a las MC en sí, o a otros compuestos presentes en dichos extractos (Falconer, 2007).

1.6.3. Efectos en organismos acuáticos

Las MC pueden afectar a una gran cantidad de organismos acuáticos, desde microalgas hasta mamíferos (Wiegand y Pflugmacher, 2004). La falta de fitoplancton alternativo como alimento cuando las cianobacterias son las especies dominantes, fuerza al zooplancton a consumirlas. Algunas especies de crustáceos evitan ingerir cianobacterias que contengan MC. Sin embargo, otras especies de cladóceros son menos selectivas (Kurmayer y Jüttner, 1999), siendo capaces de ingerir tanto cianobacterias tóxicas como no tóxicas (Rohrlack y col., 1999) en condiciones de escasez de alimento, acumulando las MC (Mitrovic y col., 2005) y pudiendo transferirlas potencialmente a niveles superiores de la cadena trófica.

Se han observado efectos tóxicos en invertebrados acuáticos tras las ingestión de MC como en *Daphnia* sp. (Jungmann, 1992; Reinikainen y col., 1995; Thostrup y Christoffersen, 1999; Rohrlack y col., 2001; Henning

y col., 2001), *Artemia salina* (Campbell y col., 1994; Beattie y col., 2003), *Palaemon modestus*, *Macrobrachium nipponensis* (Chen y Xie, 2005) y *Penaeus monodon* (Kankaanpää y col., 2005), observándose en algunos casos acumulación de toxinas en el hepatopáncreas. Los bivalvos como los mejillones (*Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis*) son capaces de bioacumular MC en sus tejidos (Watanabe y col., 1997; Williams y col., 1997; Vasconcelos, 1999); ésto también se ha detectado en otros bivalvos como *Anodonta cygnea* (Eriksson y col., 1989a), *Anodonta woodiana*, *Unio douglasiae* y *Cristaria alicata* (Watanabe y col., 1997; Yokoyama y Park, 2002) así como en *Anodonta grandis simpsoniana* (Prepas y col., 1997). Hay evidencias de que las MC acumuladas en bivalvos pueden perdurar hasta un año, siendo difícil predecir la concentración de MC en los mismos ante la existencia de una floración (Yokoyama y Park, 2002). También los cangrejos (*Procambarus clarkii* y *Pacifastacus leniusculus*) acumulan estas cianotoxinas en intestino y hepatopáncreas (Liras y col., 1998; Vasconcelos y col., 2001).

La mortandad de peces se ha asociado en ocasiones a floraciones tóxicas de cianobacterias (Andersen y col., 1993; Carbis y col., 1997; Zimba y col., 2001). Algunos de estos incidentes han sido atribuidos a causas indirectas como la disminución de oxígeno (Peñazola y col., 1990) o el aumento de la concentración de amonio disuelto en agua (Paley y col., 1993; Bury y col., 1995). Sin embargo, existen evidencias que implican a las MC en la mortandad de peces observada en lagos y embalses de agua en los que han crecido floraciones de cianobacterias (Carbis y col., 1997; Zimba y col., 2001). Las MC han ocasionado episodios de muerte masiva en peces, siendo responsables de la enfermedad denominada “Netpen Liver Disease” (NPLD) en salmones procedentes del Atlántico criados en

cautividad, causando importantes pérdidas económicas en la industria de cultivos marinos (Andersen y col., 1993).

La DL₅₀ de MC-LR en carpas (*Cyprinus carpio*), via i.p. oscila entre 300 y 550 µg/Kg (Rabergh y col., 1991) y en truchas (*Oncorhynchus mykiss*), por esta misma vía, se encuentra entre 400 y 1000 µg/Kg (Kotak y col., 1996). Por tanto, la DL₅₀ para peces es más elevada en comparación con mamíferos roedores. Sin embargo, hay que recalcar que en peces, las MC no sólo son hepatotóxicas, sino que afectan a un mayor número de órganos (Bury y col., 1996a; Kotak y col., 1996; Bury y col., 1998a,b; Vajcová y col., 1998; Fischer y Dietrich, 2000a; Best y col., 2001).

Además, las cianobacterias pueden constituir parte de la dieta de algunas especies de peces como ciclidos y ciprínidos tropicales (Bowen y col., 1982). De hecho, se han encontrado células de *Microcystis* en el estómago de peces, confirmando este hecho (Mohamed y col., 2003).

Algunos estudios de campo han demostrado que las MC pueden acumularse en tejido de peces (especialmente en hígado) pudiendo llegar a ser transferidas a lo largo de la cadena alimentaria (Magalhaes y col., 2001). La **Tabla TI-5** refleja la acumulación de MC en distintos órganos de peces observada en estudios de campo.

Especie piscícola/ Lugar de muestreo	Método de detección	Órganos en los que se detecta MC	Referencias
Pez blanco (<i>Coregonus lavaretus</i> L.)/Lago Ammersee (Alemania)	Inmunoensayo con anticuerpos para MC	Intestino	Ernst y col., 2001
Tilapia (<i>Tilapia rendalli</i>)/costa del lago Jacarepagua (Río de Janeiro)	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Proteínas Hígado	Magalhaes y col., 2001
Platija (<i>Platichthys flexus</i>)/oeste de Gula (Finlandia)	Ensayo de inmunoafinidad (ELISA)	Hígado Vísceras Tejido muscular	Sipia y col., 2001
Carpa (<i>Aristichthys nobilis</i>)/ lago Taihu	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y Cromatografía líquida- Espectrometría de masas (LC-MS)	Intestino Riñón Hígado Bazo Vesícula biliar Músculo Sangre Branquias	Chen y col., 2007

Tabla TI-5: Acumulación de MC observada en estudios de campo en tejidos, sangre o heces de peces, dependiendo de la concentración de toxinas o de células de cianobacterias presentes en el agua.

No sólo se ha detectado acumulación de MC en peces mediante estudios de campo, sino también en diversos estudios experimentales, como se refleja en la **Tabla TI-6**.

Especie piscícola/Exposición	Método de detección	Órganos en los que se detecta MC	Referencias
Pez oro (<i>Carassius auratus</i>)/MC-LR (125 µg/Kg peso corporal) o MC-LR (10 µg) sobre hepatocitos incubados 4 horas	Ensayos de inhibición de fosfatasas de proteínas (PPA)	Hígado	Malbrouck y col., 2003 Malbrouck y col., 2004
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)/floración con MC-RR, MC-LR y MC-YR (357,3±26,8 µg/g peso seco)	Ensayos de inhibición de fosfatasas de proteínas (PPA)	Hepatopáncreas Tejido muscular	Li y col., 2004
Carpa plateada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)/ MC-LR (268-580 µg/g peso seco) MC-RR (110-292 µg/g peso seco)	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Sangre Hígado Tejido muscular Heces	Jang y col., 2004
Alevines de tilapia (<i>Tilapia rendalli</i>)/ 20,4 µg/g MC-pezu-día durante 15 días; 14,6 µg/g MC-pezu-día durante 28 días; 2,2 µg/g MC-pezu-día durante 42 días	Inmunoensayo (ELISA)	Hígado Tejido muscular	Soares y col., 2004

<p>Carpa plateada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)/ Extracto hepatotóxico de microcistinas con MC-LR, MC-RR y MC-YR. Una dosis de 1000 µg MC-LReq/kg pez vía i.p. Sacrificio a la hora, 3 horas, 12 horas, 24 horas y 48 horas de la exposición.</p>	<p>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS)</p>	<p>Hígado</p>	<p>Li y col., 2007a</p>
--	--	---------------	-------------------------

Tabla TI-6: Acumulación de MC observada en estudios experimentales en tejidos, sangre o heces de peces, dependiendo de la concentración de toxinas administrada.

La tilapia (*Oreochromis niloticus*) es un pez de agua dulce que acumula MC en opérculos, hígado y riñón (Mohamed y col., 2003) mientras que otros peces pueden además acumularlas en tejido muscular (Magalhaes y col., 2001). Según Cazenave y col. (2005), una vez absorbidas las MC en peces, bien a través de los opérculos o por el epitelio intestinal, se produce un rápido transporte de las toxinas a través del flujo sanguíneo, distribuyéndose a varios órganos o tejidos; por esta razón encontramos una mayor distribución de MC en aquellos órganos más irrigados como el hígado, riñón, intestinos y opérculos. Chen y col. (2007) han detectado altas concentraciones de distintos congéneres de MC (-LR, -RR, -YR) en órganos como intestino, riñón, hígado, bazo, vesícula biliar, músculo, sangre y branquias de carpas (*Aristichthys nobilis*), destacando su presencia en el intestino medio. Otro estudio, llevado a cabo por Li y col. (2007c) demuestra que en carpas expuestas de forma aguda por vía i.p. a células de

cianobacterias (conteniendo MC-LR, MC-RR y MC-YR) las MC se distribuyen fundamentalmente en riñón, vesícula biliar e intestino.

Los opérculos y el epitelio de la piel de los peces de agua dulce se consideran barreras para el transporte de MC (Bury y col., 1995; 1998b). Tencalla y Dietrich (1997) demostraron la rápida, aunque limitada, absorción de MC (>5% de la dosis total de MC) desde el tracto gastrointestinal hasta la sangre en trucha arcoiris alimentada con *M. aeruginosa* tóxica. Una vez en sangre, la toxina (aproximadamente 1,7% de la dosis) se acumula rápidamente en hígado donde se une covalentemente a fosfatasas de proteínas (Tencalla y Dietrich, 1997). Ésto también ocurre en salmón atlántico inyectado i.p. con MC, observándose a las 24 h que la mitad de los metabolitos de MC formados (más polares que MC-LR) carecían de actividad inhibitoria de las fosfatasas de proteínas (Williams y col., 1997). Se sugiere que la bilis juega un importante papel en la eliminación de MC a partir del hígado de peces alimentados por vía oral con *M. aeruginosa* (Sahin y col., 1996). Se ha detectado la presencia de MC en bilis y sangre de peces (Xie y col., 2005). El hecho de que el aclaramiento de MC de los tejidos del pez se realice rápidamente, comparado con los mamíferos, podría explicar en parte, la mayor resistencia del pez a las hepatotoxinas de cianobacterias (Williams y col., 1995).

En general, los efectos tóxicos de MC observados en peces son similares en muchos aspectos a los estudiados en mamíferos (Theiss y col., 1988; Miura y col., 1989; Li y col., 2001), aunque existen algunas diferencias. Así, el aumento de la masa hepática producido tanto en peces como en ratones parece tener distinto origen (Kotak y col., 1996), atribuyéndose en peces a una retención de agua, mientras que en ratones se

debe a una hemorragia. En peces, se ha comprobado que las MC además de afectar al hígado produce cambios histopatológicos en hepatopáncreas, intestino, riñón (Vajcová y col., 1998; Fischer y Dietrich, 2000a; Cazenave y col., 2005; Molina y col., 2005; Xie y col., 2005), función cardiaca (Best y col., 2001; Liu y col., 2002), opérculos (Bury y col., 1996b; Carbis y col., 1997; Bury y col., 1998a; Cazenave y col., 2005) y cerebro (Fischer y Dietrich, 2000b; Cazenave y col., 2005). Los órganos más afectados parecen ser el hígado y el riñón, produciéndose una disociación y degeneración de los hepatocitos en el hígado y una dilatación de la cápsula de Bowman en riñón. También se han detectado alteraciones en diversos parámetros sanguíneos (Navrátil y col., 1998; Koop y Hetesa, 2000) e inmunológicos (Palíková y col., 1998) y elevación de enzimas séricas (Carbis y col., 1997).

En estudios con embriones de peces, que se expusieron a MC por microinyección, se observaron daños hepatobiliares diversos como hipertrofia, hemorragia hepática, necrosis y aumento de la masa hepatobiliar (Jacquet y col., 2004). En otros estudios con embriones (*Misgurnus mizolepis*) se observó afectación hepática y alteraciones cardiacas (Liu y col., 2002).

Aunque se ha demostrado que el pez es susceptible a la acción tóxica de MC durante muchos estadios de su vida, tras la exposición a estas toxinas vía oral o por inmersión en agua que las contengan, suele existir un tiempo de latencia más o menos prolongado hasta que se inducen los efectos adversos y consecuentemente la mortalidad (Carbis y col., 1997). En la siguiente tabla (**Tabla TI-7**) se resumen algunas de las patologías producidas:

Patología	Hígado	Riñón
Cambios macroscópicos	Vasodilatación general, congestión severa del hígado y daño generalizado	
Cambios histológicos	Pérdida de la estructura celular resultante de la disociación de los hepatocitos, necrosis masiva colicuativa y pérdida de la arquitectura del parénquima hepático. Disrupción de canalículos biliares.	Dilatación de la cápsula de Bowman del glomérulo renal y progresiva degeneración de túbulos que conlleva a la necrosis coagulativa del epitelio tubular.
Cambios ultraestructurales	Condensación de mitocondrias, fragmentación y vesiculación del retículo endoplásmico rugoso (RER) con pérdida de ribosomas. Acumulación periférica de los microfilamentos del citoesqueleto. Vacuolización celular, picnosis nuclear y colapso de la membrana nuclear.	Lisis del epitelio tubular.

Tabla TI-7: Principales patologías producidas por MC en hígado y riñón de peces. (Tomado de Zurawell y col., 2005).

Además, son múltiples y muy diversos los daños producidos sobre algunas funciones metabólicas en peces. Así, en la tabla siguiente (**TI-8**) se resumen algunos cambios metabólicos importantes producidos en peces:

Especie piscícola	Dosis administrada y vía de exposición	Efectos observados	Referencias
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>M. aeruginosa</i> 1440 mg extracto seco congelado de alga/Kg de masa corporal, 6.600 µg MC/Kg peso medio	Muerte en las primeras 96 horas.	Tencalla y col., 1994
Trucha marrón (<i>Salmo trutta</i>)	63 días de tratamiento a: -MC-LR purificada (41-57 µg MC-LR/L) - Lisado de células tóxicas de <i>M.aeruginosa</i> (41-68 µg MC-LR) - Lisado de células no tóxicas de <i>M.aeruginosa</i> (sin MC-LR/L)	Disminución del crecimiento (más marcado en los tratados con el lisado de células tóxicas). Aumento del flujo de sodio (en los tratados con el lisado de células tóxicas y con MC-LR pura). Aumento de flujo de sodio y cloro (en los tratados con el lisado de células tóxicas).	Bury y col., 1995

<p>Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)</p>	<p>MC-LR purificada (90 mg/L)</p> <p>Extractos de <i>M.aeruginosa</i> PCC 7820 o CYA 43</p>	<p>Ningún efecto.</p> <p>Después de 24 horas, inhibición del flujo de calcio corporal, aumentando en las vesículas plasmáticas de la membrana basolateral, retículo endoplasmático (RE) y mitocondrias.</p> <p>Hipocalcemia plasmática.</p>	<p>Bury y col., 1996b</p>
<p>Trucha marrón (<i>Salmo trutta</i>) y Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</p>	<p>Administración vía aorta dorsal de:</p> <p>300 µg MC-LR/Kg</p> <p>75 µg MC-LR/Kg</p> <p>25 µg MC-LR/Kg</p>	<p>Aumento de la actividad alanina aminotransferasa y lactato deshidrogenasa en sangre a las 24 horas.</p> <p>Aumento de la actividad alanina aminotransferasa y lactato deshidrogenasa en sangre a las 24 horas en la trucha marrón pero no en la trucha arcoiris.</p> <p>Sin efectos en ambas especies.</p>	<p>Bury y col., 1997</p>
<p>Trucha marrón (<i>Salmo trutta</i>) y Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</p>	<p>300 µg MC-LR/Kg</p> <p>25 µg MC-LR/Kg</p>	<p>Después de 24 horas, destrucción de la estructura del parénquima en la trucha marrón y engrosamiento de los hepatocitos junto con necrosis hepática en ambas especies.</p> <p>Después de 48 horas aumento de los indicios hepatosomáticos, dependiente de la dosis en ambas especies.</p>	<p>Bury y col., 1997</p>

Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Exposición de las membranas branquiales aisladas a extractos de ácidos grasos de <i>M.aeruginosa</i> PCC 7820 o CYA 43	Inhibición de la actividad p-nitrofenol fosfatasa dependiente de potasio.	Bury y col., 1998a
Alevines de carpa común (<i>Ciprinus carpio</i>) y carpa plateada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	400 µg MC-LR/Kg, vía i.p. MC-LR en dosis únicas de 3, 300, 600 y 1200 µg/Kg de masa corporal	Disminución del contenido leucocitario, principalmente de los linfocitos en la carpa común y de los mielocitos en la carpa plateada. Un menor cambio de la actividad fagocítica tras la administración i.p. en la carpa común. Una mayor disminución de mielocitos en la carpa plateada.	Paliková y col., 1998
Carpa plateada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	250 ó 400 µg/Kg de masa corporal de MC-LR pura inyectada i.p.	Después de 48 horas incremento altamente significativo de las actividades lactato deshidrogenasa, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y disminución significativa de la concentración de proteínas totales	Vajcova y col., 1998
Alevines de trucha marrón (<i>Salmo trutta</i>)	Extractos acuosos contaminados con <i>Microcystis</i> PCC 7820 y CYA 43 MC-LR (5, 50, 500µg MC-LR)	Aumento de la tasa cardiaca en 15-60 segundos en los expuestos al extracto acuoso. Aumento del volumen de eyección cardiaco en los tratados con 50, 500 µg equivalentes de MC-LR. Aumento del gasto cardiaco en los tratados con extractos acuosos y en los tratados con 50µg equivalentes de MC-LR.	Best y col., 2001

<p>Pez cucaracha (<i>Rutilus rutilus</i>)</p>	<p>Alimentación por sonda con <i>Aphanizomenon</i> y con MC</p>	<p>Ningún efecto. Disminución del glucógeno hepático y de la concentración de proteínas en el músculo.</p>	<p>Kamjunke y col., 2002a</p>
<p>Pez cucaracha (<i>Rutilus rutilus</i>)</p>	<p>Alimentación por sonda con <i>Aphanizomenon</i>, MC, <i>Daphnia</i> y sin alimento</p>	<p>La tasa de crecimiento observada fue: <i>Daphnia</i> > <i>Aphanizomenon</i> > sin alimento = MC</p>	<p>Kamjunke y col., 2002b</p>
<p>Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</p>	<p>Liofilizado de <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 (5.700 µg MC/Kg)</p> <p>Exposición 24 h a células de <i>Microcystis</i> PCC 7813</p> <p>Exposición 24 h a células de <i>Microcystis</i> PCC 7813 y lipopolisacáridos</p>	<p>Incremento tiempo dependiente de la intensidad de manchas en el hígado: después de 3 horas, un incremento de la inmunopositividad a MC en citoplasma y núcleo de hepatocitos; después de 48 horas, apoptosis y muerte celular.</p> <p>Incremento del contenido acuoso en el intestino, sin cambios en los indicadores hepatosomáticos.</p> <p>Aumento en los indicadores hepatosomáticos y del contenido acuoso en el intestino.</p>	<p>Fischer y col., 2000 Best y col., 2003</p>

Alevines de pez oro (<i>Carassius auratus</i>)	125 µg/Kg de MC-LR pura inyectada i.p.	Después de 24-96 horas incremento significativo de la actividad aspartato aminotransferasa. Después de 3-96 horas incremento significativo de la actividad alanina aminotransferasa. Rápido aumento de lactato deshidrogenasa desde 5-20 U/ml después de 96 horas. Completa recuperación de aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y lactato deshidrogenasa después de 21 días.	Malbrouck y col., 2003
---	--	---	---------------------------

Tabla TI-8: Efectos de las MC en el metabolismo de peces según las concentraciones de toxinas administradas y vía de exposición.

Junto a los daños fisiopatológicos, las MC pueden producir cambios en el comportamiento de los peces (a concentraciones ambientales de 0,5-50 µg MC-LR/L) influyendo en el ritmo diurno del pez cebra y produciendo alteraciones en la obtención de alimentos (Baganz y col., 1998).

La sensibilidad de los peces expuestos por vía oral a MC es especie-dependiente. Los salmónidos son mucho más sensibles que los siluros (Best y col., 2003). Comparaciones de la sensibilidad a las MC entre la trucha arcoiris y la carpa revelan que esta última es más sensible a la aplicación oral de células tóxicas de *Microcystis*, y ello parece explicarse porque el proceso de digestión es mas largo en la carpa, lo que puede aumentar la absorción de las MC por las células del epitelio intestinal (Fisher y Dietrich, 2000a; Fisher y col., 2000). Desde un punto de vista evolutivo, la vulnerabilidad de los peces a MC está probablemente influenciada por la

naturaleza del hábitat y modo de alimentación. Especies nativas de hábitats oligotróficos son más vulnerables que las especies de hábitats eutróficos, donde la exposición a MC es más frecuente (Malbrouck y Kestemont, 2006). Estudios recientes demuestran que especies de peces fitoplanctívoras (*Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis*) son más resistentes con respecto a especies omnívoras (*Carassius auratus*) y carnívoras (*Culter ilishaeformis*) (Qiu y col., 2007).

La **Figura FI-8** esquematiza y resume la distribución y mecanismos fisiopatológicos de acción tóxica de MC en peces.

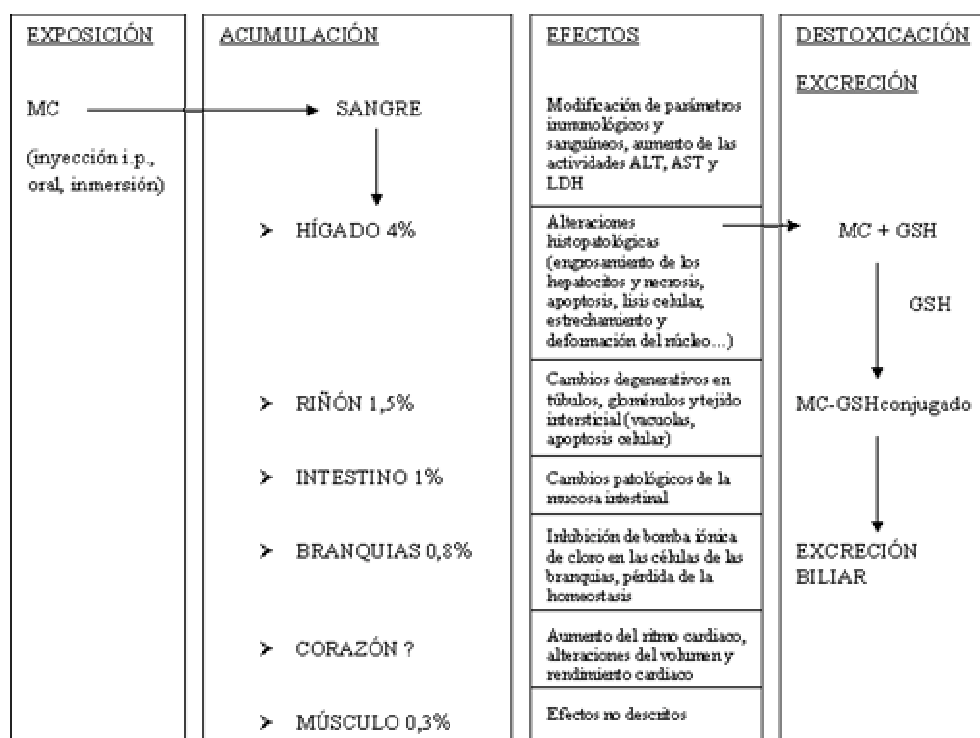


Figura FI-8: Esquema de los mecanismos fisiopatológicos de acción tóxica de MC en peces (Tomado de Malbrouck y Kestemont, 2005).

En peces, además del daño hepático y renal, las MC parecen actuar sobre la homeostasis bloqueando la función normal de los opérculos. Extractos de *M. aeruginosa* inhibieron la bomba de cloro en células de opérculo de carpa común (Gaete y col., 1994). Las MC interfieren en el transporte de Na^+ a través de los opérculos, inhibiendo la fosforilación de las enzimas implicadas en la bomba de sodio (Zambrano y Canelo, 1996). Como consecuencia, las concentraciones plasmáticas de Na^+ y Cl^- disminuyen en peces expuestos a MC vía oral, intraperitoneal o inmersos en aguas que las contengan (Bury y col., 1996b; Carbis y col., 1996). Diferentes extractos de *M. aeruginosa* inhibieron el flujo de Ca^{2+} en opérculos de peces de agua dulce; sin embargo, MC-LR pura no produjo dicha inhibición (Bury y col., 1996b). Por lo tanto, parece que diversos compuestos aún no identificados, procedentes de cianobacterias, son los responsables de interferir en el transporte iónico en peces de agua dulce, alterando consecuentemente la homeostasis. Igualmente, *in vitro*, en líneas celulares de peces, nuestro equipo de investigación (Pichardo y col., 2006) ha demostrado que el extracto procedente del cultivo de *M. aeruginosa* conteniendo únicamente MC-LR, era más tóxico que la MC-LR pura, lo cual podría deberse a la presencia concomitante de otros compuestos en el mismo, tal y como ha sido apuntado por otros autores (Fastner y col., 1995; Oberemm y col., 1999).

Los peces son más sensibles a las MC en sus estadios tempranos de vida, probablemente porque su fina capa epitelial, combinada con la gran superficie corporal relativa, una alta tasa metabólica, y las perturbaciones generadas en el mantenimiento de los procesos de desarrollo, a menudo tienen como resultado la muerte (Von Westernhagen y col., 1988). Adicionalmente, la motilidad en las etapas más tempranas es más limitada, y se encuentran más restringidos a las zonas del litoral donde las

cianobacterias frecuentemente forman floraciones (Malbrouck y Kestemont, 2006). En la **Tabla TI-9** se resumen algunos de los efectos de las MC en peces en sus estadios tempranos de vida, siendo los principales, las interferencias en los procesos de desarrollo y funciones de los órganos. Los efectos crónicos pueden ser potentes, y en general, el impacto de las MC sobre el desarrollo de embriones y larvas de peces expuestos durante varios días, es la reducción de la supervivencia de los individuos, y consecuentemente, del desarrollo de la población.

Especie piscícola/ estado de desarrollo	Dosis del tóxico	Efectos observados	Referencias
Chub (<i>Leuciscus cephalus</i>)/blástula-final desarrollo embrión (0-21 días)	0,5; 5; 50 µg MC-LR ó MC-LR/L	Disminución de la supervivencia de forma dosis dependiente.	Oberemm y col., 1997 Oberemm y col., 1999
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/desde 30-38 días de vida	0,5; 5; 50 µg MC-YR ó MC-RR/L y 50 µg MC-LR/L	Estimulación de la eclosión.	Oberemm y col., 1999
Pez blanco (<i>Coregonus lavaretus</i> L.)/huevo y larva	0,5; 5µg MC-LR/L 0,08 µg MC-LR/L en agua	Disminución de la eclosión Malformaciones.	Ernst y col., 2001 Oberemm y col., 1999
Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)/embrión (fase 19) embrión (fase 25)	MC-LR (1-10µg/mL)	Muerte (dosis dependiente) Avance de la eclosión (dosis dependiente). Anomalías hepatobiliares (hipertrofia y hemorragia hepática).	Jacquet y col., 2004

Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)/ larva y embrión	Extracto con 9,6; 6,0 y 0,1 µg MC- YR, MC-LR y MC-RR, respectivamente. Tres tratamientos con contenido total de 0,5; 5 y 50 µg MC-LR/L	Aumento de la muerte, aumento de las malformaciones, disminución de la longitud media, distrofia de vacuolas hepáticas y daño del núcleo de hepatocitos.	Palikinova y col., 2003 Palikinova y col., 2004
Locha (<i>Misguruns mizolepis</i>)/ embrión postfertilización (fase 1) embrión 32 células (fase 7) Embrión gastrula (fase 18) Embrión posteclosión (fase 34) Alevín 30 días después de la eclosión	0-500 µg MC- LR/L 30 días 0-170 µg MC- LR/L 30 días 0-40 µg MC-LR/L 30 días 0-350 µg MC- LR/L 30 días 1; 3; 10; 100; 1.000 µg MC- LR/L 7 días	Desarrollo anormal (eclosión anormal, edema del pericardio, bradicardia, cabeza pequeña, curvatura del cuerpo y cola) y mortalidad. Además de las anormalidades descritas, disminución de la tasa de eclosión. Las anormalidades descritas sin efectos en la eclosión. Muerte (DL ₅₀ = 164,3 µg/L), alteraciones estructurales en hepatocitos y corazón. Muerte DL ₅₀ (= 593,3 µg/L).	Liu y col., 2002

Tabla TI-9: Efectos de las MC en los estadios tempranos de vida de peces, dependiente de las especies, estado de desarrollo, y las dosis administradas.

1.6.4. Estudios *in vitro*

Existe una diversidad de modelos *in vitro* en los que se han estudiado los efectos tanto de las MC como de otras cianotoxinas además de extractos de floraciones y cultivos de cianobacterias.

El uso de hepatocitos de rata ha sido muy útil en los estudios de toxicidad aguda, ya que mantienen los sistemas de transporte y activación/destoxicación que tiene el organismo, constituyendo, por tanto, una herramienta muy útil para la detección rápida y posterior investigación de las MC. En cultivos primarios de hepatocitos de rata a bajas concentraciones de MC ya se observa deformación de los mismos, que adoptan una forma redondeada (Mereish y col., 1989; Thompson y Pace, 1992). Es muy característica la aparición de bullas en la superficie de los hepatocitos expuestos a MC, tanto de rata (Aune, 1989; Ghosh y col., 1995; Khan y col., 1995) como de trucha (Eriksson y col., 1994) y carpa (Li y col., 2001), incluso de humanos (Batista y col., 2003). También se han observado esos abultamientos en la superficie celular de hepatocitos de rata expuestos a especies de cianobacterias distintas a *Microcystis aeruginosa*, como son *Oscillatoria agardhii*, *Nodularia spumigena* y *Anabaena flos-aquae* (Eriksson y col., 1988).

Se ha comprobado que las MC no sólo inducen daño en el ADN *in vitro* en cultivos de hepatocitos de rata (Ding y col., 2000a) y en células hepáticas humanas Hep G2 (Zegura y col., 2003), sino también en células renales de fetos de hámster y fibroblastos de embriones de ratón (Rao y col., 1998). Se ha observado apoptosis en hepatocitos de rata (Mankiewicz y col., 2001; Botha y col., 2004a) y de salmón (Fladmark y col., 1998).

Estos métodos deben combinarse con diversas técnicas analíticas y/o químicas, como suplemento o reemplazo de los métodos tradicionales (Aune, 1989). Así mismo, se han empleado frecuentemente como modelo para investigar los posibles mecanismos de acción de las MC, como la inducción del estrés oxidativo y la apoptosis (Ding y Ong, 2003).

Se ha demostrado que las líneas celulares de peces son de gran utilidad en toxicología acuática para la evaluación de compuestos puros, muestras de agua, sedimentos y efluentes (Castaño y Tarazona, 1995; Castaño y Gómez-Lechón, 2005).

Nuestro equipo de investigación ha comprobado los efectos tóxicos agudos de las MC sobre las líneas celulares de peces RTG-2 y PLHC-1. Dichos estudios han revelado que las toxinas MC-LR y MC-RR producen cambios morfológicos importantes, como redondeamiento, disminución del tamaño celular y aumento del número y tamaño de cuerpos lisosomales; al mismo tiempo se observó inducción de esteatosis y estimulación de la función lisosomal (Pichardo y col., 2005). Se investigó el efecto de la MC-YR en las líneas celulares de peces PLHC-1 y RTG-2 durante 48 horas de exposición, observándose cambios morfológicos similares a los obtenidos para MC-LR y MC-RR en los mismos tiempos de exposición. Además también se evidenciaron claras similitudes para la reducción del contenido proteico producido por MC-YR y MC-RR en ambas líneas celulares, mientras que la exposición a concentraciones superiores de MC-YR (75 y 100 μM) indujo reducciones en la captación del colorante rojo neutro más acentuadas que las observadas para MC-LR y MC-RR, principalmente en las células PLHC-1 (Pichardo y col., 2007). Los efectos tóxicos más pronunciados se observaron al exponer dichas líneas celulares a extractos de MC procedentes de floraciones naturales y de cultivos de cianobacterias

aisladas, sugiriéndose la posibilidad de un efecto sinérgico de las diferentes MC o bien de la capacidad tóxica de otros compuestos (distintos a las MC) presentes en dichos extractos (Pichardo y col., 2006). La línea celular PLHC-1 fue más sensible a la acción tóxica de las toxinas, tanto en el caso de los estándares como de los extractos.

Recientemente Li y col. (2007b), revelaron que la toxicidad de las MC, principalmente MC-LR y MC-RR, en hepatocitos de carpa aislados era dependiente del tiempo y de la dosis de exposición. Al mismo tiempo, observaron que la forma de muerte celular era dependiente de la dosis de MC a la que eran expuestos los hepatocitos, produciéndose así apoptosis con bajas concentraciones del tóxico (10 y 100µg MC/L) y necrosis con las altas (1000µg MC/L). Estos mismos autores aproximaron la DL₅₀ de MC-LR en hepatocitos de carpa en 169,2 µg/L.

1.7. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS

Las MC deben ser absorbidas para llegar a los órganos diana donde ejercerán su acción tóxica. En el hígado las MC penetran a través de la membrana basolateral del hepatocito. En hepatocitos de rata, la absorción basolateral está inhibida por compuestos como la bromosulfoftaleína y los ácidos cólicos y taurocólico (Eriksson y col., 1990; Runnegar y col., 1995). Todos ellos pueden ser transportados por la superfamilia de transportadores de membrana denominados “polipéptidos transportadores de aniones orgánicos” (en roedores: Oatp; en humanos: OATP) (Hagenbuch y Meier, 2003; 2004). Oatp y OATP median la absorción independiente de Na⁺ de una amplia variedad de compuestos orgánicos anfipáticos, incluyendo sales biliares, tintes aniónicos orgánicos, esteroides y conjugados de esteroides, fármacos, algunos péptidos y toxinas (Hagenbuch y Meier, 2003). Se ha

comprobado que los Oatp y OATP se expresan en hígado y cerebro de rata (Jacquemin y col., 1994; Noé y col., 1997; Abe y col., 1998) y humanos (Kullak-Ublick y col., 1995; 2001), corroborándose además su participación en el transporte de MC (Fischer y col., 2005).

Las toxinas producidas por las cianobacterias tienen efectos severos en varios órganos, siendo el más afectado el hígado en mamíferos. Sin embargo, en peces también se dañan el riñón, tracto gastrointestinal, corazón, piel, opérculos, etc., como se ha señalado anteriormente. También se ha confirmado la presencia tanto de MC-LR (Fischer y Dietrich, 2000b) como de MC-RR (Cazenave y col., 2005) en cerebro de peces (*Jenynsia multidentata*). Aunque existen diversos estudios que pretenden aclarar el mecanismo de acción tóxica de las MC, todavía no se ha podido elucidar cuál de todos los estudiados es el más certero o si las MC actúan a través de varios mecanismos de acción.

En la figura (**Figura FI-9**) se esquematiza los distintos niveles a los que actúan las MC en células hepáticas y renales, que explicamos a continuación con más detalle.

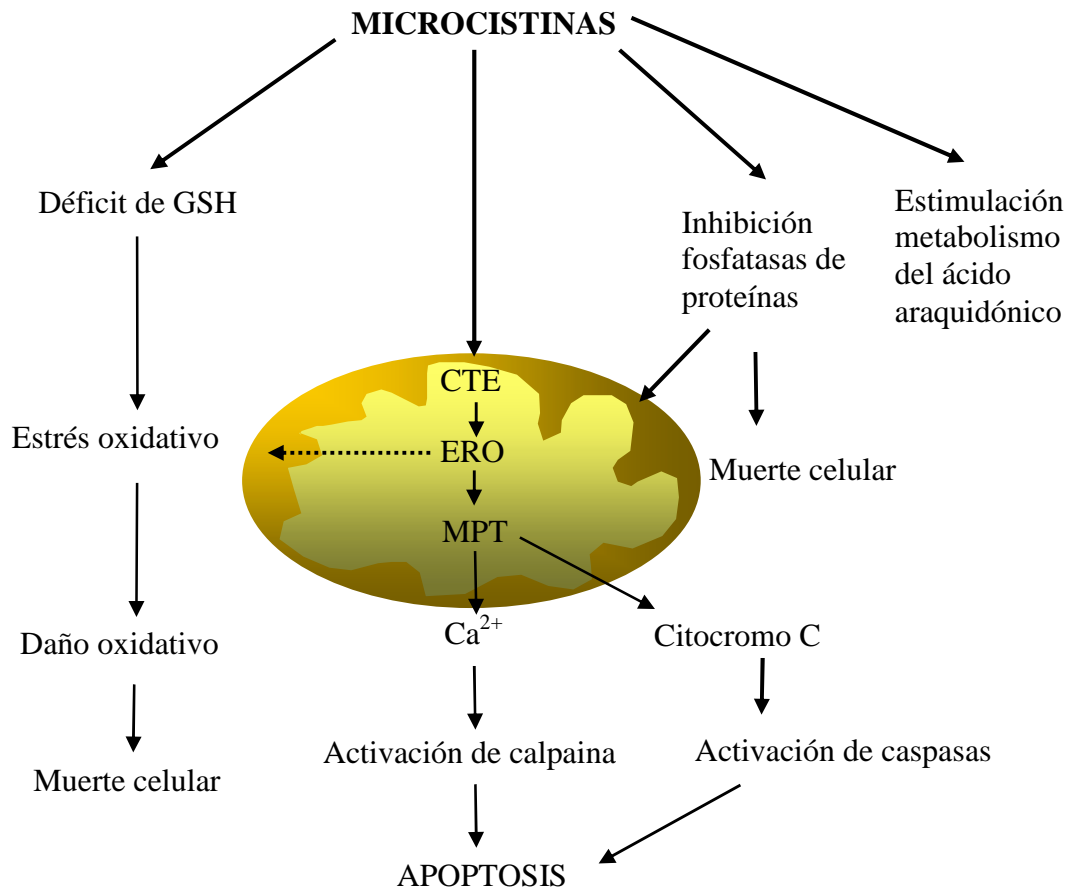


Figura FI-9: Mecanismos de acción de las Microcistinas. (CTE: cadena transportadora de electrones; ERO: especies reactivas de oxígeno; MPT: permeabilidad transmembrana).

1.7.1. Inhibición de fosfatasas de proteínas

Hasta el momento parece ser el mecanismo más aceptado de toxicidad de las MC. El control celular a través del balance entre la actividad proteína quinasa (encargada de insertar grupos fosfatos en residuos hidróxilos de proteínas) y la actividad proteína fosfatasa (encargada de su eliminación), es de vital importancia.

La actividad relativa de las fosfatasas de proteínas y de las proteínas quinasas va a influir en los niveles de proteínas fosforiladas en la célula (**Figura FI-10**).

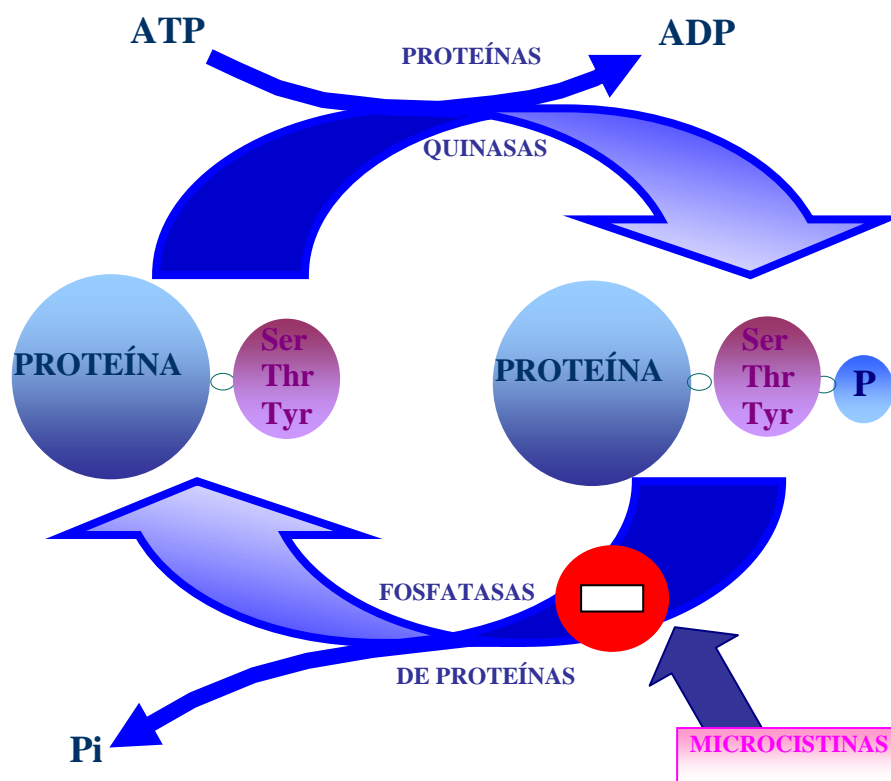


Figura FI-10: Inhibición de las fosfatasas de proteínas debido a MC.

Las MC son potentes inhibidores de las fosfatasas de proteínas: la MC-LR inhibe de forma altamente específica las fosfatasas de proteínas de tipo 1 (PP1) y tipo 2-A (PP2A) (MacKintosh y col., 1990; Dawson, 1998). Ambas se unen covalentemente a MC-LR, en el caso de la PP1 la unión se realiza en la cisteína-273 y para PP2A en la cisteína-266 (Gehring, 2004). La PP1 se encuentra localizada en el citosol, núcleo, miofibrillas y partículas de glucógeno; la PP2A se encuentra localizada en el citosol, mitocondria y núcleo.

Esta estructura tridimensional facilita la unión de la MC a tres regiones de la superficie de la molécula de PP1 (Goldberg y col., 1995):

1. La estructura del Adda se ajusta dentro de la ranura hidrofóbica en el sitio activo,
2. Los dos grupos carboxilatos y el oxígeno carbonilo de MC-LR forman puentes de hidrógenos con el sitio de unión al metal dentro del sitio activo,
3. La cadena lateral de L-Leu de MC-LR se ajusta a lo largo de la tirosina, al borde de la ranura del carbono terminal cerca del sitio activo.

Se considera que la interacción con las fosfatasas de proteínas ocurre en dos etapas:

1. En una primera etapa existe una unión rápida reversible que conduce a una inhibición de la actividad catalítica.
2. Y en una segunda, que tarda varias horas en producirse, se establece un enlace covalente entre el residuo de Mdha de las MC y las posiciones nucleofílicas de las enzimas, llegándose a una inactivación irreversible, y pudiéndose detectar dichas uniones covalentes *in vitro* e *in vivo* (Craig y col., 1996; Runnegar y col., 1995; Williams y col., 1997).

Esta inhibición rompe el equilibrio entre enzimas, observándose un aumento de la fosforilación de las proteínas (Carmichael, 1992; 1994). Se cree que los cambios en la fosforilación de proteínas tienen dos consecuencias fundamentales:

- Reorganización del citoesqueleto (afecta a la organización de los microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos) tanto en hepatocitos, como en otros tipos celulares (células renales y fibroblastos). Los efectos observados son similares para los tres tipos de células anteriormente mencionadas siendo los microfilamentos de actina igual de resistentes en todas ellas. En fibroblastos y algunos hepatocitos se afectan antes los filamentos intermedios, como vimentina y citoqueratina, que los microtúbulos. Sin embargo, la mayoría de los hepatocitos sufren una alteración de la estructura de los microtúbulos primero, posteriormente se afectan los filamentos intermedios y por último los microfilamentos, por lo que se considera que hay dos sitios de fosforilación que van a provocar alteraciones en el citoesqueleto (Wickstrom y col., 1995). La alteración de los microfilamentos incluyen una agregación inicial de la actina (Carmichael, 1997).
- Disregulación de la división celular que conduce a la proliferación tumoral, que está relacionada con la inhibición de la PP2A. Ésto se debe a que las fosfatasa de proteínas juegan un papel regulador importante en el mantenimiento de la homeostasis de las células, de forma que su inhibición puede conducir a una hiperfosforilación de proteínas diana, tales como las proteínas supresoras de tumores. Esta modificación post transduccional puede dar lugar a una proliferación celular, transformación celular y desarrollo de tumores. Las implicaciones de

dicha inhibición de fosfatasa de proteínas en humanos, por exposición crónica a bajos niveles de MC, aún no se conocen (Kuiper-Goodman, 1999); sin embargo, en mamíferos ha dado lugar a cáncer de hígado por inducción de daño oxidativo en el ADN (Ito y col., 1997; Zegura y col., 2003).

Otros estudios revelan que la toxicidad aguda producida por MC en crustáceos (*Thamnocephalus platyurus*) no se correlaciona con la inhibición de PP1 y PP2A, lo que hace pensar en otros mecanismos como posibles responsables de la toxicidad de MC o bien que ésta se pueda ver afectada por otros factores como la absorción, el transporte o la detoxificación (Blom y Jüttner, 2005).

1.7.2. Estimulación del Metabolismo del Ácido Araquidónico

Es muy posible que la cascada del ácido araquidónico esté relacionada con la patología tóxica de la MC-LR en animales.

La MC-LR produce una reducción significativa de la absorción y un aumento de la liberación de ácido araquidónico. Éste es un factor muy importante en su mecanismo de toxicidad, pudiendo provocar cambios en la estructura de la membrana celular y alteraciones en el transporte y metabolismo de los ácidos grasos (Naseem y col., 1991).

Las MC estimulan en los hepatocitos el metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa. A su vez reaccionan con compuestos como el glutatión (GSH), que contiene un grupo tiol. Pueden reaccionar con el grupo tiol de la coenzima A (CoA) y/o inhibiendo la actividad de las enzimas acetil-CoA-acetiltransferasa y acetil-CoA-sintetasa,

bloqueándose la reabsorción del ácido araquidónico libre y produciéndose un aumento de la síntesis de prostaglandinas.

La liberación del ácido araquidónico por parte de la membrana celular varía según el tipo de célula y el donador del residuo ácido. Normalmente el donador es la fosfatidilcolina, aunque hay otros fosfolípidos que también son importantes en el metabolismo de este ácido.

La síntesis y liberación de prostaciclina (6-cetoF_{1α}) y tromboxano B₂ (TXB₂) es estimulada por las MC, no así la liberación de prostaglandinas F_{2α} o E₂. El TXB₂ deriva del TXA₂, el cual es inestable y uno de los más fuertes mediadores de la agregación plaquetaria. La 6-cetoF_{1α} deriva de la prostaglandina I₂, la cual actúa como inhibidor de la agregación de plaquetas. La formación de TXB₂ demuestra la formación de TXA₂ y por tanto la posibilidad de coagulación de la sangre en el hígado (Kaya, 1996).

1.7.3 Apoptosis

En conexión con el apartado 1.7.1, se considera que el principal mecanismo de toxicidad de las MC es la potente inhibición de las PP1 y PP2A, las cuales regulan multitud de procesos biológicos, dando lugar a una fosforilación de proteínas celulares y la activación de la cascada de las caspasas, que tiene como resultado final la muerte celular de los hepatocitos por apoptosis (Yoshida y col., 1997; 1998; Hooser, 2000). El grado de hiperfosforilación de los elementos del citoesqueleto, como citoqueratina 8 y 18, puede determinar si la muerte celular ocurre por necrosis o por apoptosis. Además, la inducción de apoptosis por MC puede estar relacionada con la hiperfosforilación de otras proteínas citoplasmáticas (p53, Bcl-2, etc.) que inducen más directamente esta forma de muerte celular (McDermott y col., 1998).

A nivel de la mitocondria, la apoptosis puede ser inducida por la liberación de factores apoptóticos, como el citocromo c, que activará a la caspasa-9 y subsecuentemente a la caspasa-3. Esta apoptosis mitocondrial está regulada por la familia de proteínas Bcl-2, que cuenta con proteínas anti-apoptosis (como la Bcl-2) que inhiben la liberación del citocromo-c, y proteínas pro-apoptosis (como la Bax) que aumentan la liberación de este factor apoptótico (Ding y Ong, 2003). Fu y col. (2005) evidenciaron que MC-LR es capaz de incrementar la expresión de p53 y Bax tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque sólo se observó disminución en la expresión de Bcl-2 *in vitro*. Estos hallazgos corroboran que la expresión de p53, Bcl-2 y Bax están involucrados en la regulación de la apoptosis inducida por MC-LR.

Las MC penetran fácilmente en los cultivos primarios de hepatocitos, donde hay una retención a largo plazo de las toxinas, de la misma forma que el ácido okadaico, y al igual que éste, inhiben las PP-1 y PP-2A (Bell y Codd, 1994; Fujiki y col., 1996), que como hemos explicado anteriormente, mantienen la homeostasis en las células. En las células hepáticas, los filamentos intermedios del citoesqueleto están hiperfosforilados, lo que provoca una disrupción celular, cambios en su morfología y la muerte celular de origen apoptótico. Los cambios morfológicos y bioquímicos típicos de la apoptosis en hepatocitos de rata son: redistribución de los orgánulos, condensación de la cromatina y disminución del tamaño de la célula, observables a los 30 minutos de la exposición a MC. Este proceso temprano de producción de apoptosis difiere de los mecanismos tradicionales en los que actúan inductores como los factores de necrosis tumoral TNF- α o TGF- β 1, que necesitan más de 6 horas de exposición al tóxico para estimular la apoptosis. Por lo tanto, las MC deben emplear un mecanismo de producción de apoptosis a más corto

plazo, como pudiera ser la inducción de cambios en la mitocondria como iniciador de la apoptosis (Ding y Ong, 2003).

Mikhailov y col. (2003) apuntaron como otro posible origen de la apoptosis la unión de MC a la enzima ATP sintetasa, un importante componente de la cadena de transporte electrónico (CTE) de la mitocondria. También se ha relacionado el estrés oxidativo como el posible mecanismo iniciador de la apoptosis inducida por MC (Ding y Ong, 2003).

1.7.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se puede definir como la exposición de moléculas, células o tejidos a un exceso de sustancias oxidantes, particularmente radicales libres, entre los que cabe destacar los que comunmente se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO). Esta situación puede originarse por el desequilibrio entre sustancias oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, bien por un exceso de oxidantes, por un defecto de antioxidantes o por una combinación de ambas situaciones (Ding y Ong, 2003).

Son cada vez más frecuentes las publicaciones relativas al papel del estrés oxidativo como mecanismo de acción tóxica de las MC. Estas toxinas producen un déficit de glutatión reducido (GSH), conocido compuesto antioxidante. Además las MC actúan a nivel de la cadena de transporte electrónico (CTE) de la membrana mitocondrial dando lugar a un aumento de los niveles de ERO y alterando los niveles normales de permeabilidad transmembrana de la mitocondria (MPT). Como consecuencia se va a desencadenar un aumento del estrés oxidativo (Ding y Ong, 2003). La depleción de GSH no sólo conlleva la generación de ERO, sino que también

se ve afectada la regulación de la organización del citoesqueleto produciéndose disrupción en las estructuras de microfilamentos en fibroblastos humanos (Kondo y col., 1992). Se ha demostrado el papel crucial que desempeña el GSH en la detoxificación de las toxinas de cianobacterias (Pflugmacher y Wiegand, 2001). Así en hepatocitos pretratados con un precursor de GSH (N-acetilcisteína), se vio disminuida la citotoxicidad inducida por MC (Ding y col., 2000a) y ya Hermansky y col. (1991) demostraron el efecto protector del glutatión frente a la MC-LR en ratón.

Las ERO incluyen radicales libres (radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) que tienen una vida media muy corta y una gran reactividad, por lo que se combinan con facilidad con el ADN, proteínas, lípidos y glúcidos, produciendo cambios en su estructura, que consecuentemente pueden dar lugar a daños celulares o incluso sistémicos (Ding y Ong, 2003).

o La molécula de ADN es especialmente susceptible a daños oxidativos. El oxidante responsable del daño es el radical hidroxilo, ya que, ni peróxidos de hidrógeno ni radicales peróxidos pueden reaccionar directamente con el ADN (Friedberg, 2006). El ataque del radical hidroxilo produce tres tipos de daño en el ADN:

Hidroxilación

Rotura del anillo

Fragmentación

Las lesiones resultantes son, normalmente, productos de reacciones secundarias que suceden después del ataque inicial del radical. Existen alrededor de 100 tipos de lesiones diferentes del ADN como resultado del

ataque inicial del radical hidroxilo a las bases de ADN (Demple y col., 1991). Las lesiones del ADN usadas comúnmente como biomarcadores son 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) y 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyG). Ambas son consecuencia del ataque del radical hidroxilo a la desoxiguanosina y cuya diferenciación se basa en una reacción secundaria. Estas lesiones pueden detectarse directamente en el ADN o por ensayos en orina.

Se han descrito métodos analíticos específicos para detectar biomarcadores de daño oxidativo en el ADN (Favier, 1991). Las especies generadas por los radicales libres junto con las bases de ADN pueden unirse covalentemente con otras moléculas presentes en la célula, formando complejos intermoleculares. A menudo, el ejemplo más importante de este fenómeno, son las uniones cruzadas del ADN con las proteínas.

Los grupos hidroxilos pueden además atacar a los grupos fosfato de las bases azucaradas del ADN, produciendo diferentes lesiones, incluyendo el sitio libre de la base o el apurínico donde ha sido modificada mediante reacciones de oxidación. Un indicador de este daño es la presencia de bases libres en orina.

Otro ataque radicalario es la fragmentación de la desoxilribosa. La rotura de las hebras simples ocurre por la substracción del hidrógeno en posición C-4, dando la oxidación de la mitad del azúcar. Puede unirse a un segundo azúcar oxidado en la hebra complementaria, causando la doble rotura. La rotura de las hebras de ADN puede conllevar a mutagénesis o incluso a muerte celular (Friedberg, 2006).

Existen una gran variedad de mecanismos de defensa celulares destinados a proteger el genoma del ataque radicalario y a reparar el daño oxidativo. Algunas de estas defensas incluyen compartimentación de las moléculas sensibles y la defensa de la inhibición de la replicación del ADN

por histonas y poliaminas (Von Sonntag, 1987). Si la protección del material genético no resulta exitosa, mecanismos de regulación celulares como la inducción de la apoptosis y la inhibición del progreso del ciclo celular pueden prevenir la transferencia de material genético dañado a las células hijas (Dempsey y col., 1991). Alternativamente, también los procesos de reparación del ADN pueden corregir los daños. Esta reparación es llevada a cabo por las enzimas ADN glicosilasas y endonucleasas apurínicas, antes de la replicación. Durante la postreplicación las reparaciones son llevadas a cabo mediante técnicas de reparación de lesiones durante o después del proceso de replicación (Brusick., 1987).

En el caso concreto de las MC, Al-Jassabi y Khalil, (2006) han demostrado que MC-LR es capaz de inducir daño oxidativo en el ADN en ratón BALB/c. Comprobaron el aumento de la formación de 8-OH-dG de forma dosis y tiempo dependiente.

- El daño de proteínas mediado por radicales puede iniciarse por: pérdida de electrones, reacciones dependientes de iones metálicos y autoxidaciones de lípidos y proteínas. La consiguiente oxidación de proteínas es oxígeno dependiente, e incluye la propagación de diferentes especies radicalarias, principalmente los radicales alcóxidos, incluyendo diferentes categorías de especies reactivas y de sustancias estables (Dean y col., 1997).

La oxidación de proteínas tiene como resultado alteraciones en su estructura terciaria, lo que fomenta la agregación de proteínas y las formaciones amiloides (Shinall y col., 2005). A menudo las proteínas oxidadas son funcionalmente inactivas y el desdoblamiento de su estructura está asociado con un incremento en la susceptibilidad de las proteinasas (Dunlop y col., 2002; Davies y col., 2005). Las células pueden eliminar las

proteínas oxidadas por proteolisis. Sin embargo, ciertas proteínas oxidadas son usadas por las células lo que, junto con posibles alteraciones del rango de producción de proteínas oxidadas, puede contribuir a su acumulación y a un aumento de los daños producidos por éstas durante el envejecimiento y algunas patologías (diabetes, aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas).

Los daños que conllevan a la inactivación de proteínas, bien de forma reversible o irreversible, pueden ser producidos por:

- a- Radicales inducidos por radiaciones (Adams, 1979)
- b- Sistemas catalizados por iones metálicos (Stadman., 1978; Fucci, 1983; Stadman, 1990)
- c- Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y reacciones fotoquímicas (Ganchev, 1995)
- d- Radicales endógenos (Pedersen, 1993)
- e- Proteínas dañadas por radicales o carbonilos originados en otros procesos biológicos (Mohsein, 1989)

Y existen varios mecanismos celulares para revertir estas lesiones oxidativas:

- Grupos tioles (Rokutan, 1989)
- Metionina (Smith, 1987; Boudier, 1994)
- Bases de Schiff (Yim, 1995)

La carbonilación de proteínas resulta del ataque oxidativo en los residuos de arginina (Arg), lisina (Lys), prolina (Pro) o treonina (Thr) de las mismas (Dunlop y col., 2002; Davies y col., 2005). En animales, la carbonilación de proteínas ha sido ampliamente usada como medida de daño oxidativo, y se ha demostrado que se incrementa en los tejidos con la edad

(Dalle-Donne y col., 2003; Ding y col., 2006). Actualmente, el ensayo más sensible para medir el ataque oxidativo general a proteínas es la medida de formación de grupos carbonilos, los cuales son resultado del ataque de radicales libres reactivos así como de radicales hidroxilos con grupos amino (residuos de Lys) (Shinall y col., 2005).

La medida de grupos carbonilos tiene como ventaja su simplicidad y como inconveniente su no especificidad cuando se utilizan preparaciones de tejidos crudos. El método de detección de grupos carbonilos que ha demostrado mayor especificidad y sensibilidad ha sido el de la reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (Dalle-Donne y col., 2003).

○ Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) sirven como un sustrato excelente en reacciones de peroxidación lipídica, por la presencia de grupos metilenos activos. Las uniones carbono hidrógeno (C-H) de los grupos metilenos activos tienen una energía de disociación muy baja, cediendo con facilidad estos átomos de hidrógeno en las reacciones radicalarias (Davies, 1981). La especial susceptibilidad de los PUFA a la peroxidación conlleva cambios lipídicos en las moléculas (Nagaoka, 1990).

Las autooxidaciones de los lípidos en sistemas biológicos se producen mediante una serie de reacciones consistentes en tres fases (Kelly y col., 1998):

1) *Iniciación*: a menudo es objeto de debate (Halliwell, 1990; Samokyszyn, 1990). Se produce por la reacción de ERO (oxígeno, radical peróxido o radical hidroxilo) con el sustrato lipídico o por colapso de hidroperóxidos lipídicos preexistentes por transiciones metálicas. En el caso anterior, la peroxidación ocurre por sustracción de un átomo de hidrógeno del carbono del grupo metileno del sustrato lipídico generando un radical lipídico con un carbono altamente reactivo.

2) *Propagación*: moléculas de oxígeno se unen rápidamente a los radicales lipídicos generados (Howard, 1972). Los radicales peróxidos pueden sustraer un átomo de hidrógeno de diferentes moléculas (ADN y proteínas) para formar, como producto de oxidación primaria, hidroperóxidos lipídicos. Alternativamente, sustancias antioxidantes como vitamina E (vit E) pueden actuar como donadores de átomos de hidrógeno (Burton, 1986), generándose hidroperóxidos lipídicos y radicales fenoxilos derivados de la vit E, relativamente inertes. En ausencia de antioxidantes y otros inhibidores, los radicales peróxidos lipídicos pueden sustraer el átomo de hidrógeno de otra molécula lipídica, produciendo un nuevo carbono activo en un radical lipídico, lo que conlleva a la propagación de las reacciones radicalarias.

Los metales de transición tienen un interés particular en la peroxidación lipídica (LPO). En la transición de la LPO catalizada por metales, el radical hidroxilo es el iniciador primario de las especies radicalarias (Samokyszyn, 1990). No obstante, cationes metálicas como los iones ferroso y férrico, pueden aumentar la producción de radicales hidrófilos iniciadores, catalizando la propagación de cambios en la LPO por descomposición de los hidroperóxidos lipídicos en productos oxidados (O'Brien, 1969; Waters, 1976). Resultan así, radicales alcóxidos y peróxidos capaces de iniciar nuevos cambios radicalarios por interacción y adición con moléculas lipídicas. Otros metales activos redox, como los iones cobre, pueden catalizar esta reacción.

3) *Terminación*: la reacción finaliza cuando se unen dos radicales dando lugar a un producto no radicalario estable, el cual no conllevará la propagación de cambios en la peroxidación lipídica.

Los productos de la LPO modifican las características biológicas de las membranas, modificando su estructura, lo que conlleva una disminución

de su fluidez y un aumento de la permeabilidad (Kagan, 1988; Ursini y col., 1991). En la eliminación de los productos de peroxidación lipídica de la membrana es necesario reparar los daños en ésta, lo que es llevado a cabo por dos sistemas enzimáticos diferentes: las acciones secuenciales de la fosfolipasa A2 con glutatión peroxidasa (Tappel, 1980) y la glutatión peroxidasa de hidroperóxidos lipídicos (Ursini y col., 1985). La reducción de los hidroperóxidos fosfolipídicos a hidróxidos fosfolipídicos al mismo tiempo que se incorporan en la estructura de la membrana pone fin a la peroxidación lipídica de la membrana (Ursini y col., 1982).

Uno de los métodos existentes más utilizados para evaluar la peroxidación lipídica, es la cuantificación de los productos generados en ésta mediante su reacción con el ácido tiobarbitúrico (ATB).

Las ERO son eliminadas del organismo o inactivadas por distintos mecanismos, distinguiendo entre sistemas enzimáticos: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y no enzimáticos: GSH, β -caroteno y vitaminas C y E, etc. (**Figura FI-11**). De esta forma, los radicales superóxidos (O_2^{\cdot}) presentes en los tejidos serán transformados hasta peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante una reacción catalizada por la enzima SOD. Estos peróxidos de hidrógeno podrán ser reducidos hasta moléculas de agua (H_2O) por reacciones diferentes en las que intervienen las enzimas CAT y GPx, respectivamente. Esta última requiere, para su actuación, dos moléculas de glutatión reducido (GSH) el cual a su vez será transformado hasta glutatión oxidado (GSSG) en el transcurso de la reacción. La enzima encargada de recuperar estas moléculas de GSH consumidas será la GR.

En la actualidad, son muchos los estudios que revelan la relación del estrés oxidativo en la patogénesis de las MC en diferentes modelos experimentales (Bury y col., 1996a; Wiegand y col., 1999; Ding y col., 2001a; Ding y Ong., 2003; Li y col., 2003; Bouaïcha y Maatouk., 2004; Moreno y col., 2005a; Li y col., 2005a; Pinho y col., 2005a).

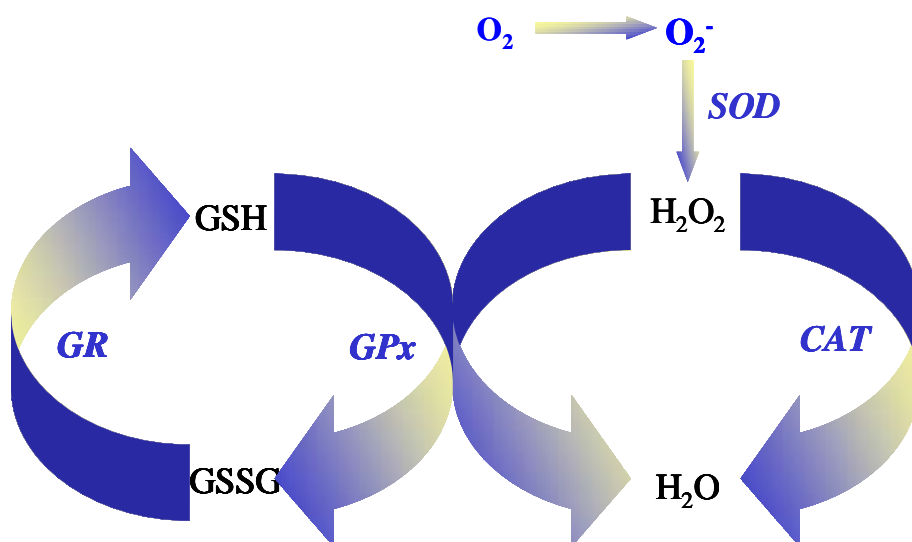


Figura FI-11: Principales sistemas enzimáticos antioxidantes celulares.

En estudios crónicos realizados *in vivo* en ratas se ha observado un incremento en la LPO después de la exposición a MC (Ding y col., 1998a; Guzmán y Solter, 1999). En el tratamiento de cultivos primarios de hepatocitos de rata con extractos de MC se ha observado un aumento de ERO (Ding y col., 1998a; Bouaïcha y Maatouk, 2004), principalmente peróxido de hidrógeno y radical superóxido (Ding y col., 2001a), posiblemente derivados de las alteraciones producidas por la oxidación de lípidos (Towner y col., 2002), aunque el mecanismo exacto por el que se forman no está claro y deberían realizarse más investigaciones al respecto.

Además, se han observado cambios en el potencial de membrana mitocondrial (Ding y col., 1998a). Está bien documentado que las ERO pueden afectar a la organización de los principales elementos estructurales del citoesqueleto como son los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios debido a su capacidad para oxidar las proteínas del citoesqueleto o alterar el balance intracelular de tioles (Milzani y col., 1997; Fiorentini y col., 1999; Van Gorp y col., 1999).

Nuestro grupo de investigación ha observado, tras la administración en ratas de 100 µg/kg de MC-LR por vía intraperitoneal, la alteración de las actividades enzimáticas marcadoras de membranas (sacarasa, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida) en el intestino de rata. En el mismo estudio se comprobó un aumento de la LPO medida como niveles de malonildialdehído (MDA) tanto en mucosa intestinal como en el suero (Moreno y col., 2003b).

También en animales acuáticos se ha podido observar este daño oxidativo producido por MC. Por ejemplo, en hepatocitos de carpa común expuestos a MC-LR se ha comprobado un incremento de ERO y depleción de GSH, además de un aumento de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx (Li y col., 2003). Sin embargo, en hepatopáncreas de cangrejos de río expuestos a MC se observó una disminución de la actividad CAT, indicándose que la respuesta antioxidante inducida tras la exposición a la toxina fue insuficiente (Pinho y col., 2005a).

La promoción de estrés oxidativo tras la exposición a toxinas de cianobacterias se ha demostrado asimismo en diferentes plantas, tanto en macrofitos acuáticos (Pflugmacher, 2004) como en plantas terrestres superiores como *Brassica napus*, *Oryza sativa* y *Medicago sativa* (Chen y col., 2004; Pflugmacher y col., 2006). Recientemente, Stüven y

Pflugmacher (2007) han demostrado la influencia del estrés oxidativo provocado por MC en semillas de *Lepidium sativum*, con aumento de LPO, elevación de la concentración de α - y β -tocoferol y aumento de la actividad enzimática de GPx, GST y GR.

1.8. TRATAMIENTO

Debido al daño rápido, severo e irreversible que producen las MC en el hígado, la terapia es difícil y la profilaxis complicada, no existiendo un tratamiento específico de tipo antidótico frente a estas toxinas.

En 1988, Gorham y Carmichael señalaron el lavado gástrico inmediato como un posible tratamiento. En los últimos 15 años, se han realizado varios experimentos sobre la atenuación de las intoxicaciones sufridas por animales y humanos (Dawson, 1998; Fitzgerald, 2001). Algunos de ellos se basan en los anticuerpos monoclonales frente a MC-LR (Nagata y col., 1995) y otros en bloqueantes del transporte hepático, como el fármaco inmunosupresor ciclosporina A y el antibiótico rifampicina (Dawson, 1998). En este sentido Rao y col. (2004) comprobaron un 100% de protección frente a una dosis letal de 100 mg/kg de MC-LR en estudios realizados en ratones pretratados con 10 mg/kg ciclosporina-A, 25 mg/kg rifampina y 400 mg/kg silimarina.

También se han observado resultados positivos en el pretratamiento con ácido taurocólico y bromosulfoftaleína, inhibidores de los transportadores de MC, observándose una disminución de los efectos tóxicos en oocitos de rana que habían expresado dichos transportadores (Fischer y col., 2005).

Otros investigadores (Gehring y col., 2004) demuestran en roedores que la vit E, tomada como suplemento dietético, puede proteger frente a la toxicidad de MC-LR tras exposición crónica. Además, se ha observado que la melatonina presenta un mayor efecto antioxidante, disminuyendo los niveles de 8-hidroxidesoxiguanosina generados en ratones tratados con MC-LR, siendo necesarias dosis menores que las de vit E (trolox) y las de vit C (ascorbato). Aunque los tres antioxidantes desempeñan un importante papel en la protección del daño celular producido por los radicales libres (Al-Jassabi y col., 2006).

La vit E también se ha mostrado eficaz combatiendo el estrés oxidativo inducido por MC en cangrejos de río, incrementando los grupos sulfidrílo no proteicos y disminuyendo la alteración de la actividad de las enzimas CAT y GST (Pinho y col., 2005b).

Takenaka y Otsu (1999) investigaron los efectos de la L-cisteína y el glutatión reducido (GSH) sobre la toxicidad inducida por MC-LR en hígado de ratón, observando que, tras la administración conjunta de L-cisteína y MC-LR no se mostraban efectos de toxicidad aguda en el hígado. Sin embargo, cuando la MC-LR era administrada junto con GSH, se vieron indicios de toxicidad aguda, aunque éstos eran más débiles que con la administración de la MC-LR sola. El efecto protector de la L-cisteína, con respecto a la toxicidad hepática aguda generada por la MC-LR, es aún mayor que el que ejercía el GSH.

Gehring y col., (2002) observaron en ratones que el pretratamiento con selenio (Se) no alteraba la patología normal del hígado pero sí parecía reducir los daños hepáticos inducidos por MC.

Otros estudios han comprobado que algunas cepas de bacterias lácticas permiten la eliminación parcial de MC-LR, consiguiéndose en el caso de *Lactobacillus rhamnosus* cepa GC un porcentaje de eliminación del 46% (Meriluoto y col., 2005).

Recientemente, sustancias como los licopenos (Al-Jassabi, 2005), compuestos polifenólicos del té verde (Xu y col., 2007) y flavonoides (Jayaraj y col., 2007) también se han mostrado eficaces frente a la toxicidad de las MC.

1.9. LEGISLACIÓN SOBRE LAS MICROCISTINAS

Los distintos estudios toxicológicos existentes hasta la actualidad han dado lugar al establecimiento de diversos límites de seguridad para MC, como por ejemplo una IDT de 0,04 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ de MC-LR (Chorus y Bartram, 1999), al ser una de las toxinas más potentes, de la que existen más estudios toxicológicos y estándares comerciales para su determinación.

El peligro de promoción de tumores por exposición crónica a través del agua de bebida ha sido la principal razón para la adopción por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1998) de un valor guía provisional de 1,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ de MC-LR en aguas de bebida, comprendiendo tanto las MC intra como las extracelulares, cuando la exposición sea a corto plazo. Se propuso asimismo un nivel de seguridad en aguas de 0,1 $\mu\text{g}/\text{L}$ de MC cuando la exposición sea a largo plazo. Asimismo, Ueno y col. (1996) propusieron con anterioridad un valor guía de seguridad en aguas, para exposiciones a largo plazo, de tan sólo 0,01 $\mu\text{g}/\text{L}$ de MC basándose en la

correlación posible entre la incidencia de cáncer primario hepático en algunas zonas de China y la presencia de MC en ríos y lagos.

En Europa las toxinas de cianobacterias aún no están claramente reguladas, aunque la Directiva 2000 (2000/60/EC) las considera específicamente como potenciales contaminantes peligrosos.

Varios países como Brasil, Nueva Zelanda y Reino Unido, han adoptado el valor establecido por la OMS de 1,0 µg/L de MC-LR en aguas de bebida. Sin embargo, Canadá propone 1,5 µg/L y Australia un rango de 1,3-10 µg/L (USEPA, 2001). En Canadá, además se propone un valor de 10 µg/L para exposiciones a corto plazo (Fitzgerald, 2001).

En nuestro país el Real Decreto 140/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, establece como límite de estas toxinas, 1 µg/L de MC-LR, siendo obligatoria la determinación de este parámetro cuando existan sospechas de eutrofización en las aguas de captación, teniéndose que realizar la determinación de MC a la salida de la Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP), o en el depósito de cabecera. Este Real Decreto traspone al ordenamiento jurídico español la Directiva 98/83/CE, de 3 de noviembre de 1998, la cual, sin embargo, no hace referencia a los niveles de MC.

Para aguas recreacionales con floraciones de cianobacterias, la OMS ha establecido tres niveles de alerta de riesgos sanitarios, dependiendo del riesgo de los efectos adversos para la salud (OMS, 2003), que están basados en la densidad de cianobacterias. La Directiva Europea en vigor (2006/7/CE) relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño

contempla, entre otros parámetros de evaluación, la propensión a la proliferación de cianobacterias dentro de los perfiles de las aguas de baño.

En alimentos, el valor guía para suplementos alimenticios de cianobacterias es de 10 µg/g (Schaeffer y col., 1999) y concretamente en Oregón, EEUU, se ha establecido un máximo de 1 µg/g en los alimentos (USEPA, 2001).

1.10. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MICROCISTINAS

A pesar de haberse desarrollado diferentes métodos que permiten determinar la presencia de MC en aguas superficiales, todavía las agencias oficiales de medio ambiente no han aceptado ninguno de ellos como método estándar. Además, se requiere más de una técnica para un estudio preciso del perfil tóxico de las variantes presentes en una floración (McElhiney y Lawton, 2005).

Ya que en esta Tesis Doctoral se realiza la extracción de MC a partir de liofilizados de floraciones de cianobacterias y posterior determinación por métodos cromatográficos, se ha incluido este apartado de métodos de detección, en el que de forma sucinta se esquematizan los principales métodos de determinación de estas toxinas.

Los métodos de detección de MC pueden ser biológicos o químicos. Dentro de los biológicos encontramos los ensayos de inhibición de las fosfatasa de proteínas (PP1A); los bioensayos en ratón, invertebrados, etc., y los ensayos inmunológicos (ELISA) que son rápidos y muy sensibles. Todos ellos se utilizan como técnicas de screening o de cribado, siendo técnicas semicuantitativas cuyos resultados deben confirmarse por métodos más sofisticados, como son los métodos químicos.

Los métodos de cribado biológicos presentan la ventaja de ofrecer información rápida sobre los efectos biológicos y tóxicos de las muestras analizadas. Éstos varían enormemente tanto en sensibilidad como en la habilidad de identificar las MC causantes de la toxicidad observada. Los métodos más frecuentemente empleados se pueden dividir en tres categorías: bioensayos de organismos enteros, ensayos bioquímicos y ensayos inmunológicos. En la **tabla TI-10** se resume la comparación entre ellos.

Método	Sensibilidad (MC-LR)	Especificidad para MC	Reactividad cruzada	Coste	Comentarios
Ensayo en ratón	DL ₅₀ : 25-125 µg/Kg	No específico	Todas las MC	Medio	Requiere licencia para animales. Desfasado.
Ensayo en gamba	DL ₅₀ : 5-10 mg/L	No específico	Todas las MC	Bajo	Variación interlaboratorio. Puede afectarse por la matriz.
Fosfatasas de proteínas	Radiométrica: 0,1 µg/L Colorimétrica: 0,25-2,5 µg/L Fluorimétrico: 0,1 µg/L	No específico	Todas las MC	Medio-alto	Instalaciones especiales. Incapaz de distinguir entre distintos inhibidores. Las enzimas purificadas pueden ser caras.
Anticuerpos policlonales	Anti-MC-LR: 2,5 µg/L Anti-Adda: 0,6 µg/L	Específico	Variable. Por debajo de 1 µg/L para las variantes ensayadas	Medio-alto	Depende de los animales de laboratorio. Difícilmente reproducible.

Anticuerpos monoclonales	Anti-MC-LR: 0,1 µg/L Anti-MC-LR: 0,06 µg/L (específico de 4-arginina)	Muy específico	Por debajo de 1 µg/L para las variantes ensayadas. Sólo detecta 4-arginina	Alto	Reactividad cruzada dependiendo del método de conjugación. Las técnicas de hibridoma son complejas.
Fragmentos de anticuerpos recombinados	DL ₅₀ : 4 µg/L	Específico	Variable	Bajo	Necesita medios adecuados para la expresión bacteriana. La sensibilidad y la reactividad cruzada pueden modificarse.
Polímeros marcados molecularmente	Aproximadamente 0,2 µg/L	Muy específico	Específico para MC-LR	Bajo	Se necesitan polímeros diferentes para cada variante. Muy estable, adecuado para usar con biosensor.

Tabla TI-10: Comparación entre los métodos biológicos de análisis de MC (Tomado de McElhiney y Lawton, 2005).

Son numerosos los bioensayos utilizados como métodos rápidos de detección de las MC que además sirven para evaluar la toxicidad de las mismas: bacterias (Ostensvik y col., 1998); plantas (Mitrovic y col., 2005); *Daphnia* sp (Henning y col., 2001), *Artemia salina* (Beattie y col., 2003); larvas de crustáceo (Torokne y col., 2000); langosta africana (Hiripi y col., 1998), embriones de pez (Oberemm, 2001), etc.

Uno de los más empleados para la determinación de la toxicidad en mamíferos es el bioensayo en ratón (Ito y col., 1997; Fawell y col., 1999; Vasconcelos y Pereira, 2001; Al-Jassabi, 2005; Benson y col., 2005). De hecho, durante muchos años ha sido el método más utilizado para determinar la toxicidad de las floraciones. También se han venido empleando peces como sustrato biológico en ensayos de toxicidad de MC (Jacquet y col., 2004; Soares y col., 2004; Ernst y col., 2005; Huynh-Delerme y col., 2005; Xie y col., 2005; Cazenave y col., 2005; 2006).

Sin embargo, estos métodos requieren una gran cantidad de animales de experimentación. En respuesta a las cuestiones éticas inherentes a los ensayos *in vivo*, los bioensayos de toxicidad *in vitro* (Zegura y col., 2003; Botha y col., 2004a) se presentan como una alternativa técnicamente sensible y éticamente aceptable. El uso de hepatocitos primarios parece ser una técnica prometedora en los ensayos de toxicidad de floraciones de cianobacterias, presentando una buena correlación con los datos analíticos obtenidos por HPLC (Heinze y col., 2001).

Los enzimoimmunoensayos (ELISA) están basados en anticuerpos monoclonales (Zeck y col., 2001) y policlonales (Metcalf y col., 2000; Yu y col., 2002) frente a MC. Los requerimientos de los equipos son menores y permiten una detección de MC rápida, fácil, efectiva y sensible (particularmente MC-LR) en muestras de aguas, microorganismos y tejidos de animales, y sus resultados son semicuantitativos. El problema de detección cruzada con compuestos no tóxicos, que pueden dar falsos positivos (Flury y col., 2001) puede resolverse empleando métodos competitivos de ELISA que tienen una gran sensibilidad (Zeck y col., 2001), convirtiéndola en una técnica adecuada para evaluar concentraciones de MC por debajo del valor guía establecido por OMS de 1 µg/L en agua de

bebida. En un trabajo de monitorización llevado a cabo por nuestro equipo de investigación en aguas procedentes del río Guadiana (Moreno y col., 2005b) se demostró la existencia de diferencias entre los resultados obtenidos por ELISA y por HPLC-UV, siendo más elevados los procedentes de ELISA. Esto puede deberse a que el ensayo de ELISA no es específico principalmente cuando la cantidad de MC detectada está cerca del límite (0,1 µg/L).

Rapala y col. (2002) compararon los métodos de ELISA y HPLC, para detectar las diferentes variantes de MC empleando varias matrices: estándares de toxinas de gran pureza, cultivos de laboratorio, muestras de aguas y floraciones de cianobacterias tóxicas. A pesar de la sobreestimación de la concentración de toxinas por HPLC en estándares de toxinas, los análisis de muestras de campo dieron valores más bajos que en el ensayo de ELISA. Esto puede explicarse en parte por la concentración previa necesaria en las muestras que se analizan por HPLC y el paso extra de purificación mediante el proceso de extracción en fase sólida (SPE) o utilizando columnas de inmunoafinidad, para eliminar las impurezas, mientras que las muestras que se analizan por ELISA se determinan directamente. Por tanto, es posible que ambas técnicas (HPLC y ELISA) puedan producir resultados diferentes en muestras desconocidas no debido a las características de un mal procedimiento, sino a que miden cosas distintas (Lawrence y Menard, 2001). La técnica de ELISA sólo permite determinar toxicidad en términos de equivalentes de MC-LR (McElhiney y Lawton, 2005). La técnica de ELISA que utiliza un anticuerpo anti-Adda específico, permite detectar todos los tipos de MC presentes en la muestra al ser el Adda un aminoácido característico presente en todas estas toxinas.

El ensayo de inhibición de la fosfatasa de proteína (PPA) se basa en la inmunodetección y en los efectos tóxicos de MC a nivel molecular, como la capacidad de inhibir específicamente a las fosfatasas de proteína PP1 y PP2A. Los ensayos colorimétricos son rápidos, fáciles y sensibles, requieren poca equipación y son menos caros que los métodos de ELISA y PPIA marcado radiactivamente. Aún así, pueden dar lugar a falsos positivos y poseen escasa sensibilidad para detectar bajas concentraciones. Existe una buena correlación con los métodos cromatográficos, como HPLC (Wirsing y col., 1999; Metcalf y col., 2001) y es una buena opción como método de cribado para detectar MC en muestras de agua de bebida por debajo de los límites de 1 µg/L (Bouaïcha y col., 2002). Recientemente, Smienk y col. (2007) han desarrollado un kit que permite la detección y cuantificación de MC en aguas emergentes de depuradoras, con una sensibilidad elevada (0,18 µg/L), y unos parámetros de repetitividad, reproducibilidad y recuperaciones adecuadas.

Las técnicas químicas permiten no sólo una cuantificación segura de MC en una muestra, sino que proporcionan información detallada de la identidad de las distintas variantes de toxinas existentes en ella. La eficiencia de la técnica empleada va a estar influenciada por el método de extracción de MC utilizado, existiendo distintas posibilidades de disolventes y sus mezclas (Moreno y col., 2005c); otro factor importante son las etapas de concentración y purificación de la muestra, utilizándose particularmente la extracción en fase sólida (SPE) con C₁₈ (Xie y Park, 2007) o columnas de inmunoafinidad (Aguete y col., 2003; Moreno y col., 2005b).

Entre dichas técnicas destacan la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con diferentes detectores (Poon y col., 2001), y la

Electroforesis Capilar (Aguete y col., 2003). En los últimos años, se está aplicando la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida (HPLC-MS) especialmente para eliminar los inconvenientes del detector UV, como son: poseer menor sensibilidad y selectividad, y problemas de identificación, pues las diferentes variantes de MC poseen espectros muy similares (Cameán y col., 2004; Barco y col., 2005). La comparación de HPLC-MS, ELISA y PP1A en la determinación de MC en productos de algas, ha revelado que los resultados obtenidos por HPLC-MS fueron significativamente más bajos que los procedentes de los ensayos biológicos (Lawrence y Menard, 2001).

El desarrollo de la técnica MALDI-TOF-MS (matriz asistida por desorción/ionización de láser asociado a un analizador de tiempo de vuelo-espectrometría de masas) ha permitido su aplicación para el análisis de muestras que contengan MC (Fastner y col., 2001; Welker y col., 2002; Ouahid y col., 2005). Dicha técnica sólo necesita cantidades del orden del microgramo del material (en vez de miligramos como requiere HPLC o los bioensayos) y la detección es rápida, sin necesidad de purificación o concentración de las muestras, disminuyendo el tiempo de análisis; además permite la identificación de MC conocidas y de metabolitos desconocidos que pueden ser caracterizados posteriormente. No obstante, los resultados que ofrece son cualitativos. También los métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) están permitiendo la detección rápida de la potencialidad tóxica de las floraciones de cianobacterias, o de determinadas especies (Ouahid y col., 2005).

En resumen, las investigaciones sobre el desarrollo y optimización de métodos sensibles, sencillos y rápidos que permitan una adecuada monitorización de estas toxinas, es un reto importante para los científicos

dedicados a este tema. Ello nos permitirá disponer de datos más fiables para establecer un rango de concentraciones relevantes en el medio ambiente, y evaluar el riesgo derivado de la presencia de estas toxinas en aguas y alimentos contaminados.

2- LA TILAPIA (*Oreochromis* sp.)

Las tilapias (**Fig. FI-12**) son peces pertenecientes a la familia *Cichlidae*, endémicos de África y el cercano Oriente. Se consideran animales ideales para la piscicultura rural.



Figura FI-12: Tilapia (*Oreochromis* sp.)

Posteriormente estos peces han sido introducidos de forma acelerada en otros países tropicales y subtropicales del mundo, recibiendo el sobrenombre de las “gallinas acuáticas”, ante la "aparente facilidad de su cultivo". Tienen una gran facilidad de manejo, alta adaptabilidad a diferentes condiciones del medio, en algunos casos aún las más extremas, fácil reproducción, alta resistencia a enfermedades y alta productividad. Son generalmente herbívoras, aunque aceptan todo tipo de alimentos, tanto naturales como artificiales, incluyendo los producidos por intermedio de la fertilización orgánica o química, lo que las convierte en especies omnívoras.

Para su manejo científico y técnico, las más de 70 especies y 100 subespecies de tilapias han sido agrupadas en cuatro géneros de la Tribu

TILAPINI de acuerdo con sus hábitos reproductivos: *Oreochromis*, *Tilapia*, *Sarotherodon* y *Danakilia* (<http://ag.arizona.edu>)

Dentro de sus áreas originales de distribución, las tilapias han colonizado hábitats muy diversos: arroyos permanentes y temporales, ríos anchos y profundos o con rápidos, lagos profundos, lagos pantanosos, lagunas dulces, salobres o saladas, alcalinas, estuarios y lagunas costeras e incluso hábitats marinos. Las cultivadas habitan por lo general aguas lénticas (poca corriente), permaneciendo en zonas poco profundas y cercanas a las orillas donde se alimentan y reproducen (<http://ag.arizona.edu>).

Aunque las tilapias se consideran de hábitos alimenticios omnívoros, diversos autores sugieren que son primariamente herbívoros (Dempster y col., 1993), a diferencia de otros peces que se alimentan de pequeños invertebrados o bien son piscívoros. Las adaptaciones estructurales de las tilapias a esta dieta son principalmente un largo intestino muy plegado, dientes bicúspides o tricúspides sobre las mandíbulas y la presencia de dientes faríngeos. Debido a la diversidad de alimentos (desde vegetación macroscópica: pastos, hojas, plantas sumergidas, hasta algas unicelulares y bacterias) los dientes también muestran variaciones en cuanto a dureza y movilidad. A pesar de la heterogeneidad en relación a sus hábitos alimenticios y a los alimentos que consumen, las tilapias pueden clasificarse en tres grupos principales:

1. Especies Omnívoras: *O. mossambicus* es la especie que presenta mayor diversidad en los alimentos que ingiere. *O. niloticus*, *O. spilurus* y *O. aureus* presentan tendencia hacia el consumo de zooplancton.

2. Especies Fitoplanctófagas: *S. galilaeus* y *O. macrochir* son especies que se alimentan principalmente de fitoplancton (algas microscópicas). *S. melanotheron* consume células muertas de fitoplancton, *O. alcalicus* consume algas que crecen sobre la superficie de las piedras y rocas.

3. Especies Herbívoras: *T. rendalli*, *T. sparmanni* y *T. zillii* consumen vegetación macroscópica. Para poder cortar y rasgar plantas y hojas fibrosas poseen dientes faríngeos especializados, así como un estómago que secreta ácidos fuertes.

Los requerimientos nutricionales al igual que los hábitos alimenticios de los juveniles difieren considerablemente de los adultos. Los juveniles casi siempre son zooplanctófagos (mayor requerimiento de proteína) y posteriormente su alimentación se vuelve fitoplanctófaga.

Muchas especies son de hábitos territoriales, particularmente durante la temporada de reproducción. Su territorio se observa claramente definido y defendido de los depredadores e intrusos que atacan a sus crías y puede ser fijo o desplazarse a medida que las crías nadan en busca de alimento.

Para ser cultivadas, se destacan las siguientes variables:

- Temperatura: Prefieren temperaturas elevadas. Por ello su distribución se restringe a áreas cuyas isothermas de invierno sean superiores a los 20°C. El rango natural oscila entre 20° y 30°C, pudiendo soportar temperaturas menores.
- Salinidad: Las tilapias son peces de agua dulce que evolucionaron a partir de un antecesor marino, por lo tanto conservan en mayor o menor grado la capacidad de adaptarse a vivir en aguas saladas (eurihalinas).

- Oxígeno Disuelto: La tilapia puede vivir en condiciones ambientales adversas debido precisamente a que soporta bajas concentraciones de oxígeno disuelto. Ello se debe a la capacidad de su sangre a saturarse de oxígeno aún cuando la presión parcial de este último sea baja. Asimismo, tiene la facultad de reducir su consumo de oxígeno cuando la concentración en el medio es baja (inferior a 3 mg/L). Finalmente, cuando esta concentración disminuye aún más, su metabolismo se vuelve anaeróbico.
- pH: Los valores de pH del agua que se recomienda prevalezcan en un cultivo no se refieren tanto a su efecto directo sobre la tilapia, sino más bien a que se favorezca la productividad natural del estanque. Así, el rango conveniente de pH del agua para piscicultura oscila entre 7 y 8. Por otra parte, mientras más estable permanezca el pH, mejores condiciones se propiciarán para la productividad natural misma que constituye una fuente importante de alimento para la tilapia cuando el cultivo se desarrolla en estanques.
- Alcalinidad y Dureza: Los efectos de la alcalinidad y de la dureza del agua no son directos sobre los peces, sino más bien sobre la productividad del estanque. Una alcalinidad superior a 175 mg CaCO₃/L resulta perjudicial, debido a las formaciones calcáreas que se producen y que afectan tanto a la productividad del estanque como a los peces al dañar sus branquias. Una alcalinidad de aproximadamente 75 mg CaCO₃/L se considera adecuada y propicia para enriquecer la productividad del estanque.
- Turbidez: La turbidez del agua tiene dos tipos de efectos: uno sobre el medio y se debe a la dispersión de la luz y el otro actúa de manera mecánica, directamente sobre los peces. Al impedir la libre penetración de los rayos solares, la turbidez limita la productividad natural del

estanque, lo que a su vez reduce la disponibilidad de alimento para la tilapia. Es por ello que se recomienda que el agua de los estanques no sea turbia para que el fitoplancton se pueda desarrollar adecuadamente. Por otra parte, la materia coloidal en suspensión puede dañar físicamente las branquias de los peces provocando lesiones e infecciones. En caso de que las aguas sean demasiado turbias (>100 ppm) conviene propiciar su sedimentación previamente a su introducción a los estanques de cultivo, por medios físicos y/o químicos.

- Altitud: La altitud, como un factor limitante de distribución de la tilapia, se relaciona no con la presión barométrica sino fundamentalmente con la temperatura. Como ya se mencionó, la isoterma invernal de 20°C constituye el límite de su distribución.

Todas estas características necesarias para su crecimiento y cultivo explican que sea una de las especies de peces que habitan en aguas donde se desarrollan floraciones de cianobacterias. De hecho, como hemos comentado, las cianobacterias constituyen parte de la dieta de algunos cíclidos y ciprínidos (Bowen, 1982) y en la bibliografía consultada son diversos los estudios que abordan estos aspectos. Así, Beveridge y col. (1993) demuestran que tilapias (*Oreochromis niloticus*) expuestas a cepas de *M. aeruginosa*, tóxicas y no tóxicas, presentaron un diferente comportamiento en su alimentación, de forma que las expuestas a cepas tóxicas la suprimían, disminuyendo su crecimiento, mientras que las expuestas a cepas no tóxicas aumentaban la velocidad de abertura de sus opérculos, aumentando los volúmenes de agua y alimentos que atraviesan sus branquias. La disminución de su alimentación (25%) resultó lineal conforme la población de células de *M. aeruginosa*, y dependía de la proporción de cepas tóxicas y no tóxicas en una población mixta (Keshavanath y col., 1994).

Incluso se ha investigado la capacidad de tres especies herbívoras *in situ* para controlar las floraciones de cianobacterias en lagos eutróficos, basándose en su eficiencia de alimentarse a base de sus células. La carpa plateada sería la especie más adecuada para estos fines, en comparación con la tilapia (Datta y Jana, 1998).

Estudios posteriores en sistemas de reactores continuos han demostrado la efectividad de las tilapias y de las carpas para filtrar cianobacterias, constituyendo un buen instrumento para el control de cianobacterias como *Microcystis*, o de algas verdes como *Scenedesmus*, en acuicultura (Turker y col., 2003a,b).

Todo ello justifica su elección como modelo experimental en esta Tesis Doctoral.

En cuanto a su comercialización: La tilapia es un producto con un amplio mercado en países como México. La demanda comprende varias presentaciones, desde el pescado fresco entero, hasta el congelado, eviscerado, fileteado, ahumado y otras formas más elaboradas. Es una especie de gran oferta y demanda en el país, su consumo es el más alto entre las especies de agua dulce.

Respecto a la situación económica internacional, especialmente en Estados Unidos, presentan una demanda creciente las variedades rojas de tilapia, principalmente en la presentación de pescado entero eviscerado (<http://www.zoetecnocampo.com>).

Según la Organización Intergubernamental para la agricultura y la alimentación (FAO), las proyecciones de la producción pesquera mundial en 2010 varían entre 107 y 144 millones de toneladas. Se prevé que la mayor

parte del aumento de la producción de pescado procederá de la acuicultura, sector en rápido crecimiento, puesto que se considera que la población mundial consumirá entre 74 a 114 millones de toneladas. Francia es el segundo productor europeo y el n° 11 en el mundo tras producir 285.659 TM. El tercer lugar es ocupado por España con una producción de 233.833 TM. Para el año 2015 se espera lograr una producción de 5 millones de toneladas anuales de tilapia, las cuales se duplicarán en el año 2030. (<http://ag.arizona.edu>) (**Figura FI-13**).



Figura FI-13: Cultivo de tilapias (*Oreochromis* sp.) en tanques

3- VITAMINA E, GLUTATIÓN Y OTRAS SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES

Como ya hemos comentado anteriormente (apartado 1.7.4), los componentes no enzimáticos del sistema de defensa antioxidante juegan un papel importante en los procesos de eliminación de las ERO dentro del organismo. En el caso concreto de las MC, se ha comprobado que diferentes sustancias antioxidantes proporcionan alguna protección frente a una dosis letal de MC-LR (Hermansky y col., 1991). Veamos, a continuación, algunas características de las principales sustancias con capacidad antioxidante conocida:

3.1. Vitamina E

La vitamina E (vit E) (**Figura FI-14**), en estado natural, tiene ocho diferentes formas de isómeros, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Todos los isómeros tienen anillos cromáticos con un grupo hidroxilo, el cual puede donar un átomo de hidrógeno para reducir los radicales libres de los materiales que componen las membranas biológicas hidrófobas de las paredes de las células. Existen formas alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ) para ambos grupos. Cada una de las formas tiene su propia actividad biológica.

El nivel de vit E en el plasma humano es de 22 $\mu\text{mol/L}$; también puede encontrarse en el hígado, riñón y tejido adiposo.

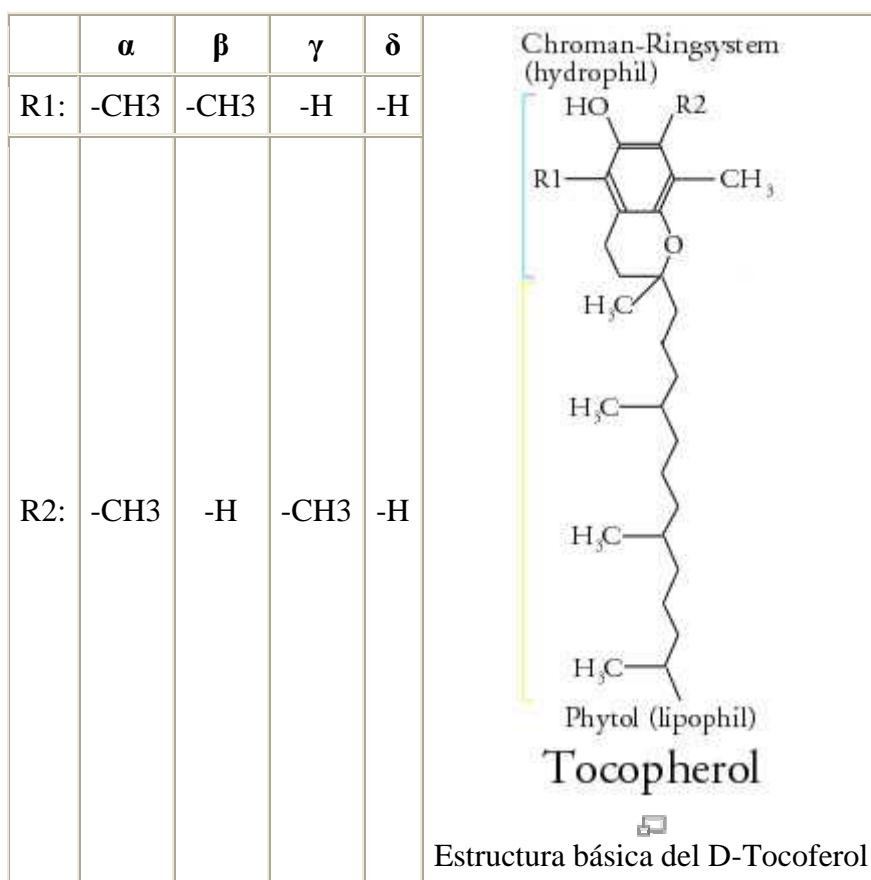


Figura FI-14: Estructura química de la vitamina E.

La vit E se encuentra en muchos alimentos, principalmente en los de origen vegetal, entre ellos el brócoli, las espinacas, la soja, el germen de trigo y la levadura de cerveza (Parker, 1989). También puede encontrarse en alimentos de origen animal como la yema de huevo. Normalmente se suele considerar un aporte de vitamina a los aceites vegetales.

La ingestión diaria recomendada para un adulto es de 10-12 mg/día de α -tocoferol, y de 3 mg/día para un niño recién nacido (Peña y col., 2005).

Los requerimientos de vit E dependen de varios factores como son: el nivel de lípidos en la dieta, estado de oxidación, presencia de otros antioxidantes, etc., existiendo un margen variable según la bibliografía consultada. Así, Satoh y col., (1987) delimitan en 50-100 mg vit E/ kg de dieta como suficiente si ésta tiene un 5% de lípidos. Sin embargo, Roem y col., 1990 sugieren unos requerimientos de 10-25 mg vit E/ kg de dieta con un contenido del 3-6% en aceite de maíz.

Existen tres situaciones específicas en las que se da la deficiencia de vit E: en personas que no pueden absorber dietas ricas en grasas, en niños prematuros con un muy bajo peso corporal (nacimientos con menos de 1,5 kg), e individuos con extraños desórdenes en el metabolismo de las grasas. La carencia aislada de vit E es muy rara, aunque sí se conoce una forma de deficiencia familiar caracterizada clínicamente por presentar trastornos del tracto espinocerebral, distrofia muscular, oftalmoplejia y esterilidad (Peña y col., 2005).

La vit E tiene propiedades beneficiosas para la salud humana, éstas se ven reflejadas sobre el aparato circulatorio, el sistema ocular y el sistema antioxidante, ya que protegen las membranas y otras estructuras celulares de la acción de los radicales libres (Peña y col., 2005). Su función antioxidante consiste en la inhibición de la peroxidación lipídica, atrapando radicales peroxilos y convirtiéndose así en un radical tocoferol, que se regenera a α -tocoferol al reaccionar con ácido ascórbico. En comparación con otros antioxidantes lipofílicos, el α -tocoferol es el más eficiente en la fase lipídica (Niki, 1987).

Numerosos trabajos de investigación han demostrado el papel beneficioso de la vit E sobre el sistema de defensa antioxidante. Así Ognjanovic y col., (2003) observaron efectos protectores sobre el sistema antioxidante enzimático y no enzimático, además de sobre la LPO en muestras de sangre de ratas tratadas con cadmio. El nivel de vit E en la dieta muestra efectos significativos sobre el sistema antioxidante en el hígado de peces (Tocher y col., 2002).

En eritrocitos de rata pretratadas con el insecticida organofosforado se vio demostrado el efecto protector de la vit E junto con la vitamina C (vit C); ambas disminuyen la LPO e inducen los sistemas enzimáticos antioxidantes (Altunas y col., 2002a). Además, *in vitro*, se ha comprobado una disminución de la LPO en muestras de sangre de voluntarios pretratados con metidatió (Altunas y col., 2002b).

Se ha demostrado que, suplementos dietéticos de vit E (63-206 mg/kg) generaban un aumento de la capacidad de respuesta antioxidante dando lugar a una disminución de en los niveles de LPO en hígado y músculo de tilapias (Huang y col. 2003). Además, en esta misma especie, se observó que un aumento de vit E en la dieta elevaba los niveles de GSH hepático (Huang y Huang 2004).

Se ha observado en tilapias que, tras la administración de una dieta suplementada con diferentes concentraciones de vit E (tocoferoles y tocotrienoles) durante nueve semanas, no se producían diferencias significativas en el porcentaje de peso corporal ganado; sin embargo, la vit E se concentraba de forma diferente según los distintos tejidos (47,7% en el tejido adiposo perivisceral; 29,3% en el hígado; 25,9% en músculo; 23,6% en la piel y 9,0% en plasma), al mismo tiempo que proporcionaba un

aumento en la protección de los mismos frente a la LPO (Wang y col., 2006). Sin embargo, otras investigaciones revelan un aumento en el porcentaje de peso corporal de tilapias tratadas con una dieta con bajos niveles de vit E y altos niveles de vit C frente a las tratadas con bajos niveles de vit E y niveles normales de vit C (Shiau y Hsu, 2002).

Los efectos de la vit E sobre la mortalidad o el crecimiento de peces varía según las especies (Tocher y col., 2002). Está ampliamente reconocido que la vit E juega un papel importante en la mejora de las calidades del pescado mediante el mantenimiento de la estabilidad oxidativa en tilapias (Huang y col., 2003; Huang y Huang, 2004), trucha arcoiris (Frigg y col., 1990), salmón atlántico (Scaife y col., 2000) y pez gato africano (Baker y Davies., 1996) entre otros.

En relación con las MC, se observó que un suplemento de vit E de 66,6 U/ratón/día durante 4 semanas aumentaba de forma significativa el tiempo de su muerte y disminuía el aumento del tamaño del hígado respecto del corporal, inducido en ratones tratados con una dosis letal de MC-LR. La vit E, tomada como suplemento en la dieta, puede tener un efecto protector frente a la exposición crónica a MC-LR (Gehring y col., 2003).

3.2. Glutación

El glutación (**Fig. FI-15**) tiene una estructura proteica formada por tres aminoácidos (cisteína, ácido glutámico y glicina).

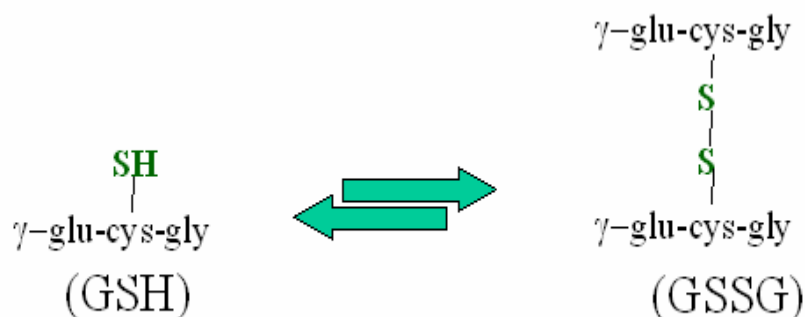


Figura FI-15: Glutati3n reducido y glutati3n oxidado.

Se produce de forma natural en las c3lulas animales, estando presente en nuestra dieta diaria en alimentos tales como: frutas y vegetales frescos o congelados, pescados, carnes, esp3rragos, aguacate y nueces.

En el organismo, concentraciones adecuadas de glutati3n ayudan a mantener un equilibrio 3ptimo en la eliminaci3n de radicales libres (efecto antioxidante), destacando asimismo su papel en las c3lulas hep3ticas debido a su gran capacidad para reaccionar con sustancias t3xicas y favorecer su eliminaci3n.

El glutati3n, junto con el selenio, tiene la funci3n de regenerar la vit C gastada. Asimismo, el glutati3n junto con el selenio y la vit C regeneran la vit E (Kelly y col., 1998). Esta relaci3n sin3rgica ayuda en el mantenimiento del sistema de defensa antioxidante celular. El mantenimiento de niveles adecuados de glutati3n junto con el de otros antioxidantes naturales, es cr3tico para tener un sistema de defensa efectivo contra la generaci3n de radicales libres.

Así, el glutatión colabora en procesos fisiológicos tales como:

- Mantenimiento del sistema inmune, particularmente en la activación de los linfocitos y plaquetas
- Reducción de la proliferación de células con tendencia a la malignidad, colaborando en la defensa de diferentes enfermedades causadas por la presencia de radicales libres (procesos inflamatorios, alzheimer, parkinson, cáncer...)
- Revierte la capacidad de metástasis aumentando la respuesta de las células a la quimioterapia (Wu y col., 2004).

Por su acción antioxidante, colabora en la disminución de los casos de ceguera ocasionada por cataratas, desarrolladas por el estrés oxidativo ocasionado por una alta concentración de oxígeno en las células del cristalino, debidas al bajo consumo de antioxidantes en la dieta (Belda Sanchís y col., 1999). Como hemos comentado, el contenido hepático de glutatión es un factor crítico para preservar el equilibrio celular redox y proteger los hepatocitos del estrés oxidativo (Ding y col., 2000b, Pflugmacher y Wiegand, 2001).

En tilapias, tratadas con altas dosis de cadmio, se produjo una disminución en la síntesis de GSH por inhibición de la glutamil cisteína sintetasa al mismo tiempo que se aumentaba su consumo por estimulación indirecta de la actividad glutatión s-transferasa (GST) (Hui y col., 2001).

El GSH es un factor importante para la regulación de la organización del citoesqueleto, además, hay evidencias que sugieren que juega un papel relevante en la destoxicación de MC (Ding y col, 2002), observándose así una respuesta bifásica en los niveles de glutatión celular en hepatocitos de rata expuestas a extractos de MC. El glutatión, al igual que otros

compuestos con grupos tioles, está involucrado en procesos de detoxificación mediante conjugación con MC-LR (Kondo y col., 1996) por la vía de acción de la GST en hígado de ratones y ratas expuestas (Pflugmacher y col., 1998b; Takenada y col., 2001). Hindi y col. (2003) observaron una disminución del GSH hepático en ratones, 30 minutos después de su tratamiento con tres diferentes microcistinas (MC-LR, MC-RR y MC-YR).

3.3. Otras sustancias antioxidantes:

Además de la vit E y el glutatión, son numerosas las sustancias con acción antioxidante celular y que, por tanto, tienen una importante función ante situaciones de estrés oxidativo.

* La silimarina (**Figura FI-16**) es un antioxidante flavonoide, compuesto por tres principios activos: silibina, silidianina y salicristina, que se encuentra en las semillas del cardo mariano o cardo lechoso (*Silybum marianum*).

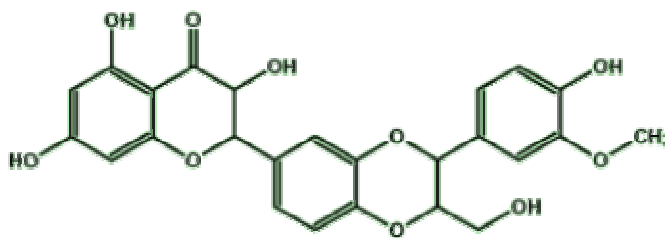


Figura FI-16: Estructura química de la Silimarina.

Tiene la propiedad de inhibir específicamente la lipooxigenasa y por tanto la síntesis de leukotrienos, capturando y neutralizando radicales libres generados en los procesos de estrés oxidativo. Es muy activo a nivel de

membrana y se ha demostrado su efecto protector frente a la MC-LR en ratones tratados con 100 µg/Kg (Hermansky y col., 1991). Está aceptado como mecanismo de acción la estabilización de membranas, además de prevenir e inhibir la LPO.

* La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (**Figura FI-17**) es una hormona indolamínica sintetizada a partir del neurotransmisor serotonina. Es producida principalmente por la glándula pineal (Reiter y col., 1995) y participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos.

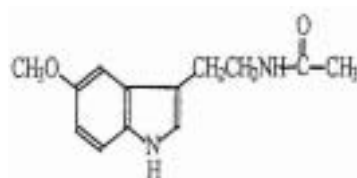


Figura FI-17: Estructura química de la Melatonina.

Elimina radicales hidroxilos endógenos con un alto poder antioxidante (Karbownik y col., 2000). Ha demostrado ser tanto o más efectiva que el glutatión o el manitol en la reducción de la toxicidad producida por radicales hidroxilos (Ferry y col., 2004), y posiblemente presente más eficacia que la vit E en la reducción de la toxicidad producida por radicales peroxilos (Fisher y col., 2004). Además, la melatonina es altamente lipófila (Costa, 1994) y algo hidrófila (Shida y col., 1994) lo que ayuda a traspasar las barreras morfofisiológicas y a penetrar en todos los compartimentos subcelulares.

En relación con las MC, la melatonina inhibe la formación de 8-hidroxidesoxiguanosina inducida por acción de dicha toxina, de manera

dosis dependiente, en ADN de ratones expuestos. Se ha observado que la melatonina presenta un mayor efecto antioxidante, disminuyendo los niveles de 8-hidroxidesoxiguanosina generados en ratones tratados con MC-LR, siendo necesarias dosis menores que las de vit E (trolox) y las de vit C (ascorbato) (Al-Jassabi y Khalil, 2006). Los tres antioxidantes desempeñan un importante papel en la protección del daño celular producido por radicales libres (Al-Jassabi y col., 2006).

* El selenio (Se) es un oligoelemento que se encuentra de forma natural en la tierra, agua y algunos alimentos como carnes, pescados, cereales y algunos vegetales. Es esencial ya que interviene en varias vías metabólicas formando parte del sistema enzimático de glutatión peroxidasa, ampliamente distribuida en todos los tejidos.

De las selenoproteínas caracterizadas (**Figura FI-18**), cuatro son glutatión peroxidasas. Estas enzimas metabolizan peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos en diferentes compartimentos de la célula. De esta manera se explica el papel inicial del Se en los sistemas oxidativos (Arthur, 1997). Son las siguientes:

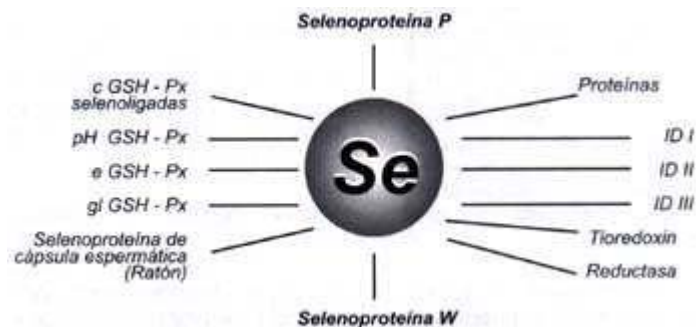


Figura FI-18: Selenoproteínas en mamíferos.

- Glutación peroxidasa citosólica (c GSH-Px).
- Glutación peroxidasa fosfolípido hidroperóxido (pH GSH-Px).
- Glutación peroxidasa intracelular (e GSH-Px).
- Glutación peroxidasa gastrointestinal (gi GSH-Px).
- Tipos I, II y III de Iodotironina deiodinasas (ID I, ID II, ID III).

Las selenoproteínas Iodotironina deiodinasas (ID I, II y III) regulan la conversión de tiroxina (T₄) a 3, 3, 5-triyodotironina (T₄), la hormona tiroidea activa, o la hormona triyodotironina reversible (rT₃) y la hormona tiroidea inactiva. La selenoproteína W se manifiesta en músculo esquelético y se ha identificado una selenoproteína en la cápsula espermática de mamíferos (Arthur, 1997).

En numerosas especies estudiadas la deficiencia de selenio aparece asociada a una reducción de la función inmune. Se ha demostrado además que tanto la respuesta inmune celular como la humoral están incrementadas en animales que reciben suplementos de selenio (Nemec y col., 1990; Bires y col., 1993; Morgante y col., 1996).

De modo sinérgico con la vit E, se le considera un agente “antineoplásico natural”, probablemente por su poder destoxicante de peróxidos y radicales libres, sustancias implicadas en la carcinogénesis.

En estados de desnutrición se ha advertido una deficiencia de selenio con repercusión cardíaca o hepática, entre otras.

Se recomiendan alrededor de 60 µg/día de Se (Peña y col., 2005), la ingestión de dosis mucho más elevadas resulta ser tóxica. El selenio, por su analogía química, está íntimamente relacionado con el azufre lo que tiene

una gran importancia desde el punto de vista biológico, ya que el Se puede llegar a reemplazar al S en aminoácidos, glucósidos, glutatión, tiamina y otros compuestos a los que da carácter tóxico (Benavides y Silva, 1965).

La actividad biológica más importante del Se parece ser a través de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Arthur, 1997), la cual en cooperación con la vit E y algunos otros agentes antioxidantes son capaces de reducir los efectos destructivos sobre las células vivas de reacciones peroxidativas. Los efectos antioxidantes del Se y la vit E son diferentes, pero complementarios. La vit E previene la formación de peróxidos grasos por secuestro de radicales libres antes de que ellos inicien la LPO. El Se como parte esencial de GSH-Px, reduce peróxidos ya formados a alcoholes menos reactivos.

El Se ha demostrado tener un efecto protector ante el estrés oxidativo cuando se suministra antes de la exposición a la sustancia que produce la oxidación (Cheng y col., 1999). La suplementación con Se ha provocado un aumento en la actividad de las selenoenzimas glutatión peroxidasa (GPx) y tioredoxina reductasa, ambas con un papel importante en la reducción de hidroperóxidos lipídicos (Arteel y Sies, 2001).

Con respecto a las Microcistinas, autores como Gehringer y col. (2002) observaron en ratones que el pretratamiento con Se no alteraba la patología normal del hígado, aunque sí parecía reducir los daños hepáticos inducidos por estas toxinas.

* La L-cisteína (**Figura FI-19**) es un aminoácido no esencial portador de azufre con propiedades antioxidantes. Es importante para la síntesis de la queratina (proteína que se encuentra en la piel, el pelo y las uñas). También está implicado en el metabolismo de la energía celular y en la síntesis de los ácidos grasos.

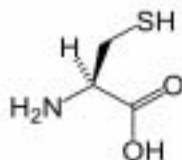


Figura FI-19: Estructura química de la Cisteína.

Takenaka y Otsu, (1999) investigaron los efectos de la L-cisteína y el GSH sobre la toxicidad inducida por MC-LR en hígado de ratón, y parece que el efecto protector de la L-cisteína, con respecto a la toxicidad hepática aguda generada por la MC-LR, es aún mayor que el que ejerce el glutatión reducido.

* La vitamina C (vit C) (**Figura FI-20**) se considera uno de los más potentes y menos tóxicos de los antioxidantes naturales (Bendich y col., 1986; Weber y col., 1996) interviniendo en reacciones de detoxificación celular. Además, es cosustrato de reacciones de oxido-reducción, participa en la formación de colágeno, en la síntesis de hormonas esteroideas y tiene un papel importante en el sistema inmune, entre otras funciones (Peña y col., 2005).

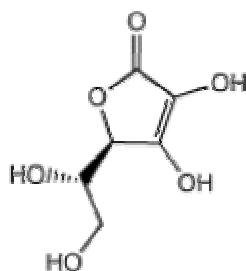


Figura FI-20: Estructura química de la vitamina C.

Las principales fuentes de ascorbato en la dieta son frutas, especialmente cítricos, kiwis, cerezas y melones; también se encuentra en verduras, tales como brocoli, coliflor, coles de Bruselas y berza, y en hortalizas como patata, tomate y pimiento, donde su contenido puede exceder los 100 mg de ascorbato/100 g de peso fresco. La ingesta diaria recomendada es de 60 mg/día (Peña y col., 2005).

Es soluble en agua y se encuentra a concentraciones elevadas en muchos tejidos. El plasma humano contiene aproximadamente 60 μmol de ascorbato/L. En su interacción con las ERO se oxida a dehidro-ascorbato, que se vuelve a reciclar a ácido ascórbico por la enzima dehidro-ascorbato reductasa. Es un secuestrador muy efectivo de radicales como anión superóxido e hidroxilo, y de peróxido de hidrógeno y oxígeno. En soluciones acuosas la vit C también atrapa eficientemente especies reactivas de óxido de nitrógeno impidiendo la nitrosación de moléculas diana. Además, como hemos comentado anteriormente, colabora en la acción de la vit E devolviéndola a su estado reducido (Kelly y col., 1998).

El ascorbato también puede actuar *in vivo* como prooxidante en presencia de metales de transición como el Fe y el Cu. Se pueden generar los radicales ascorbatos e hidroxilos e iniciarse un proceso de peroxidación

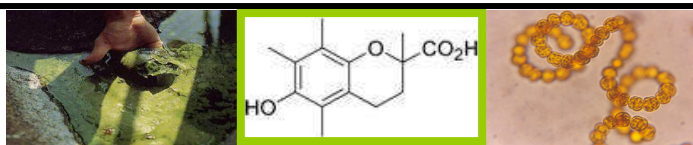
lipídica. Sin embargo, las cantidades de metales de transición libres *in vivo* son muy pequeñas porque normalmente están eficazmente unidos a proteínas de transporte.

Como comentamos anteriormente, se ha observado un efecto protector de la vit C administrada junto con la vit E, ya que ambas indujeron una disminución de la LPO y del sistema enzimático antioxidante en eritrocitos de rata pretratadas con fentión (insecticida organofosforado) (Altuntas y col., 2002b); además de una disminución de la LPO en estudios *in vitro* con muestras de sangre de voluntarios pretratados con metidathion (Altuntas y col., 2002a).

Otras sustancias antioxidantes como los licopenos (Al-Jassabi, 2005) y muy recientemente, flavonoides (Jayaraj y col., 2007) y compuestos polifenólicos del te verde (Xu y col., 2007) han demostrado tener un efecto protector sobre la toxicidad inducida en ratón por la MC-LR. Ambas conseguían restaurar la actividad de las enzimas antioxidantes y los niveles de LPO afectados por esta toxina, demostrándose además en el caso de los polifenoles que esta actividad era dependiente de la dosis.

Por último, añadir que constituyentes de la dieta tales como Cu y Zn están implicados en los sistemas de defensa antioxidante, por ser indispensables para el funcionamiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD).

OBJETIVOS



A la vista de los antecedentes expuestos, nos planteamos como hipótesis fundamental de este trabajo la siguiente cuestión:

¿Constituye el estrés oxidativo un mecanismo de acción tóxica importante en la producción de efectos por Microcistinas (MC) en peces (*Oreochromis* sp.) expuestos a dichas toxinas?

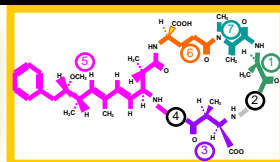
Se plantea investigar la producción de estrés oxidativo en el modelo experimental escogido (*Oreochromis* sp.) mediante la exposición a dosis repetidas de MC procedentes de floraciones naturales de cianobacterias, que contienen MC. Asimismo, estudiar los efectos agudos individuales producidos por los estándares puros de MC-LR y MC-RR evaluando por último el papel protector de la vitamina E frente a la toxicidad que ejercen dichas MC.

En concreto, los objetivos más específicos del presente trabajo son:

- 1- Comprobar la producción de estrés oxidativo en tilapias macho (*Oreochromis* sp.) por exposición a células de cianobacterias que contienen MC, estudiando la influencia del tiempo de exposición (14 y 21 días) y forma de administración con la dieta (liofilizado triturado y no triturado). Dicho estudio se lleva a cabo en hígado, riñón y branquias de los peces expuestos evaluando los cambios en las enzimas implicadas en el estrés oxidativo y la generación de peroxidación lipídica (LPO).
- 2- Comparar la toxicidad aguda de distintas MC puras (MC-LR y MC-RR) en la inducción de estrés oxidativo en el modelo experimental seleccionado.

- 3- Investigar la posible evolución de los biomarcadores de estrés oxidativo implicados, con el tiempo, tras exposición aguda a MC-LR en *Oreochromis* sp.
- 4- Analizar *in vivo* en tilapias macho (*Oreochromis* sp.) expuestas a MC el papel protector de diferentes dosis de vitamina E para su potencial aplicación como suplemento en la dieta de dichos peces en relación con la inducción de estrés oxidativo y evolución de dichos efectos en el tiempo.

MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. EQUIPOS Y MATERIALES DE USO GENERAL

3.1.1. ÍNDICE DE APARATOS UTILIZADOS

Los aparatos utilizados en este trabajo se relacionan a continuación:

- Agitador magnético Agimatic P-Selecta
- Balanza analítica Mettler AJ100
- Balanza semianalítica Mettler PJ400
- Baño de agua, modelo Univeba de P-Selecta
- Baño de ultrasonidos, UCI-150 Ultrasonic cleaner, de Raypa
- Bomba de vacío, modelo B-169 de BUCHI
- Centrífuga Beckman Coulter, modelo Allegra 64R
- Centrífuga de tubos eppendorf: modelo microspin^{plus}
- Congelador -20° C, Saivod, modelo Turbo Fresh
- Congelador -80° C Giratl, modelo Revco
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) Varian modelo 9012, con detector de haz de fotodiodo Varian, modelo ProStar 330, con programa Star Analytical Work Station (Varian)
- Espectrofotómetro de doble haz Varian, modelo Cary-100
- Lector de microplacas automático: modelo Titertek[®] Multiskan
- Rotavapor, modelo RV 05-ST de IKA[®]-WERKE
- Ultra-Turrax T 25 basic IKA[®]-WERKE
- Vortex V-1 de Boeco.

Material fungible:

- Cubetas para espectrofotómetro
- Matraces de rotavapor de 100 mL
- Pipetas automáticas de volumen variable 20, 100, 200, 1000 y 5000 μL
- Pipetas pasteur de vidrio

- Puntas para pipetas automáticas
- Tubos de centrifuga de 10 mL de pyrex
- Tubos de centrifuga de fondo cónico desechables de 10 mL
- Tubos de eppendorf

3. 1. 2. ÍNDICE DE REACTIVOS UTILIZADOS

Los reactivos utilizados en este trabajo se relacionan a continuación:

- Ácido acético glacial: Panreac 141318
- Ácido fórmico: Merck 1.00264.1000
- Ácido meta-fosfórico: Sigma M-6288
- Ácido tricloroacético: Merck 1.00807.1000
- Agua milliQ
- ATB: Sigma T-5500
- Azida sódica: Fluka 71289
- BHT: Sigma B-1378
- Bicarbonato potásico: Sigma P-9144
- Bio-Rad[®]: Bio-Rad 500-00
- Butanol: Romil H083
- Citocromo C: Sigma C-3006
- Cloruro potásico: Sigma P-4504
- Cloruro sódico: Panreac 141659
- DNPH: Sigma D-2630
- EDTA: Sigma E-1644
- Estándar de Microcistina LR de 99% de pureza. Calbiochem-Novabiochem corporation y Cyanobiotech
- Estándar de Microcistina RR de >98% de pureza. Calbiochem-Novabiochem corporation y Cyanobiotech

- Estándar de Microcistina YR de 95,7% de pureza. Calbiochem-Novabiochem corporation y Cyanobiotech
- Etanol: Fluka 02854
- Fosfato diácido de potasio. Panreac 141509
- Gammaglobulina bovina: Bio-Rad 500.0005
- Glutation reductasa: Sigma G-3664
- GSH: Sigma G-4251
- GSSG: Sigma G-4376
- Guanidina: Sigma G-4505
- H₂O₂: Sigma H-0904
- HCl: Panreac 141659
- KCl: Sigma P-4504
- KCN: Panreac 104967
- Kit BIOXYTECH[®] GSH/ GSSG-412[™] Oxis Research[™]
- Kit ELISA: Envirogard Microcystin Plate Kit
- KOH: Panreac 105021
- Metanol de máxima pureza: Merck 1.06018.2500
- NADPH: Sigma N-1630
- NaOH: Panreac 141687
- PBS: Sigma P-4417
- SDS: Sigma L-4390
- TEP: Sigma T-9889
- Tricaína: Sigma MS-222
- Tris: Sigma T-1378
- Xantina: Sigma X-2502
- Xantino oxidasa: Sigma X-4875

3. 2. MODELO EXPERIMENTAL

La mayor parte de los estudios en ecotoxicología y toxicología medioambiental son llevados a cabo en animales. Estos estudios son útiles no sólo para proporcionar información para la evaluación del riesgo tóxico e investigar sus efectos y mecanismos de acción, sino también para detectar, controlar y monitorizar la presencia de contaminantes en el medio ambiente (Van der Oost y col., 1996).

El presente estudio se ha llevado a cabo en peces de agua dulce pertenecientes a la familia *Cichlidae*, concretamente en tilapias macho (*Oreochromis* sp.) con un peso medio de $52,04 \pm 8,10$ g. La información detallada sobre esta especie se mostró en el apartado I-2 de la introducción.

Justificación de su elección:

La tilapia es uno de los peces que más rápidamente se ha introducido en acuicultura, motivado por la facilidad que presenta su manejo, gran capacidad de adaptación a condiciones adversas y fácil reproducción. Sus distintas variedades prefieren aguas de lagos y embalses con una temperatura óptima de reproducción entre 23-28°C, siendo filtradores y consumidores de cianofíceas en su época de crecimiento.

Según datos de la FAO, la evolución de la acuicultura mundial de tilapia ha crecido en una tasa del 7% promedio anual entre 1990 y el año 2000, pasando de 800 mil toneladas a 1,9 millones de toneladas. En Europa se está despertando un enorme interés por el cultivo de tilapia, y concretamente en España se ha observado un alto incremento en la producción de la misma, que entre el año 2002 y el 2003 pasó de 16,50 toneladas a 127,40 toneladas.

Aclimatación de los peces:

Los peces fueron suministrados desinteresadamente por la piscifactoría “Iniciativas Empresariales del Sur de Europa” de Córdoba, a través del convenio de Cooperación Educativa existente entre la Universidad de Sevilla y la citada empresa.

Una vez en el laboratorio, se acondicionaron 12 acuarios de cristal con capacidad de 96 L (80x30x40cm) con filtro Eheim Liberty 150 de 570 l/h y cartuchos Bio-Espumador como única masa filtrante. Tres días antes de la introducción de las tilapias, el agua sometió a recirculación mediante el sistema de filtros y aireación, con el objeto de eliminar el Cl presente en la misma. La temperatura se mantuvo a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mediante el uso de calentadores acuáticos con termostato.

Durante la totalidad de los experimentos, se mantuvieron las condiciones requeridas para este tipo de peces: $T^{\text{a}} 21 \pm 2^{\circ}\text{C}$; oxígeno disuelto 6,5-7,5 mg/L; pH $7,6 \pm 0,2$; alcalinidad y dureza $< 175 \text{ mg}/\text{CaCO}_3/\text{L}$; turbidez $< 100 \text{ ppm}$ y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

Los peces fueron aclimatados en estas condiciones y alimentados con un preparado comercial para peces (0,3g/día), suministrado por la propia empresa, durante quince días antes de comenzar los experimentos.

3.3. RECOGIDA DE FLORACIONES DE CIANOBACTERIAS Y DETERMINACIÓN DE MC

Las MC se extrajeron a partir de materia celular seca provenientes de tres floraciones diferentes de la riera del Guadiana (Mértola, Portugal) cedidas por la Dra. Franca (Instituto da Saude Dr. Ricardo Jorge de Lisboa, Portugal). El método de extracción empleado ha sido el de Moreno y col., (2004b):

El liofilizado se extrae por triplicado con ácido acético 0,1 M y una mezcla metanol: cloroformo (1:1 v/v). La suspensión celular se sonica en un baño de ultrasonidos y se agita a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga recogiendo las fases superiores acuosas para su posterior concentración en un rotavapor. El residuo se resuspende en metanol para su separación cromatográfica.

La separación cromatográfica de las MC se realizó en una columna C18 LiChrosphere (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm) proporcionada por Merck (Darmstadt, Alemania).

Para la identificación y cuantificación de toxinas en liofilizados de células, se han empleado disoluciones estándares de las MC (MC-RR, MC-YR y MC-LR) de pureza adecuada (>99%), que fueron proporcionadas por Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, Ca, USA) o por Cyanobiotec (Berlín, Alemania). Dichos estándares se resuspendieron en metanol a una concentración de 500 µg/mL, tomándose la cantidad necesaria de éstas para obtener las disoluciones de trabajo requeridas (0,5-5,0 mg/L de cada toxina). Para la inyección intraperitoneal de los estándares puros de MC, éstos se preparan en disolución salina a las dosis adecuadas (500 µg/Kg de MC-LR y MC-RR) respectivamente.

En los extractos de células de cianobacterias analizados sólo se identificó MC-LR y para su cuantificación se utilizó el área del pico de la disolución estándar de MC-LR. Las concentraciones de MC-LR obtenidas en los liofilizados de células fueron 3.230 µg/g MC-LR, 3.340 µg/g MC-LR y 1.350 µg/g MC-LR.

3. 4. MÉTODO EXPERIMENTAL

Se han realizado un total de cinco experimentos, en los que se han tenido en cuenta diferentes variables, así pues, hemos querido ver la influencia de:

- La vía de administración (oral e intraperitoneal)
- La forma de administración del material liofilizado (triturado y no triturado)
- El tiempo de exposición a la toxina (aguda y subcrónica)
- El tiempo de recuperación de efectos producidos por las MC en 24, 48 y 72 horas.
- El tipo de toxina (MC-LR y MC-RR)
- Suplementos de vitamina E (antioxidante) en la dieta

En la toxicidad de las MC en tilapia.

3. 4. 1. PAUTAS DE TRATAMIENTO Y GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN

3. 4. 1. 1. EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA DURANTE 14 Y 21 DÍAS/ VÍA ORAL (TRITURADO Y NO TRITURADO)/ MC-LR

El objeto de este experimento fue ver la influencia tanto del tiempo de exposición al tóxico (14 y 21 días), como de la forma de administración del material liofilizado de células de cianobacterias (triturado y no triturado con la dieta).

A continuación se muestra un esquema (**Figura FM-1**) del planteamiento y ejecución de dicho ensayo, tiempos de exposición y dosis administradas:

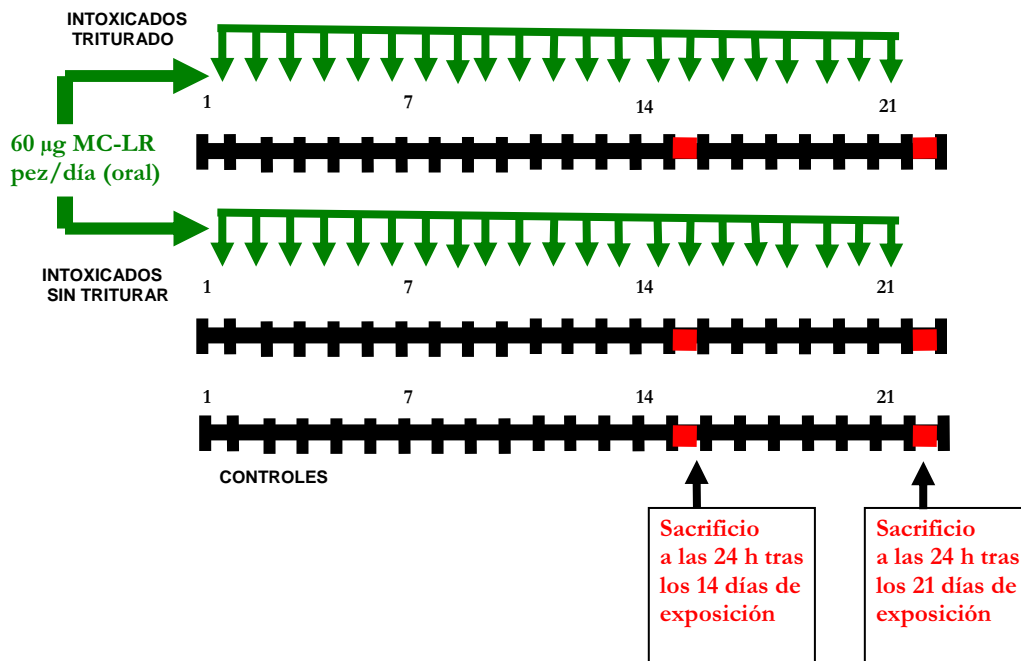


Figura FM-1: Esquema de la exposición oral subcrónica de tilapias a 60 µg MC-LR/pez/día durante 14 y 21 días.

A. Ensayo de 14 días de exposición vía oral, liofilizado triturado con la dieta

Tras el periodo de aclimatación anteriormente descrito, dos lotes de peces se dispusieron en sendos acuarios ($n=8$), uno para los peces control y otro para los peces intoxicados. La exposición a MC fue de 14 días (**Figura FM-1**).

- Lote control: los peces se alimentaron con 0,3 g/día de un preparado comercial para peces.
- Lote expuesto: los peces se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial para peces mezclado, mediante triturado manual con ayuda de un mortero y un pistilo y posterior sonicación, con la cantidad suficiente de liofilizado de células de cianobacterias (3.230 $\mu\text{g/g}$ MC-LR) para conseguir una dosis aproximada de 60 μg MC-LR /pez /día (determinado por HPLC). El resultado de la mezcla es una pasta que, en fracciones de pequeño tamaño, se suministran a los peces. La trituración del liofilizado se realiza con el fin de lisar las células de cianobacterias y favorecer la liberación de la toxina intracelular.

La ingesta completa del preparado por los peces en cada uno de los acuarios fue comprobada visualmente tras una hora desde su administración.

B. Ensayo de 21 días de exposición vía oral, liofilizado triturado y no triturado con la dieta

Los peces se dispusieron en 3 acuarios ($n=8$), uno para los peces control y otros dos para los peces intoxicados (con el liofilizado triturado o sin triturar). El periodo de exposición fue de 21 días (**Figura FM-1**).

- Lote control: los peces se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial para peces.
- Lote expuesto al liofilizado triturado: los peces se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial para peces mezclado, mediante triturado manual con ayuda de un mortero y un pistilo y posterior sonicación, con la cantidad suficiente de liofilizado de células de cianobacterias (3.340 $\mu\text{g/g}$ MC-LR) para conseguir una dosis aproximada de 60 μg MC-LR/pez/día (determinado por HPLC).
- Lote expuesto al liofilizado no triturado: los peces se alimentaron primero con la cantidad suficiente de liofilizado de células de cianobacterias (3.340 $\mu\text{g/g}$ MC-LR) para conseguir una dosis aproximada de 60 μg MC-LR /pez /día (determinado por HPLC) y una vez que éstas eran ingeridas se les añadía 0,3 g/ día de un preparado comercial para peces.

Al igual que en el ensayo anterior, el tiempo en el que se aseguró la ingesta completa del preparado por los peces en cada uno de los acuarios fue de una hora.

Tras el correspondiente periodo de exposición (14 o 21 días), los peces fueron sacrificados.

3. 4. 1. 2. EXPOSICIÓN I.P. AGUDA (DOSIS ÚNICA) DE MC-LR Y MC-RR/ SACRIFICIO A LOS 7 DÍAS

El objeto de este experimento fue ver la influencia tanto de la vía de administración del tóxico (i.p., en comparación con la oral del experimento anterior), como del tipo de toxina administrada (MC-LR y MC-RR).

A continuación se muestra un esquema (**Figura FM-2**) del planteamiento y ejecución de dicho ensayo, congéneres de MC utilizados y dosis administradas:

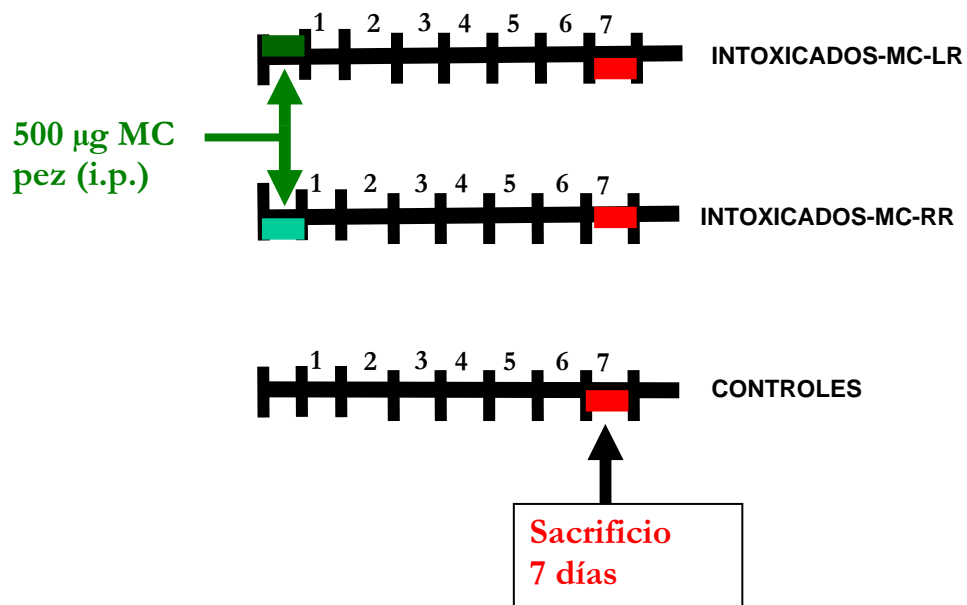


Figura FM-2: Esquema de la exposición intraperitoneal aguda de tilapias a 500 µg MC-LR ó MC-RR/pez.

Los peces se dispusieron en 3 acuarios ($n=8$), un grupo control y otros dos lotes de intoxicados.

- Lote control: a los peces se les inyectó 0,5 ml de disolución salina por vía i.p., y se alimentaron con 0,3 g/día de un preparado comercial para peces durante 7 días.
- Lote expuesto a MC-LR: a los peces se les inyectó una única dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ MC-LR por vía i.p., utilizando 0,5 ml de disolución salina como vehículo. Se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial para peces durante 7 días.
- Lote expuesto a MC-RR: a los peces se les inyectó una única dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ MC-RR, utilizando 0,5 ml de disolución salina como vehículo. Se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial para peces durante 7 días.

El tiempo de observación de la posible mortalidad o aparición de efectos tóxicos en las tilapias fue de 7 días, tras los cuales fueron sacrificados.

3. 4. 1. 3. EXPOSICIÓN AGUDA (DOSIS ÚNICA)/ VÍA ORAL (TRITURADO)/ MC-LR/ SACRIFICIO A LAS 24 Y 72 HORAS

El objeto de este experimento fue ver la influencia del tiempo (24 y 72 horas) en la recuperación de los efectos producidos por la toxina (MC-LR) en el pez, tras una única dosis de ésta.

A continuación se muestra un esquema (**Figura FM-3**) del planteamiento y ejecución de dicho ensayo, tiempos de exposición y dosis administrada:

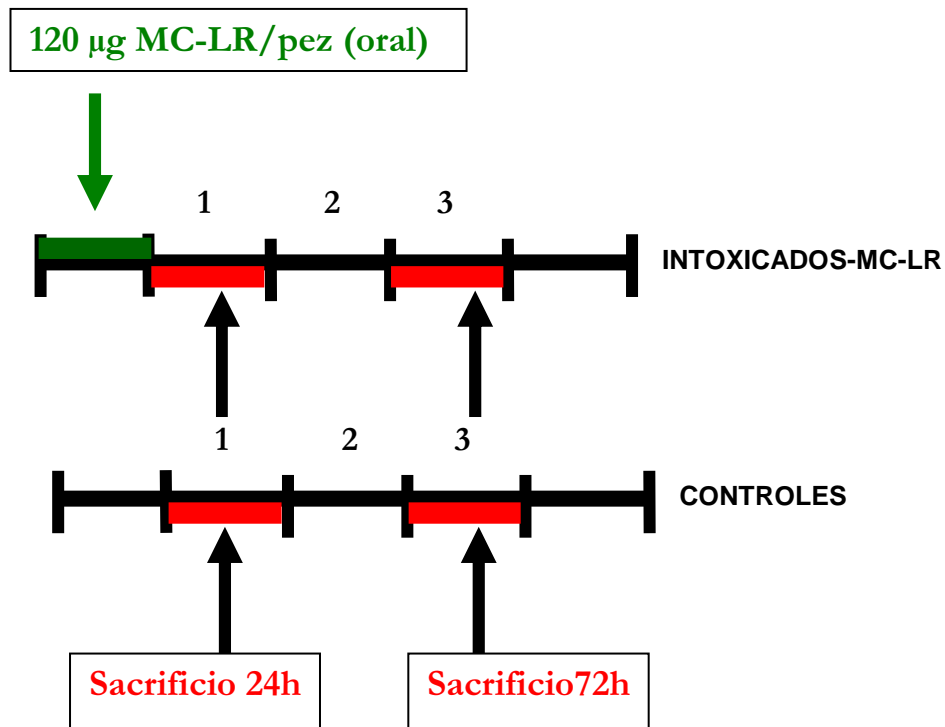


Figura FM-3: Esquema de la exposición oral aguda de tilapias a 120 µg MC-LR/pez/ sacrificio a las 24 y 72 horas de la exposición.

Los peces se en 4 acuarios ($n=8$), dos para los peces control (24 horas y 72 horas) y otros dos para los peces intoxicados (24 horas y 72 horas).

- Lotes control 24 horas y 72 horas: los peces se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial para peces y fueron sacrificados a las 24 horas y 72 horas, respectivamente.
- Lote expuesto 24 horas: los peces se alimentaron con 0,3 g/día de un preparado comercial para peces mezclado, mediante triturado manual con ayuda de un mortero y un pistilo y posterior sonicación, con la cantidad suficiente de liofilizado de células de cianobacterias (1.350 $\mu\text{g/g}$ MC-LR) para conseguir una dosis aproximada de 120 μg MC-LR/pez (HPLC). Los peces fueron sacrificados a las 24 horas de la exposición.
- Lote expuesto 72 horas: los peces se alimentaron con 0,3 g/día de un preparado comercial para peces mezclado, según el procedimiento anteriormente descrito para conseguir una dosis aproximada de 120 μg MC-LR /pez. Fueron sacrificados a las 72 horas de la exposición. La trituración del liofilizado se realiza con el fin de lisar las células de cianobacterias y favorecer la liberación de la toxina intracelular.

El tiempo en el que se aseguró la ingesta completa del preparado por los peces en cada uno de los acuarios fue de una hora.

3. 4. 1. 4. EXPOSICIÓN AGUDA (DOSIS ÚNICA)/ VÍA ORAL (TRITURADO)/ MC-LR / DOS DOSIS DE VITAMINA E (200 Y 700 mg/kg dieta)/ SACRIFICIO A LAS 24 HORAS

El objeto de este experimento es ver la influencia de diferentes suplementos de vitamina E (200 mg vitamina E/kg dieta y 700 mg vitamina E*/kg dieta) administrados en la dieta frente a la actividad del tóxico.

A continuación se muestra un esquema (**Figura FM-4**) del planteamiento y ejecución de dicho ensayo en función de la exposición al tóxico (MC-LR) y de la dosis de vitE administrada:

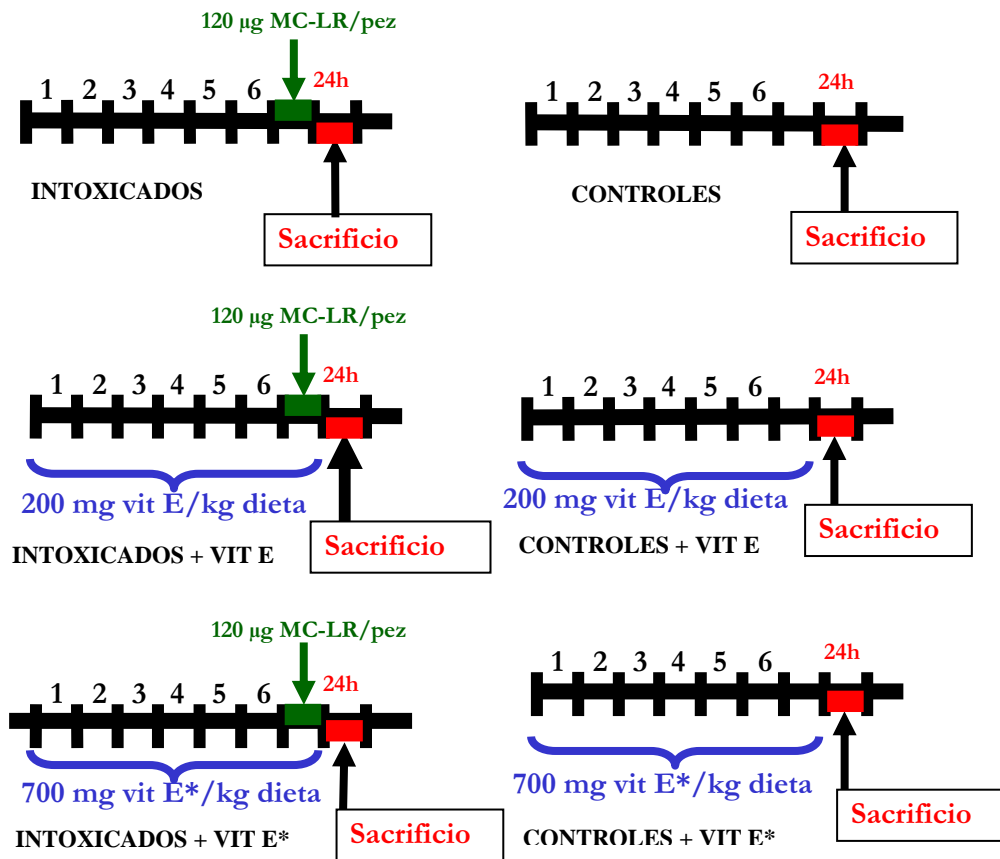


Figura FM-4: Esquema de la exposición oral aguda de tilapias a 120 µg MC-LR/pez en dosis única con suplemento de dos dosis diferentes de vitamina E (200 ó 700 mg/kg dieta).

Para facilitar la posterior exposición de los resultados, los diferentes grupos tratados se enumeran de la manera que sigue:

Periodo experimental	Nº Grupo experimental	Tratamiento
24 horas	1	Control
	2	Intoxicado
	3	Control-vitE
	4	Intoxicado-vitE
	5	Control-vitE*
	6	Intoxicado-vitE*

Tabla TM-1: Numeración de los diferentes grupos experimentales según el tipo de tratamiento con dos dosis diferentes de vitamina E (200 ó 700 mg/kg dieta). Vit E indica que la dosis utilizada fue 200 mg/kg dieta y vit E* 700 mg/kg dieta.

Los peces se dispusieron en 6 acuarios ($n=8$), tres para los peces control de cada tipo de tratamiento y otros tres para los peces intoxicados (MC-LR, MC-LR-vit E y MC-LR-vit E*) (**Figura FM-4**).

- Lote expuesto a MC-LR: los peces se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial para peces mezclado, mediante triturado manual con ayuda de un mortero y un pistilo y posterior sonicación, con la cantidad suficiente de liofilizado de células de cianobacterias (1.350 $\mu\text{g/g}$ MC-LR) para conseguir una dosis aproximada de 120 μg MC-LR /pez (HPLC). Fueron sacrificados a las 24 horas de la exposición.
- Lote expuesto a MC-LR-vit E (200 mg vitamina E/kg dieta): durante los 6 días previos a la administración de la toxina, los peces se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial y un suplemento de 0,06 mg vit E/pez/día para conseguir una dosis de 200 mg vit E/kg dieta. Al día siguiente de concluir este pretratamiento se les administró una dosis de toxina de

aproximadamente 120 µg MC-LR /pez (HPLC) junto con la dosis de vit E. Esta mezcla triturada se suministró a los peces en fracciones de pequeño tamaño. Éstos fueron sacrificados 24 horas después de la administración del tóxico.

- Lote expuesto a MC-LR-vit E* (700 mg vitamina E/kg dieta): durante los 6 días previos a la administración de la toxina, los peces se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial y un suplemento de 0,21 mg vit E/pez/día para conseguir una dosis de 700 mg vit E/kg dieta. Al día siguiente de concluir este pretratamiento se les administró una dosis de toxina de aproximadamente 120 µg MC-LR /pez (HPLC) junto con la dosis de vit E*. Esta mezcla triturada se suministró a los peces en fracciones de pequeño tamaño. Éstos fueron sacrificados 24 horas después de la administración del tóxico.
- Lotes control: cada uno de los lotes expuestos ha contado con su grupo control correspondiente, el cual ha sido sometido a las mismas condiciones experimentales y cuyos tratamientos fueron: sólo alimento para peces (0,3 g/día); 0,3 g/día de alimento para peces + 0,06 mg vit E/pez/día y 0,3 g/día de alimento para peces + 0,21 mg vit E/pez/día, respectivamente. Todos los peces de los grupos controles fueron sacrificados a las 24 horas de la intoxicación de su correspondiente grupo tratado.

El tiempo en el que se aseguró la ingesta completa del preparado por los peces en cada uno de los acuarios fue de una hora.

3. 4. 1. 5. EXPOSICIÓN AGUDA (DOSIS ÚNICA)/ VÍA ORAL (TRITURADO)/ MC-LR / UNA DOSIS DE VITAMINA E (700 mg/kg dieta)/ SACRIFICIO A LAS 24, 48 Y 72 HORAS

El objeto de este experimento fue ver la influencia del tiempo en el proceso de recuperación de los efectos adversos inducidos por la MC en los peces 24, 48 y 72 horas tras la exposición del tóxico y valorar la influencia que ejerce un suplemento de vit E administrada a una dosis previamente ensayada (700 mg vit E/kg dieta).

A continuación se muestra un esquema (**Figura FM-5**) del planteamiento y ejecución de dicho ensayo en función de los distintos periodos experimentales de la administración o no de un suplemento de vit E:

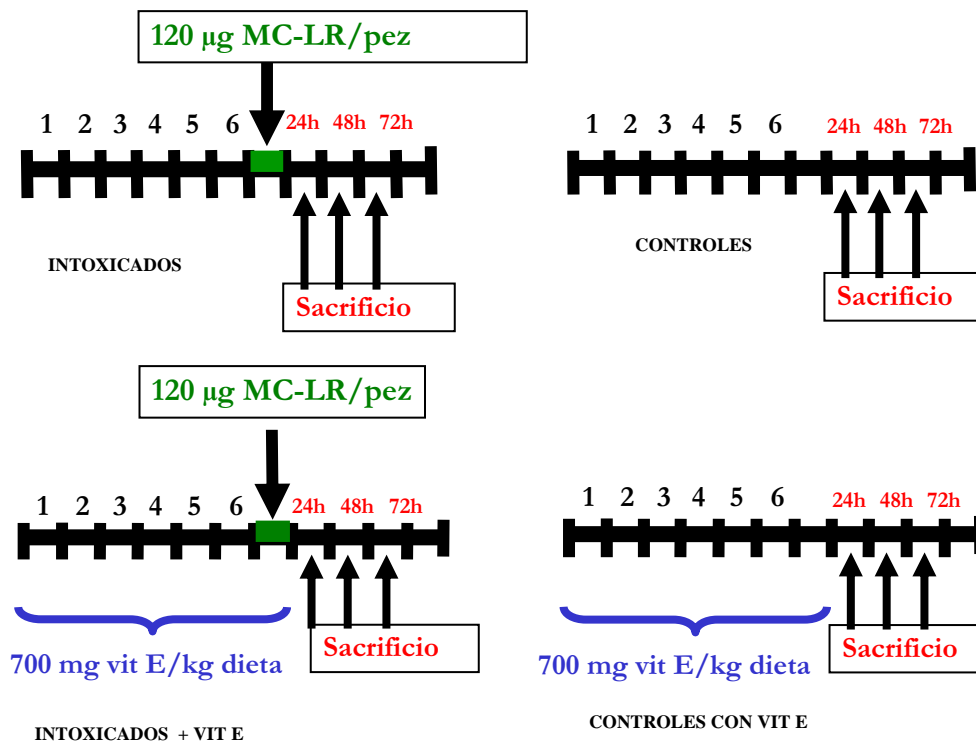


Figura FM-5: Esquema de la exposición oral aguda de tilapias a 120 µg MC-LR/pez en dosis única con suplemento de 700 mg de vitamina E/kg dieta y sacrificio tras 24, 48 y 72 horas.

Para facilitar la posterior exposición de los resultados, los diferentes grupos tratados se enumeran de la manera que sigue:

Periodo experimental	Nº Grupo experimental	Tratamiento
24 horas	1	Control
	2	Intoxicado
	3	Control-vitE
	4	Intoxicado-vitE
48 horas	5	Control
	6	Intoxicado
	7	Control-vitE
	8	Intoxicado-vitE
72 horas	9	Control
	10	Intoxicado
	11	Control-vitE
	12	Intoxicado-vitE

Tabla TM-2: Numeración de los diferentes grupos experimentales según el tipo de tratamiento y periodo experimental (24, 48 y 72 horas).

Los peces se dispusieron en 12 acuarios ($n=8$), seis acuarios para los peces control de cada tipo de tratamiento, y otros seis para los peces tratados (MC-LR, MC-LR-vit E).

- Tres lotes de peces expuestos a MC-LR y sacrificio a las 24, 48 y 72 horas respectivamente: los peces se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial para peces mezclado, mediante triturado manual con ayuda de un mortero y un pistilo y posterior sonicación, con la cantidad suficiente de liofilizado de células de cianobacterias (1.350 $\mu\text{g/g}$ MC-LR) para conseguir una dosis aproximada de 120 μg MC-LR /pez (HPLC). Éstos fueron sacrificados 24, 48 y 72 horas de la exposición al tóxico.

- Tres lotes de peces expuestos a MC-LR-vit E y sacrificio a las 24, 48 y 72 horas respectivamente; durante los 6 días previos a la administración de la toxina, los peces se alimentaron con 0,3 g/ día de un preparado comercial y un suplemento de 0,21 mg vit E/pez/día para conseguir una dosis de 700 mg vit E/kg dieta. Al día siguiente de concluir este pretratamiento se les administró una dosis de toxina de aproximadamente 120 µg MC-LR /pez (HPLC) junto con la dosis de vit E. Esta mezcla triturada se suministró a los peces en fracciones de pequeño tamaño. Éstos fueron sacrificados 24, 48 y 72 horas de la exposición al tóxico.

Cada uno de los lotes expuestos ha contado con su grupo control correspondiente, el cual ha sido sometido a las mismas condiciones experimentales y cuyos tratamientos fueron:

- Tres lotes control de los peces intoxicados, alimentados sólo con 0,3 g/día de una dieta para peces, sacrificados a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente.
- Tres lotes control de los peces intoxicados suplementados con vit E, alimentados con 0,3 g/día de una dieta para peces suplementada con 0,21 mg vit E/pez/día, sacrificados a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente.

El tiempo en el que se aseguró la ingesta completa del preparado por los peces en cada uno de los acuarios fue de una hora.

3. 4. 2. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES, RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez transcurrido el tiempo de duración de los diferentes ensayos se procedió al sacrificio de los peces y extracción de sus órganos.

Los peces fueron sacrificados anestesiándolos previamente con triclaína (Etil 3-aminobenzoato metanosulfonato), por sección en la espina dorsal. Para ello se extraen las tilapias de forma individual de los acuarios donde se ha realizado el ensayo, se pesan y se pasan a un acuario más pequeño con una cantidad suficiente de anestésico disuelto en función del peso del pez. Una vez anestesiados se procede a la extracción del hígado, riñón y branquias de cada pez. Los órganos se pesan y se introducen por separado en vasos de precipitado que contienen suero fisiológico (disolución de NaCl al 0,9% p/v) a una temperatura de 4°C, y se secan sobre papel de filtro para retirar el exceso de líquido. Tras esta operación y con ayuda de una pinza fina se limpian los segmentos de grasa adherida. Los órganos se envuelven en papel de aluminio rotulados previamente con su nombre y la fecha de obtención, se introducen en nitrógeno líquido y se conservan a una temperatura de -80°C hasta el momento de su utilización.

Procedimiento de homogeneización

Los tejidos fueron homogeneizados en frío con tampón TRIS (100 mM, pH 7,8; 1/10 peso/vol), utilizando el homogeneizador de tejidos Ultra - Turrax[®]. El proceso se llevó a cabo durante 3 minutos y 30 segundos, alternando períodos de 30 segundos de homogeneización con períodos de descanso de 15 segundos.

Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 4.000 rpm, durante 20 minutos a 4°C, con el objeto de obtener el sobrenadante post-mitocondrial. Éste fue alicuotado en tubos eppendorf que se conservaron a -80°C para una posterior determinación de la concentración de proteínas,

glutación reducido, glutatión oxidado, grupos carbonilos, distintas actividades enzimáticas y LPO.

3. 5. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Todas las determinaciones realizadas en este trabajo de investigación han sido puestas a punto en tejidos de peces, concretamente en hígado, riñón y branquias de tilapias (*Oreochromis* sp.), ya que nuestro equipo de investigación había trabajado anteriormente utilizando ratas como modelo experimental.

3. 5. 1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La determinación de la concentración de proteínas en los homogeneizados de tejidos es un paso previo a las determinaciones enzimáticas ya que es necesario expresar dichas actividades en función del contenido en mg de proteínas de cada tejido.

Fundamento teórico

Empleamos el método de Bradford (1976), utilizando los reactivos de la marca Bio-Rad[®], pues tiene la ventaja frente al método de Lowry y col. (1951) de ser muy sensible, rápido, de gran especificidad, precisión y reproducibilidad.

El fundamento del método se basa en la combinación del colorante azul brillante de Coomassie G-250 con las proteínas dando lugar a un complejo azul con elevado coeficiente de extinción que le confiere una elevada sensibilidad. La formación del complejo es rápida, se forma en menos de dos minutos y además queda disuelto aproximadamente durante una hora sin observarse precipitación.

Reactivos y disoluciones

- Reactivo Coomassie Brilliant Blue (CBB): Se diluye un volumen de reactivo Bio-Rad[®] en cuatro volúmenes de agua destilada. Se filtra a través de papel Whatman n° 1 y se deja en reposo a temperatura ambiente.
- Gammaglobulina bovina

Procedimiento

La determinación se realiza por calibración externa, interpolando los resultados de absorbancia de las muestras en una curva de calibrado preparada con γ -globulina.

Como muestra se toman directamente 5 μ L de una dilución 1/2 del homogeneizado de tejido (hepático, renal o branquias) y se llevan a 100 μ L con agua destilada.

Se mezclan 100 μ L de la disolución problema o estándar con 5 mL del reactivo Bio-Rad[®], se agita y se deja en reposo durante 15 minutos, con un límite de 50 minutos, y se procede a la lectura de las absorbancias a 595 nm en una cubeta de cristal.

Todas las determinaciones (estándares y muestras) se realizan por triplicado.

3. 5. 2. ESTADO DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (LPO)

Fundamento teórico

El método de diagnóstico más directo a la hora de valorar el estado de LPO en una muestra biológica sería la cuantificación de los hidroperóxidos formados en las etapas iniciales del proceso. Sin embargo, la

naturaleza especialmente lábil y poco estable de estos productos ha hecho que se recurra a métodos indirectos, esto es, al análisis de productos secundarios o finales derivados de su metabolismo o descomposición.

De la gran variedad de métodos existentes para evaluar la LPO (lo cual indica que no existe un método de elección sencillo) uno de los más utilizados es la cuantificación de malondialdehído (MDA) y otros productos de degradación por medio de su reacción con el ácido tiobarbitúrico (ATB).

Estos compuestos, en condiciones de bajo pH y temperatura elevada, participan fácilmente en una reacción de adición nucleofílica con el ATB, generando un pigmento rojo fluorescente el cual puede ser determinado mediante espectrofotometría visible o fluorescencia. Este método tiene la gran ventaja de que la cuantificación es muy sencilla. Sin embargo, presenta una serie de claros inconvenientes que hay que tener en cuenta a la hora de considerar la medida de ATB como índice de LPO: así, ni todos los lípidos producen estos compuestos cuando sufren peroxidación (Frankel y Net, 1983), ni se producen exclusivamente como resultado de la LPO (Janero, 1990). Por consiguiente, debemos considerar este método solamente como un indicador de la potencial existencia de daño peroxidativo sobre los lípidos celulares, y no como una medida de la LPO.

Hemos seguido el método descrito por Esterbauer y Cheeseman (1990), en el que el aducto formado por MDA y ATB se valora espectrofotométricamente a 532 nm.

Reactivos y Disoluciones

- Disolución de BHT al 1% en ácido acético glacial
- Dodecil sulfato sódico SDS al 8%
- Ácido acético al 20%, pH 3,5 con NaOH
- Disolución de ATB al 0,8% preparada extemporáneamente en H₂O milliQ (requiere calentamiento y agitación para su disolución)

- Butanol
- 1,1,3,3-tetraetoxipropano TEP

Procedimiento

Se debe trabajar con aproximadamente 1 mg proteico en un volumen de 0,5 mL del homogeneizado, lo cual equivale a diluir 1/20 los homogeneizados de hígado, 1/10 los de riñón y 1/20 los de branquias de acuerdo con los resultados obtenidos en la determinación de proteínas. Tras adicionar en el interior de tubos de vidrio, 0,5 mL del homogeneizado, se añaden 25 µL de una disolución de BHT al 1% en ácido acético glacial, 0,2 mL de SDS al 8%, 1 mL de ácido acético al 20% y 1 mL de una disolución al 0,8% de ATB.

La mezcla de reacción se incuba durante 30 minutos a 95°C. Una vez enfriados los tubos, se adicionan 3 mL de butanol para extraer el aducto de color rosa formado durante la reacción. Se cierran bien los tubos, se agitan vigorosamente y se centrifugan durante 10 minutos a 4.000 rpm para separar las dos fases. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se recoge la fase superior y se leen las absorbancias a 532 nm frente al blanco, constituido por 0,5 mL de agua milliQ tratado de manera análoga a las muestras.

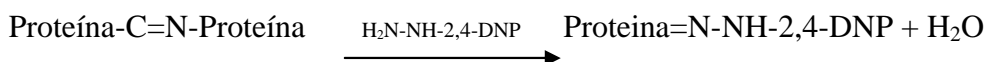
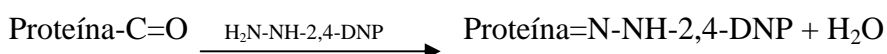
Los resultados de absorbancia se interpolan en una recta de calibrado preparada al efecto usando TEP como estándar.

Todas las muestras y disoluciones estándares se procesan por triplicado. Los resultados se expresan en nmol ATB/ g tejido.

3. 5. 3. OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS: CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS CARBONILOS

Fundamento teórico

El objeto de este método es medir la cantidad de grupos carbonilos resultado de la oxidación de las proteínas presentes en la muestra. La 2,4-dinitrofenilhidrazina reacciona con los grupos carbonilos de las proteínas formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, complejo coloreado que absorbe a una longitud de onda de 366 nm, de la siguiente forma:



Para la determinación de grupos carbonilos hemos seguido el método descrito por Levine y col., 1990.

Reactivos y Disoluciones

- Ácido acético-etanol 1:1
- Ácido tricloroacético 20%, en agua milliQ
- 2,4-dinitrofenilhidrazina DNPH 10 mM, en HCl 2M
- Guanidina 6 M, en agua-ácido fórmico 1:1

Procedimiento

En dos tubos eppendorf se alicuotan 30 y 60 µL del homogeneizado de la muestra (con una concentración aproximada de 5-10 mg/mL de proteínas), se le adicionan 500µL de DNPH 10 mM y se agitan cada 15 min durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añaden 500 µL de ácido tricloroacético al 20%, se agita y se centrifuga a 4.000 rpm durante 3 min. Se lava el precipitado 3 veces con ácido acético-etanol 1:1 y se le

añade 600 µL de guanidina 6 M. Tras agitar de nuevo todos los tubos se incuban a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Finalmente se mide la absorbancia del sobrenadante a 366 nm en una microcubeta de cuarzo.

A partir de la Ley de Lambert-Beer calculamos la concentración de los grupos carbonilos presentes en la muestra, usando un coeficiente de extinción molar (ϵ) de 22.000 M⁻¹cm⁻¹. El resultado se expresa en moles de grupos carbonilos/ mg proteínas.

Ley de Lambert-Beer: $A = \epsilon * C * L$

A absorbancia medida

ϵ coeficiente de extinción molar

C concentración de la muestra

L longitud de la cubeta (cm)

3. 5. 4. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE MARCADORES ENZIMÁTICOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Para hacer un estudio de la posible inducción de estrés oxidativo provocado por la acción de la MC, puras o procedentes de extractos de floraciones, en los órganos de tilapia estudiados (hígado, riñón y branquias) se valoran las actividades de las siguientes enzimas antioxidantes en los homogeneizados: Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutación Peroxidasa (GPx) y Glutación Reductasa (GR).

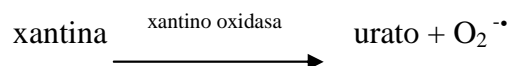
3.5.4. 1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOD

Fundamento teórico

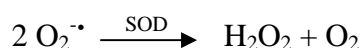
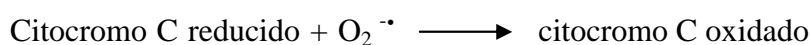
Se utiliza el método descrito por McCord y Fridovich (1969) que consiste en determinar la disminución de la oxidación del citocromo C, ya

que la SOD captura los radicales superóxido responsables de dicha oxidación.

Para medir la actividad de esta enzima, añadimos xantina como fuente de iones superóxidos, y xantino oxidasa para disparar la reacción:



La reacción medida es la siguiente:



En la determinación se añade cianuro (500 μM) para inhibir la citocromo oxidasa y las peroxidasas de la muestra, asegurando de esta forma que el citocromo oxidado que se detecte sea debido a su reacción con los radicales superóxido y no por generación enzimática, y que los radicales superóxido sean los generados por la xantina/xantino oxidasa únicamente (no los generados por la actividad enzimática de la muestra).

Reactivos y Disoluciones:

- Tampón SOD: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 50 mM y EDTA 0,1 mM, pH final 7,8 con KOH.
- Disolución de Xantina 50 μM en tampón SOD.
- Disolución de Citocromo C 10 μM en tampón SOD. Protegerla de la luz.
- Cianuro potásico 20 mM en tampón SOD.
- Cianuro 500 Mm en tampón SOD.
- Xantino oxidasa 2,5 U /mL en tampón SOD. Extemporáneo.

Procedimiento:

Los homogeneizados se diluyen para obtener una concentración de proteínas de 2 mg/mL. Tras ensayos previos en el laboratorio, se determina que la dilución sea 1/5 en hígado, riñón y branquias de peces.

Para poder determinar la actividad SOD, hay que hacer una prueba previa, para obtener la máxima actividad SOD posible, empleando para ello muestras a las que no vamos a añadir extracto. Se añade en una microcubeta de plástico que actuará como de referencia: 510 μ L de tampón SOD, 190 μ L de agua milliQ, 100 μ L de xantina, 100 μ L de cianuro potásico 500 mM y 100 μ L de citocromo C. Se realiza el mismo procedimiento en otra microcubeta pero añadiendo 180 μ L de agua, y ambas se introducen posteriormente en el espectrofotómetro con el objeto de hacer el autocero.

Posteriormente se dispara la reacción en la segunda cubeta añadiéndole 10 μ L de xantina oxidasa y se mide la cinética a 550 nm cada 20 segundos, durante un periodo de tiempo total de 200 segundos.

Una vez obtenida la actividad SOD máxima (la referencia), se realiza el ensayo sobre las muestras. Para ello, se añaden en una microcubeta que actuará como blanco, 510 μ L de tampón SOD, 140 μ L de agua milliQ, 100 μ L de xantina, 100 μ L de cianuro potásico 50 mM, 100 μ L de citocromo C y 50 μ L de la muestra. Se repite la operación en otra microcubeta (con 130 μ L de agua en lugar de 140 μ L) y ambas se introducen posteriormente en el espectrofotómetro con el objeto de hacer el autocero. Posteriormente se dispara la reacción en la segunda cubeta añadiéndole 10 μ L de xantina oxidasa y se mide según la forma descrita anteriormente.

El cálculo de la actividad SOD se realiza la forma siguiente:

Δ Amin (0-60) Referencia-----100%

Δ Amin Muestra-----x

$100-x = y$ (actividad SOD)

$y / 50 = z$

$z / b \cdot 10^{-3} = \text{resultados U/mg proteínas}$

mg /mL Bradford /dilución = a mg /mL = a μ g / μ L

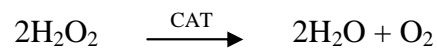
a μ g / μ L x 50 = b μ g

Siendo las mU los nmoles de citocromo que no son oxidados durante un min de reacción.

3. 5.4. 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CAT

Fundamento teórico:

Se utiliza el método descrito por Beers y Sizer (1952) que consiste en determinar la desaparición de H₂O₂ a 240 nm.



Reactivos y Disoluciones:

- Tampón CAT: PO₄H₂K 0,5M, pH 7 con KOH
- Peróxido de hidrógeno 10 mM.

Procedimiento:

Hay que trabajar aproximadamente con 50-100 µg de proteínas por lo que las diluciones que se van a utilizar son de 1/60 para los homogeneizados de hígado, 1/20 para los de riñón y 1/2 para los de branquias de peces.

En una cubeta de cuarzo añadimos 300 µL de tampón fosfato, 2070 µL de agua milliQ y 30 µL de extracto y el valor de absorbancia que obtendremos al medir frente al aire a 240 nm se ajustará como cero. Posteriormente añadimos 600 µL de peróxido de hidrógeno en la propia cubeta y medimos la cinética a intervalos de 20 segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

El cálculo de la actividad CAT se realiza mediante la siguiente fórmula:

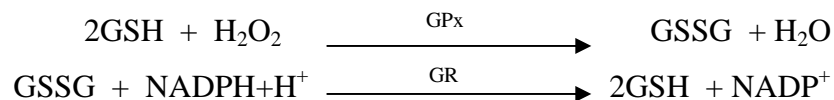
$$\text{mU /mg} = [(\Delta\text{Amin} \times 1\text{mL} \times 10^3) / (23 \times \text{mL muestra} \times \text{mg /mL})] \times \text{Dil}$$

Siendo las mU los nmoles de H₂O₂ consumidos durante un min de reacción.

3. 5.4. 3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GPx

Fundamento

Se utiliza el método descrito por Lawrence y Burk (1976) que consiste en determinar la desaparición del H₂O₂ a 340 nm acoplado las siguientes reacciones:



Reactivos y disoluciones

- Tampón GPx: PO₄H₂K 50 mM, EDTA 1 mM y Azida sódica 1 mM, pH 7,5 con KOH.
- Disolución de GSH 1 mM en tampón GPx.
- Disolución de GR 1 U/mL en tampón GPx.
- Disolución de H₂O₂ 0,25 mM.
- Disolución de NADPH 0,1 mM en bicarbonato potásico al 0,75%.

Procedimiento

Se debe trabajar aproximadamente con 50-100 µg de proteínas por lo que las diluciones que vamos a utilizar son: 1/3 para los homogeneizados de hígado, 1/6 para los de riñón y 1/9 para los de branquias.

En una microcubeta de plástico se añaden 600 µL de tampón GPx, 100 µL de NADPH, 100 µL de GSH, 152 µL de agua, 8 µL de GR y 40 µL de extracto, constituyendo el blanco frente al cual se realizará la medida. Se procede de igual forma en la microcubeta problema (con 52 µL en lugar de 152 µL) y ambas se introducen en el espectrofotómetro con el objeto de hacer el autocero. Posteriormente se dispara la reacción en la segunda microcubeta añadiéndole 100 µL de H₂O₂ y se mide la cinética cada veinte segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

El cálculo de la actividad GPx se realiza mediante la siguiente fórmula:

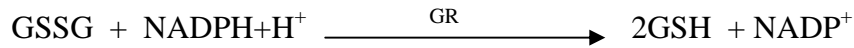
$$\text{mU /mg} = [(\Delta\text{Amin} \times 1 \times 10^3) / (6,22 \times 1 \times \text{Proteínas (mg /mL)} \times 0,04)] \times \text{Dil}$$

Siendo las mU los nmoles de NADPH consumidos durante un min de reacción.

3. 5. 4. 4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GR

Fundamento

Se utiliza el método descrito por Calberg y Mannervik (1975) que consiste en determinar la desaparición de GSSG a 340 nm:



Reactivos y disoluciones

- Tampón GR: PO₄H₂K 100 mM, EDTA 0,5 mM y KCl 200 mM, pH 7,5 con KOH.
- Disolución de NADPH 0,1mM en 5 mL de bicarbonato potásico al 0,75%.
- Disolución de GSSG 1mM en tampón GR.

Procedimiento

Tenemos que trabajar aproximadamente con 50-100 µg de proteínas, por lo que las diluciones que vamos a utilizar son 1/6 para los homogeneizados de hígado, 1/9 para los de riñón y 1/3 para los de branquias.

En una microcubeta de plástico se añaden 600 µL de tampón GR, 100 µL de NADPH, 200 µL de agua y 100 µL de extracto que será el blanco frente al cual se hará la medida. Ello se repite en otra microcubeta (con 100 µL de agua y no 200 µL), y ambas se incuban a 37°C durante unos 10 minutos. Se introducen posteriormente en el espectrofotómetro con el objeto de hacer el autocero. Se dispara la reacción en la segunda cubeta añadiéndole 100 µL de GSSG y se mide la cinética cada veinte segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

El cálculo de la actividad GR se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mU /mg} = [(\Delta\text{Amin} \times 1 \times 10^3) / (6,22 \times 1 \times \text{Proteínas (mg /mL)} \times 0,1)] \times \text{Dil}$$

Siendo las mU los nmoles de NADPH consumidos durante un min de reacción.

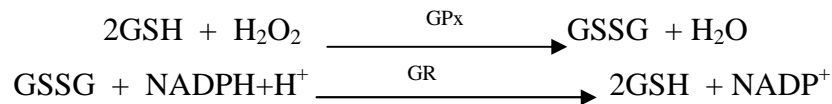
3. 5. 5. DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS: GLUTATIÓN (KIT GSH/GSSG)

Fundamento teórico

El glutatión reducido (GSH), tripéptido con un grupo tiol libre, es el mayor antioxidante existente en los tejidos de vertebrados. Actúa reduciendo el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los hidroperóxidos lipídicos, mediante una reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (GPx), a agua (H₂O) y a sus respectivos alcoholes. En este proceso el GSH se convierte en glutatión oxidado (GSSG) el cual será de nuevo transformado en GSH por la enzima glutatión reductasa (GR) con la ayuda de una molécula de NADPH.

En células de animales con un alto índice de estrés oxidativo la relación GSH/GSSG disminuye como consecuencia de una acumulación de GSSG. Las medidas del nivel de GSH, GSSG y GSH/GSSG son indicativas del estrés oxidativo al que está sometido un tejido. Además, la principal función del GSH es su participación en los procesos de detoxificación celular que tienen lugar fundamentalmente en el hígado.

Debido a que las MC tienen organotropidad por el hígado y que éste es el mayor órgano detoxicante, será en este tejido donde se reflejen con mayor intensidad las alteraciones en estos biomarcadores por lo que la determinación de este parámetro se realizó sólo en hígado de peces.



Reactivos y Disoluciones

- Kit BIOXYTECH® GSH/ GSSG-412™ Oxis Research™

El kit está compuesto por:

- 1-metil-2-vinilpiridinatri fluorometanosulfonato M₂VP (escavenger)
 - Disolución patrón de 0,00 μM GSSG
 - Disolución patrón de 0,05 μM GSSG
 - Disolución patrón de 0,125 μM GSSG
 - Disolución patrón de 0,25 μM GSSG
 - Disolución patrón de 0,75 μM GSSG
 - Disolución patrón de 1,50 μM GSSG
 - Tampón GSSG
 - Tampón de ensayo
 - Enzima GR
 - Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico DNTB (cromógeno)
 - Disolución de NADPH
 - Ácido meta-fosfórico 5 % (MPA)
 - Blanco
- 50 μl MPA 5 % + 700 μl GSSG buffer

Procedimiento para la medida de GSH:

En tubos eppendorf se alicuotan 50 μL del homogeneizado (dilución 1/10) y 350 μL de MPA al 5%. Se agita con el vortex 15-20 segundos. Se centrifuga a 300 rpm, 10 min a 4°C y se toman 50 μL del sobrenadante que se mezclan con 3 mL del tampón de ensayo.

En una microcubeta de plástico se añaden:

200 μL de la disolución patrón, del blanco o de la muestra

200 μ L de DTNB

200 μ L de GR

Se incubaba 5 min a temperatura ambiente, se hace el cero en el espectrofotómetro, se añaden 200 μ L de NADPH para disparar la reacción y se mide a 412 nm cada 20 segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

Todas las medidas se hacen por duplicado. Los valores de absorbancia de cada muestra se interpolan en una recta patrón GSH y se multiplica el valor por el factor de dilución, obteniéndose los μ M de GSH. El resultado se expresa en nmoles GSH/g tejido.

3. 5. 6. DETERMINACIÓN DE MC-LR (KIT ELISA)

Fundamento teórico

El objetivo de este método es la cuantificación (valor semicuantitativo) de las toxinas (MC-LR) presentes en muestras de pescado. El ensayo contiene anticuerpos policlonales que se ligan específicamente tanto a moléculas de Microcistinas (muestra) como a moléculas de conjugado Microcistinas-enzima peroxidasa (disolución de conjugado). Los anticuerpos están inmovilizados en las paredes de los pocillos de una microplaca. Las moléculas de MC presentes en la muestra compiten con el conjugado por un número limitado de anticuerpos. El número de anticuerpos en cada pocillo es el mismo por lo que cada uno de ellos recibe una misma cantidad de conjugado; una concentración baja de MC en la muestra dará lugar a un alto índice de unión del conjugado a los anticuerpos. Este índice de unión es lo que se mide colorimétricamente en un lector de microplacas, siendo la coloración inversamente proporcional a la concentración de MC en la muestra.

Reactivos y Disoluciones

- Kit de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), conjunto Envirogard Microcystin Plate Kit. (**Figura FM-6**)

El Kit está compuesto por:

- microplaca de 96 pocillos.
- Disolución patrón de 0,1µg MC-LR/L
- Disolución patrón de 0,4 µg MC-LR /L
- Disolución patrón de 1,6 µg MC-LR /L
- Disolución control negativo
- Disolución de conjugado
- Disolución sustrato
- Disolución de finalización de reacción (Stop), HCl 0,1 N



Figura FM-6: Reactivos del Kit de ELISA para MC

Procedimiento

Extracción de MC intracelulares a partir de muestras de pescado

Previamente a la determinación de las MC con el test de ELISA, extraemos las MC presentes en órganos de pescado (hígado) siguiendo el método de Moreno y col., 2005c. La finalidad de la extracción es purificar y

concentrar las toxinas presentes en la muestra para así poderlas detectar y cuantificar mejor.

El órgano se extrae con metanol al 85%, llevándose a cabo por duplicado. El extracto seco de la muestra se redisuelve en 250 μL de metanol puro, se evapora a sequedad con una fuente de gas nitrógeno a 25°C y se resuspende en 250 μL de fosfato buffer salino (PBS) 0,2 M al 15% de metanol (medio tamponado para determinaciones con anticuerpos).

Reactivos y Disoluciones:

Metanol de máxima pureza, Merck (106007)

Agua MilliQ

Test ELISA

Una vez finalizado el procedimiento de extracción procedemos a la determinación y cuantificación de MC presentes en las muestras mediante el test de ELISA que se lleva a cabo según el procedimiento recomendado por el fabricante.

Los extractos de las muestras están resuspendidas en 250 μL de metanol al 15% hecho con PBS 0,2 M de los que se pipetea 100 μl en cada pocillo de la microplaca, junto con 100 μl de cada una de las disoluciones patrones (control negativo, 0,1; 0,4 y 1,6 $\mu\text{g/L}$ de MC). Todas las determinaciones se realizan por duplicado. Se cubre con papel de aluminio y se deja incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Pasado este tiempo, se retira el papel que lo cubre y se pipetea 100 μL de disolución del conjugado en cada pocillo incluidos los que tienen las disoluciones patrones. Se vuelve a cubrir, se agita con cuidado y se deja otros 30 minutos a incubar.

Tras esta segunda incubación, los pocillos se vacían, con cuidado de no mezclar los contenidos de unos y otros y se lavan unas cuatro veces con 100 μ L de agua milliQ.

Se añaden 100 μ L de sustrato en todos los pocillos, se tapa y agita y se vuelve a dejar 30 minutos de reposo. Se adicionan 100 μ L de la disolución de finalización de la reacción a todos los pocillos y se agita. Tras 30 minutos se lee la densidad óptica en el lector de microplacas a 450nm.

Tras la lectura se calculan las densidades ópticas (D.O.) de los dos pocillos de cada patrón y de cada muestra. Se calcula el coeficiente de variación (%CV) de cada muestra y de cada patrón, que no deben ser superiores al 15%:

$$\%CV=(\text{desviación estándar de la disolución patrón}/\text{media})\cdot 100$$

Ahora se calcula la %B_O de cada patrón y de cada muestra:

$$\%B_O=(D.O. \text{ media de la muestra}/D.O.\text{media del control negativo})\cdot 100$$

Para el control negativo: %B_O = 100

El cálculo de %B_O se utiliza para igualar las diferentes formas de hacer un ensayo. Mientras que las lecturas de las D.O. de los controles negativos, patrones y muestras suelen diferir de un ensayo a otro, la relación del %B_O entre los patrones y las muestras y el control negativo, permanecen constantes.

En un gráfico semilogarítmico se representa la %B_O de cada patrón frente a sus concentraciones de MC. La concentración de MC de las muestras se determina haciendo la correspondencia entre sus %B_O y las respectivas concentraciones en el gráfico.

La interpolación de las concentraciones de las muestras sólo es válida si los valores de %B_O están dentro del intervalo de valores de %B_O de los patrones. Si %B_O de las muestras es inferior, es necesario diluir la muestra de forma que los valores queden dentro del intervalo, multiplicando el resultado final por el factor de dilución correspondiente.

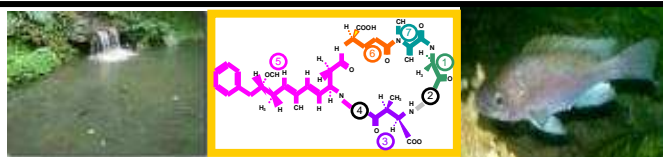
De esta forma se cuantifican las MC totales en las muestras de pescado, concretamente en muestras de hígado de tilapias. Los resultados se expresan como µg MC-LR/g de órgano.

3. 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos individuales de absorbancia de cada una de las medidas se transforman en unidades de actividades enzimáticas o en las de cantidades de sustrato mediante el uso de hojas de cálculo (Excel).

La significación estadística de los resultados obtenidos en los distintos parámetros estudiados, expresados como media ± error estándar (S.E.) se evaluó mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguida del test de comparación múltiple de Tukey realizados con el paquete estadístico INSTAT de Graph Pad™. Las diferencias entre los lotes de experimentación fueron consideradas significativas a partir de un nivel de probabilidad del 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Una vez realizados los experimentos descritos anteriormente, procedemos a describir y discutir los resultados obtenidos en función de los objetivos propuestos y de las distintas variables experimentales.

Para hacer más ágil la lectura del trabajo presentado, los resultados obtenidos más sobresalientes se discuten siguiendo el siguiente esquema:

- 1- En primer lugar se recogen y discuten los datos referentes a la posible inducción de estrés oxidativo en tilapias por la exposición subcrónica a células de cianobacterias. Se exponen resultados relativos a las alteraciones provocadas por la administración oral de dosis repetidas de MC en función de dos posibles tiempos de exposición (14 y 21 días) y teniendo en cuenta el posible efecto de la forma de administración junto con la dieta (triturado o no triturado).
- 2- En segundo lugar se discuten los resultados referentes a la acción aguda de distintos congéneres de microcistinas, MC-LR y MC-RR, por vía intraperitoneal, sobre el sistema de defensa antioxidante y niveles de LPO de tilapias expuestas.
- 3- Posteriormente se discuten los resultados correspondientes a la posible influencia del tiempo de acción de las MC sobre la alteración del sistema oxidativo de las tilapias expuestas de forma aguda a una sola dosis de células de cianobacterias.
- 4- En cuarto lugar serán tratados los resultados que aportan información acerca del posible papel protector de la vit E sobre biomarcadores de estrés oxidativo alterados por MC intentando clarificar si existe relación dosis-efecto protector.
- 5- Finalmente se discuten los resultados correspondientes a posibles variaciones en función del tiempo del efecto protector de una determinada dosis de vit E sobre la alteración de los biomarcadores de estrés oxidativo, LPO y oxidación de proteínas inducido por MC.

4.1. EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA DURANTE 14 Y 21 DÍAS/ VÍA ORAL (TRITURADO Y NO TRITURADO)/ MC-LR

Los resultados obtenidos en peces tratados con liofilizados de cianobacterias que contienen MC-LR (dosis de 60 µg de MC-LR/pez/día) durante distintos tiempos de exposición (14 y 21 días) y proponiendo durante los 21 días, dos formas diferentes de administración oral (células trituradas con la comida y sin triturar) se describen a continuación.

❖ 4.1.1. Características generales de los peces

No se observó mortalidad en los peces durante el transcurso del experimento.

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los pesos relativos de los órganos estudiados de los peces tratados con respecto a los del grupo control. Sin embargo, sí se mostró una disminución significativa del contenido en proteínas tanto en hígado como en branquias de los peces tratados con MC con respecto a los del grupo control. (**Tabla TR-1**).

Resultados y Discusión

ÓRGANO	CONTROL	14 DÍAS	21 DÍAS-TRITURADO	21 DÍAS- SIN TRITURAR
Hígado g/10 g peso corporal mg prot/g hígado	0,086±0,010 116,56±42,59	0,099±0,015 105,41±26,55	0,097±0,019 39,73±12,82***	0,105±0,023 48,23±7,19***
Riñón g/10 g peso corporal mg prot/g riñón	0,018±0,002 140,25±26,11	0,018±0,003 138,57±6,80	0,021±0,006 138,30±21,00	0,016±0,006 140,80±23,33
Branquias g/10 g peso corporal mg prot/g branquias	0,293±0,050 0,30±0,01	0,311±0,030 0,25±0,02***	0,300±0,040 0,18±0,02***	0,320±0,020 0,20±0,02***

Tabla TR-1: Características generales de los peces control y de los expuestos al liofilizado de células de cianobacterias (60 µg de MC-LR/pez/día) por vía oral durante 14 y 21 días. Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). El nivel de significación observado ha sido *** $p < 0,001$ del grupo intoxicado comparado con el grupo control.

❖ *4.1.2. Medida de la LPO*

Durante el período de exposición de 14 días no se observaron cambios significativos en los niveles de LPO en los órganos estudiados (hígado, riñón y branquias) de los peces intoxicados con respecto a los del grupo control (**Figura FR-1**). No obstante, sí se produjo un incremento significativo de este biomarcador en hígado ($p<0,01$), riñón ($p<0,01$) y branquias ($p<0,05$) de los peces sometidos a un mayor tiempo de exposición (21 días) y cuya forma de administración oral fue mediante células de cianobacterias trituradas.

El hígado fue el órgano más afectado cuando el liofilizado se administró de forma triturada. La inducción de LPO fue también evidente en los homogeneizados de riñón de peces expuestos durante 21 días a las células de cianobacterias no trituradas (**Figura FR-1**).

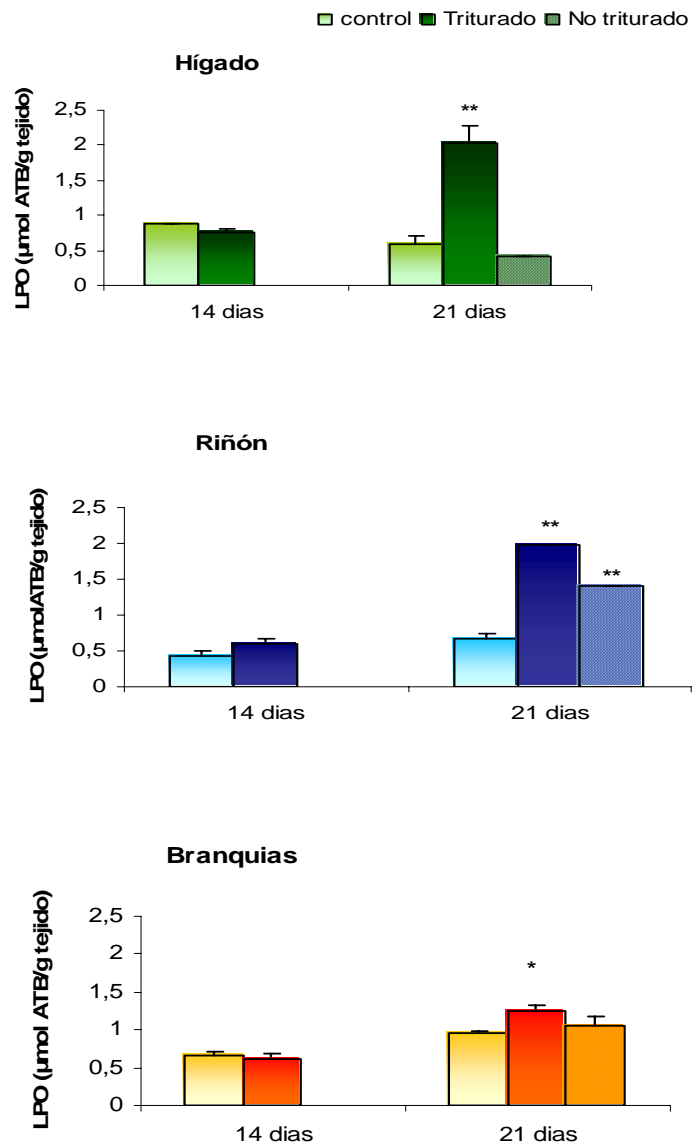


Figura FR-1: Valores de LPO ($\mu\text{mol ATB/g tejido}$) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, $60 \mu\text{g/pez/ día}$) para dos formas de administración oral: triturado y no triturado. Los valores son expresados como la media \pm S.E. ($n=8$). Los niveles de significación observados han sido $*p<0,05$ y $**p<0,01$ del grupo intoxicado comparado con su grupo control.

❖ **4.1.3. Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR**

La actividad **SOD** no mostró cambios significativos en hígado, riñón y branquias de peces expuestos a floraciones de cianobacterias durante 14 días. Un mayor periodo de exposición (21 días) produjo un aumento significativo de la actividad SOD en hígado ($p < 0,01$) para ambas formas de alimentación oral, y en branquias ($p < 0,05$) para la forma no triturada. Sin embargo, el aumento de actividad de esta enzima en riñón no fue significativo. (**Figura FR-2**)

No se observaron cambios significativos en la actividad **CAT** en hígado y riñón después de 14 días de exposición; sin embargo, a los 21 días de exposición su actividad aumentó 2,5 veces en estos mismos órganos ($p < 0,01$ en hígado y $p < 0,05$ en riñón), siendo el efecto producido similar para ambas formas de dietas. El nivel basal de actividad en branquias es inferior respecto a los otros dos órganos estudiados y además, no se incrementó en ninguno de los periodos de exposición (**Figura FR-3**).

La actividad de la enzima **GP_x** tras un corto periodo de exposición (14 días) fue similar a los valores obtenidos en peces control, aunque se produjo un incremento importante de la misma tras el periodo de exposición de 21 días en hígado ($p < 0,01$ para la forma triturada; $p < 0,05$ para la no triturada) y riñón ($p < 0,05$ para ambas formas de alimentación). En branquias se observó un importante descenso de su actividad ($p < 0,01$) para ambas formas de dieta (**Figura FR-4**).

Los cambios en la actividad de **GR** fueron similares a los observados en el anterior biomarcador. Para un corto periodo de exposición (14 días) no se muestran cambios significativos. Tras 21 días de exposición, la actividad aumentó significativamente en hígado ($p < 0,01$ para la forma triturada;

p<0,05 para la no triturada) y en riñón (p<0,01 para ambas formas de alimentación). En branquias no se muestran cambios significativos en la actividad de dicha enzima (**Figura FR-5**).

En general, podemos observar que en hígado los cambios producidos en las actividades GP_X y GR han sido más pronunciados cuando la administración de las células de cianobacterias fue triturada conjuntamente con el preparado comercial.

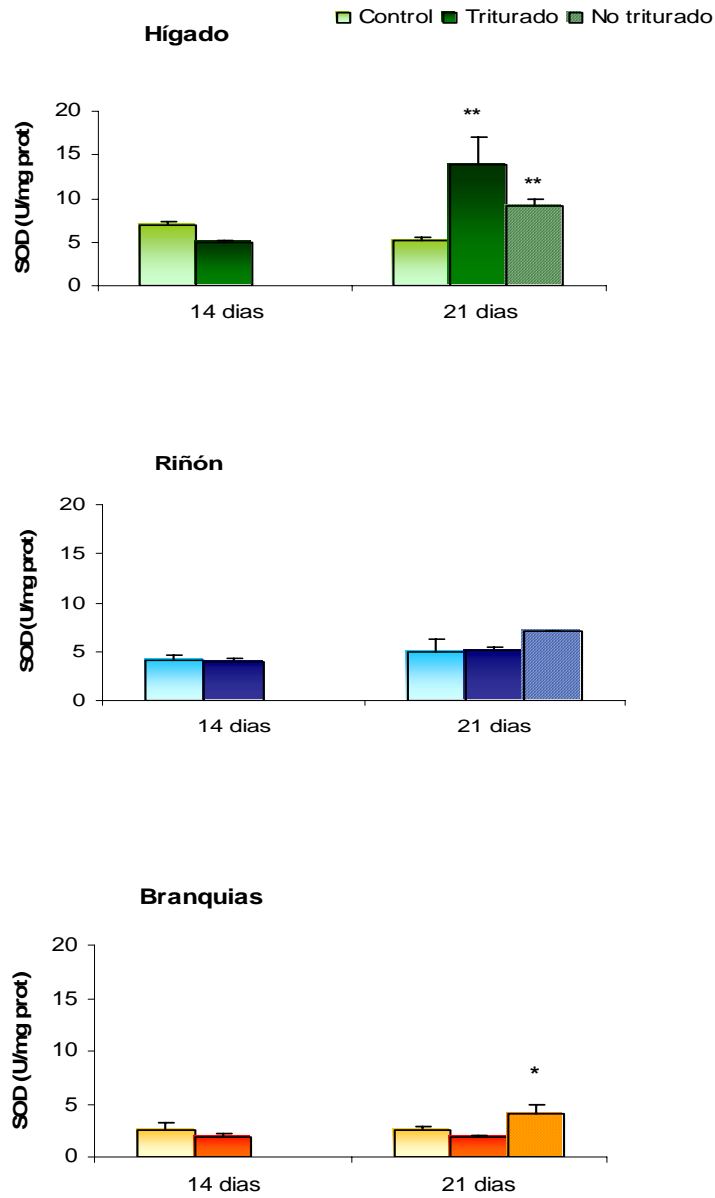


Figura FR-2: Valores de la actividad SOD (U/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 60 µg/ pez/ día) para dos formas de administración oral: triturada y no triturada. Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido *p<0,05 y **p<0,01 del grupo intoxicado comparado con su grupo control.

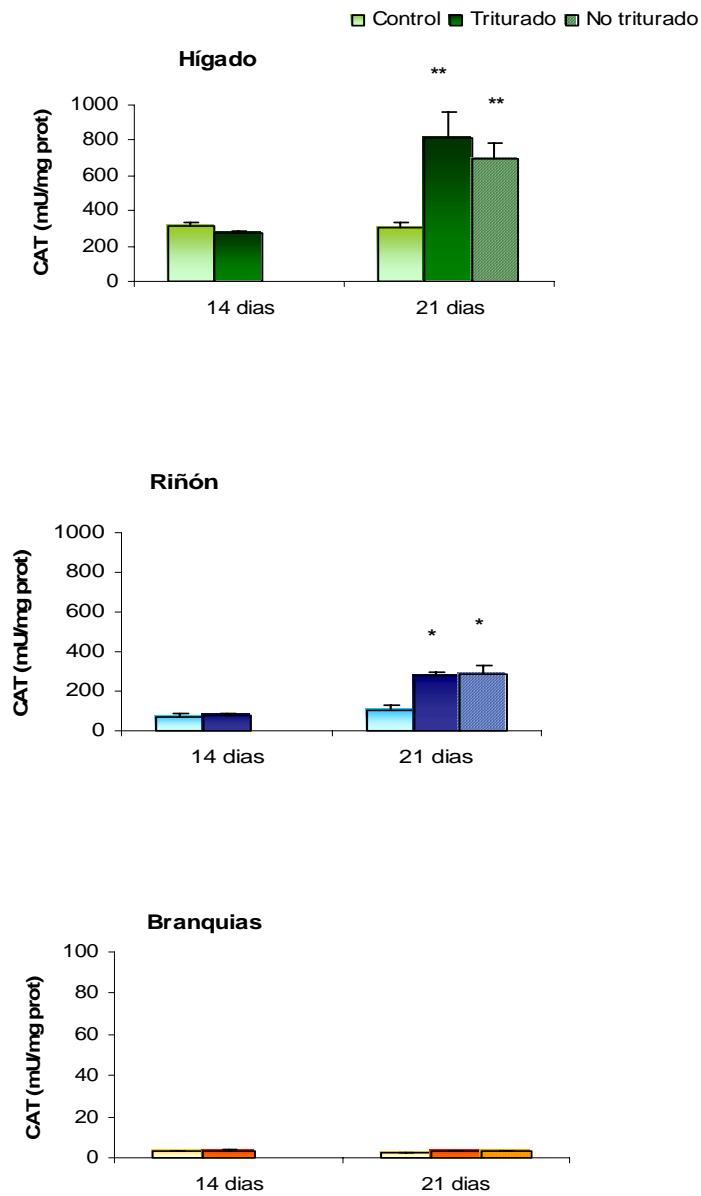


Figura FR-3: Valores de la actividad CAT (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 60 $\mu\text{g/pez/día}$) para dos formas de administración oral: triturado y no triturado. Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ del grupo intoxicado comparado con su control.

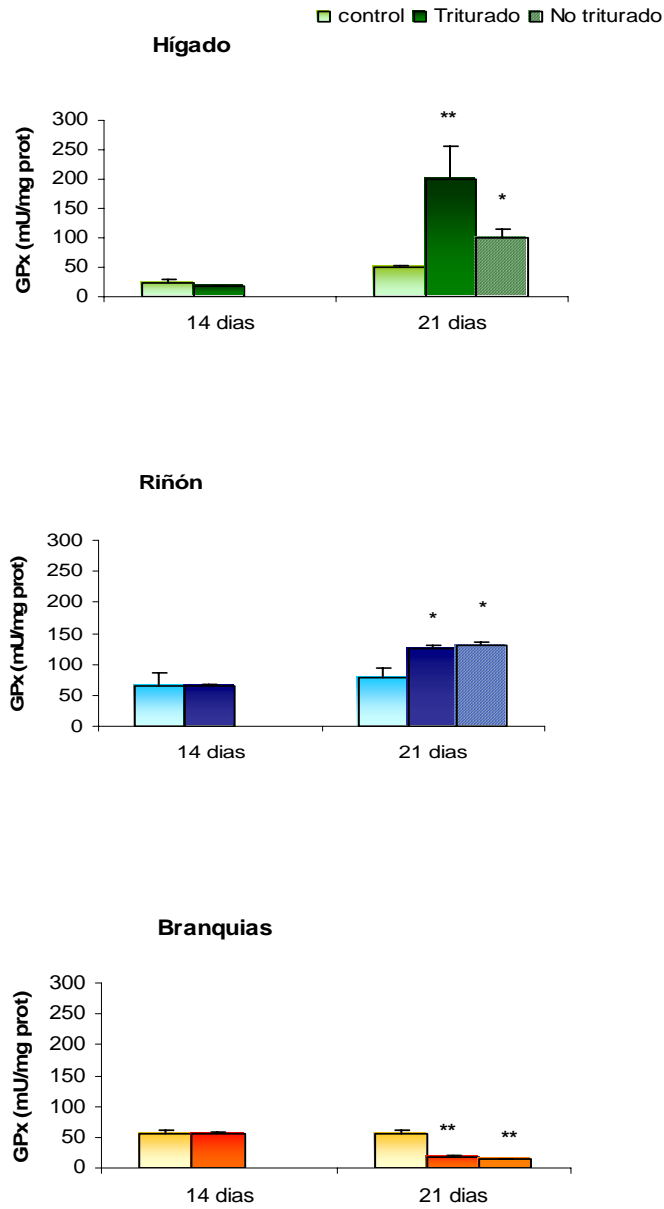


Figura ER-4: Valores de la actividad GPx (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR 60 $\mu\text{g}/\text{pez}/\text{día}$) para dos formas de administración oral: triturado y no triturado. Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ del grupo intoxicado comparado con los valores de su grupo control.

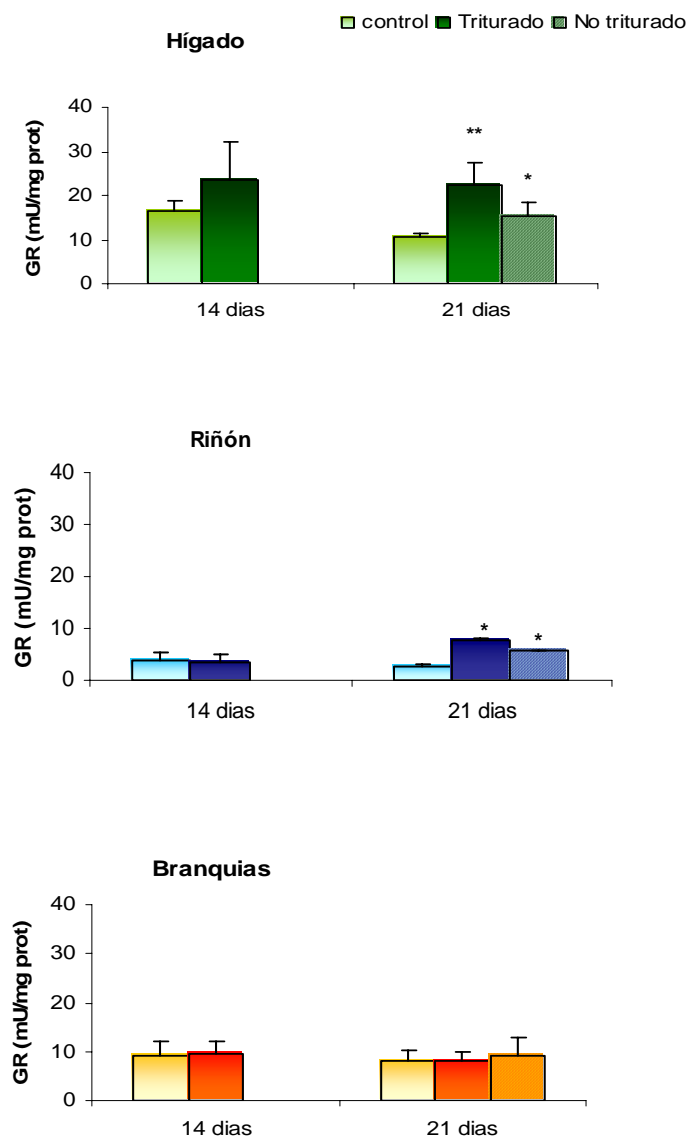


Figura FR-5: Valores de la actividad GR en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR 60 $\mu\text{g}/\text{pez}/\text{día}$) para dos formas de administración oral: triturado y no triturado. Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los valores de GR se expresan en mU/mg proteína. Los niveles de significación observados han sido * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ del grupo intoxicado comparado con los valores de su grupo control.

❖ *4.1.4. Discusión de los resultados:*

De la aparición y detección de floraciones de cianobacterias tóxicas en todo el mundo, surge la necesidad de realizar procedimientos de valoración del riesgo de contaminación mediante la monitorización de MC no sólo en aguas sino también en peces, y la propia evaluación de la toxicidad de las mismas, siendo el estrés oxidativo uno de los posibles mecanismos de acción tóxica.

La mayoría de las investigaciones realizadas con MC se han centrado en la toxicidad aguda en mamíferos de laboratorio tratados en concreto con MC-LR. Las floraciones tóxicas están asociadas asimismo con mortalidad de peces (Zimba y col., 2001). Estudios histopatológicos en peces han demostrado necrosis, degeneración hepática y renal; además, autores como Carbis y col., (1997) también han demostrado daños en branquias, al igual que lo hizo nuestro propio equipo de investigación (Molina y col., 2005).

Son más escasos los estudios de exposición oral a MC en peces, a pesar de que las cianobacterias juegan un papel importante en la dieta de algunos cíclidos y ciprínidos tropicales (Bowen, 1982; Spataru y Gophen, 1985). En peces se ha observado una menor sensibilidad a la toxicidad por MC que en mamíferos, con valores de DL₅₀ normalmente > 500 µg/kg de pez, mientras que en mamíferos eran considerablemente más bajos (~50 µg/kg) (Zurawell y col., 2005).

Asimismo son también escasos los estudios realizados sobre la toxicidad oral subcrónica de MC en peces bajo condiciones de laboratorio. Así, Soares y col. (2004) observaron acumulación de MC en hígado y musculo de tilapias (*Tilapia rendalli*) expuestas durante diferentes periodos

de tiempo a células tóxicas de *Microcystis aeruginosa* (28, 30 y 42 días) y Li y col., (2003) demostraron un aumento de la inhibición del crecimiento y daños graves en hepatocitos de carpas tratadas con MC durante 28 días. En ambos estudios se administraron las toxinas por vía oral de forma similar a la que aquí se describe. No obstante, este estudio que se presenta es pionero en la valoración del estrés oxidativo inducido por MC.

Realmente son necesarias investigaciones acerca de la inducción de estrés oxidativo por MC en peces, pues la mayoría de los estudios se han centrado en aspectos histopatológicos. Bury y col., (1996a) estudiaron las respuestas de estrés en la trucha marrón (*Salmo trutta* L.) expuestas a *Microcystis aeruginosa*. Analizaron plasma, cortisol, glucosa y niveles de iones (Na^+ y Cl^-), concluyendo que los peces tenían una respuesta clásica de estrés. Li y col., (2003) estudiaron las respuestas del sistema antioxidante en hepatocitos de carpa común, expuestos a MC-LR. Comprobaron que las actividades SOD, CAT y GPx aumentaban, y concluyeron que los mecanismos de toxicidad de MC-LR en hepatocitos de peces y hepatocitos de ratón eran similares. Otros autores, en cambio, han observado que las lesiones producidas en hígado y riñón de peces expuestos a MC-LR eran considerablemente diferentes a las previamente observadas en mamíferos (Kotak y col., 1996).

Este estudio llevado a cabo mediante alimentación oral, durante 14 y 21 días, revela que la toxina MC-LR proveniente de floraciones de cianobacterias tóxicas naturales, ha inducido estrés oxidativo en tilapias (*Oreochromis* sp.) expuestas de forma subcrónica, a dosis repetidas de esta toxina, por vía oral. Ésto se demuestra por el aumento de LPO experimentado y las modificaciones detectadas en las actividades de las enzimas antioxidantes estudiadas en los peces, aunque no se observaron

efectos tóxicos en los mismos. Las principales actividades enzimáticas alteradas fueron SOD y CAT en hígado y riñón a los 21 días de exposición.

Los resultados muestran que la MC-LR contenida en las floraciones de cianobacterias inducen estrés oxidativo de forma tiempo-dependiente. Después de 14 días de tratamiento, ninguno de los biomarcadores estudiados fueron alterados en hígado, riñón ni branquias. A los 21 días de exposición, en cambio, se evidenció inducción del estrés oxidativo con un aumento de los niveles de LPO y una alteración de las actividades de las enzimas antioxidantes.

Los niveles de LPO generalmente aumentaron en los órganos estudiados después de 21 días de exposición. Algunos estudios han demostrado que la LPO y el estrés oxidativo aumentan en tejidos de diferentes especies de organismos acuáticos, como resultado de una continua exposición a contaminantes (Wiston y DiGiulio, 1991), pero éste es el primer estudio que se centra en las MC. No obstante, no es una regla general que la exposición a un contaminante aumente este parámetro. Algunos autores han observado disminución de los niveles de LPO en muestras de pescado contaminado por metales y compuestos orgánicos (Rodríguez-Ariza y col., 1993). Otros, sin embargo, no han descrito cambios significativos, como en peces expuestos al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Oruc y Üner, 2000). El aumento de los niveles de LPO observado en los tres órganos de tilapia estudiados concordaba con los resultados obtenidos en investigaciones previas por nuestro equipo llevadas a cabo en ratas expuestas a MC por vía intraperitoneal (Moreno y col., 2003b).

En relación con los biomarcadores enzimáticos de estrés oxidativo, debido a la interrelación existente entre la actividad SOD y CAT, usualmente se puede observar, después de la exposición a contaminantes,

una inducción simultánea en las actividades de ambas enzimas (Dimitrova y col., 1994). Sin embargo, en este estudio no se observó tal relación en riñón y branquias.

Los peces expuestos a la forma de alimentación triturada durante 21 días experimentaron un incremento en la actividad CAT de 2,6 veces en hígado, muy similar al aumento observado de 2,7 veces en la actividad SOD. Li y col. (2003) también observaron aumento de la actividad SOD y CAT en hepatocitos de la carpa común (*Cyprinus carpio* L.), inducido por MC-LR. La actividad de la enzima CAT aumentó 2,7 veces en riñón mientras que la inducción de la actividad SOD no fue significativa. En branquias no se mostraron cambios significativos en la actividad CAT, mientras que la enzima SOD aumentó de forma significativa después de 21 días de exposición para la forma de alimentación no triturada. Las actividades enzimáticas en los lotes tratados fueron muy bajas en riñón y branquias, en comparación con las del hígado.

El aumento observado en la actividad GPx, principalmente en hígado y riñón, fue similar a los resultados observados por Li y col. (2003) que estudiaron la respuesta del sistema antioxidante en hepatocitos de carpa común (*Cyprinus carpio* L.), expuestos a MC-LR. El aumento de la actividad GPx refleja una adaptación de las condiciones oxidativas en los peces expuestos (Lenartova y col., 1997). No obstante, la actividad disminuyó en branquias después de un largo tiempo de exposición, corroborándose un aumento de la LPO en este órgano. Ésto puede explicarse porque las branquias son órganos menos eficientes que el hígado y el riñón en la neutralización del daño peroxidativo (Sayeed y col., 2003; Ahmad y col., 2004).

La enzima GR juega un papel importante en la protección antioxidante de las células porque cataliza la reacción de regeneración del GSH a partir del GSSG. Su actividad aumentó después de 21 días de exposición. El aumento global de la actividad GR indicativa del daño inducido por MC, está en concordancia con resultados obtenidos por Stephensen y col., (2000) que demostraron un aumento en la actividad GR en peces criados en diferentes zonas acuáticas contaminadas motivado por un aumento de compuestos peroxidativos.

Las cianobacterias pueden ser parte de la dieta de varias especies de peces (Bowen, 1982) y un gran número de células de *Microcystis* tóxicas han sido detectadas en el intestino de tilapias (*Oreochromis niloticus* L.), lo que confirma que esta especie se alimenta de cianobacterias tóxicas (Mohamed y col., 2003). La forma de administración de las MC (trituyendo las floraciones de cianobacterias con el preparado comercial para peces o administrándolas simultáneamente sin triturar) afectó de forma diferente a los biomarcadores de estrés oxidativo. La forma triturada produjo efectos con una mayor significación en la mayoría de los órganos estudiados. Cuando las floraciones se mezclan triturándose con el preparado comercial para peces, se favorece la liberación de las toxinas lo que aumenta su biodisponibilidad.

Estos resultados apuntan a que las MC producen estrés oxidativo y un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes como mecanismo de defensa. No obstante, esto no es suficiente para prevenir la peroxidación lipídica. El hígado es el órgano más afectado en todos los casos porque las MC son potentes hepatotoxinas tanto en peces como en mamíferos (Fisher y Dietrich, 2000a; Towner y col., 2002). El riñón es el siguiente órgano más afectado, lo que coincide con resultados obtenidos por otros autores que

muestran daños renales en peces expuestos a MC (Rabergh y col., 1991; Kotak y col., 1996; Fisher y Dietrich., 2000a). Y finalmente, las branquias fueron el órgano menos afectado aunque autores como Rodger y col. (1994) observaron daños graves en este órgano en la trucha marrón después de la lisis de las células de floraciones de cianobacterias en el Lago Leven (Escocia). Algunos estudios consideran que las branquias son los órganos más sensibles a la LPO inducida por xenobióticos debido a que sus antioxidantes potenciales son más débiles que en los demás órganos (Sayeed y col., 2003). Otros estudios de laboratorio han demostrado que las branquias y tejido epitelial de peces de agua dulce forman una barrera para el transporte de MC (Tencalla y col., 1994; Bury y col., 1995) y que, en consecuencia, la ingesta puede llegar a ser la ruta de entrada más importante de MC en peces (Bury y col., 1998b).

4.2. EXPOSICIÓN I.P. AGUDA (DOSIS ÚNICA) DE MC-LR Y MC-RR/ SACRIFICIO A LOS 7 DÍAS

❖ 4.2.1. Características generales de los peces

Tras la exposición aguda de tilapias mediante una inyección intraperitoneal de 500µg/kg de MC-LR ó 500µg/kg de MC-RR, no se observó mortalidad. El periodo de observación fue de siete días tras la exposición al tóxico, procediéndose después al sacrificio de todos los peces.

En la **Tabla TR-2** se exponen los pesos relativos y su contenido en proteínas de los órganos estudiados de los peces tratados con respecto a los de su grupo control.

Resultados y Discusión

ÓRGANO	CONTROL	MC-LR	MC-RR
Hígado g/10 g peso corporal mg prot/g hígado	0,307±0,136 21,30±3,68	0,188±0,028 30,95±8,49	0,137±0,029 20,26±2,22
Riñón g/10 g peso corporal mg prot/g riñón	0,017±0,006 153,07±35,32	0,025±0,0003 209,33±23,95	0,020±0,006 201,43±35,00
Branquias g/10 g peso corporal mg prot/g branquias	0,268±0,022 4,78±0,35	0,313±0,044 8,31±0,04***	0,247±0,047 9,51±0,83***

Tabla TR-2: Características generales de los peces control y de los expuestos por vía i.p. a diferentes tipos de toxinas (MC-LR y MC-RR). Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). El nivel de significación observado ha sido *** $p < 0,001$ del grupo intoxicado comparado con el control.

Como en el experimento anterior (vía oral), no hubo diferencias a simple vista entre los peces tratados con MC respecto a los peces control. Además, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los pesos relativos de los órganos estudiados de los peces tratados con respecto a los del grupo control. Sin embargo, sí se mostró un aumento significativo del contenido de proteínas en branquias de los peces tratados tanto con MC-LR como con MC-RR con respecto a los del grupo control. (**Tabla TR-2**)

❖ **4.2.2. Medida de la LPO**

Todos los órganos tratados con MC-LR muestran un importante incremento en los niveles de LPO con respecto al grupo control, del orden de 1,6 para hígado y 1,2 para riñón y branquias, siendo el primero el órgano más afectado. La MC-RR también produjo un incremento significativo en los valores de LPO del orden de 1,3 veces en riñón y branquias; sin embargo, en el hígado se mantuvieron los niveles observados en los peces control. Además, se observaron respuestas diferentes a ambas variantes de MC en hígado y riñón, ya que se produce un aumento significativo en los niveles de ATB de los peces tratados con MC-LR con respecto a los tratados con MC-RR en el primero (factor 1,7) y sin embargo, una disminución en el segundo (factor con respecto a los peces tratados 1,1). (**Figura FR-6**).

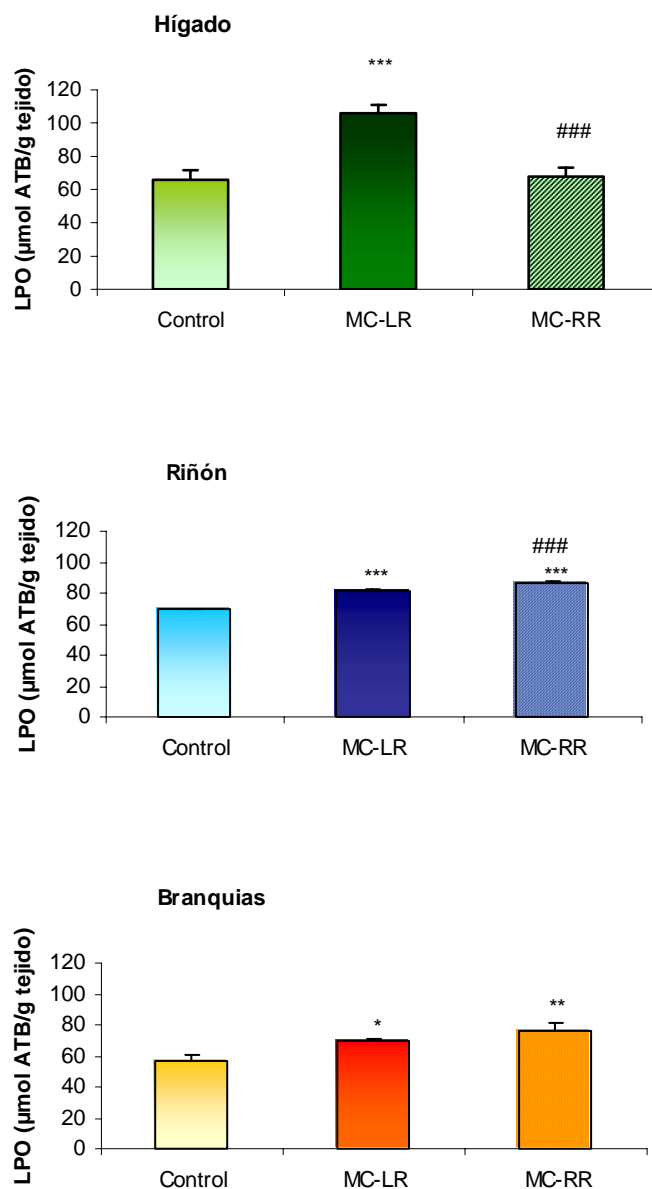


Figura FR-6: Los valores de LPO ($\mu\text{mol ATB/g tejido}$) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos de forma aguda a $500 \mu\text{g/kg MC-LR}$ ó $500 \mu\text{g/kg MC-RR}$. Los valores son expresados como la media \pm S.E. ($n=8$). Los niveles de significación observados han sido $*p<0,05$, $**p<0,01$ y $***p<0,001$ de los grupos intoxicados comparados con los valores del grupo control y $### p<0,001$ comparando los grupos intoxicados con las diferentes MC (MC-LR con MC-RR).

❖ **4.2.3. Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR**

La actividad **SOD** experimentó un aumento significativo en hígado, riñón y branquias, del orden de 1,4; 1,3 y 1,5 veces respectivamente, de los peces expuestos a 500µg/kg de MC-LR. En los expuestos a 500µg/kg de MC-RR no se observaron cambios significativos en hígado y branquias, tan sólo en riñón se produjo un aumento significativo de la actividad (factor 1,2) (**Figura FR-7**).

Se observó un aumento de la actividad **CAT** en hígado y riñón de los peces expuestos a ambos tipos de MC (factor 1,1) para todos los casos. El riñón y las branquias mostraron una actividad **CAT** basal mucho más baja que en hígado. En branquias dicha actividad **CAT** fue significativa y diferencialmente elevada por las variantes de MC (**Figura FR-8**).

No se observaron variaciones significativas en la actividad **GPx** ni en hígado ni en branquias de los peces expuestos a MC-LR y MC-RR. Sin embargo, sí se mostró un incremento significativo en riñón, pero sólo en caso de los tratados con MC-LR. En este órgano hubo diferencias significativas, del orden de 1,2, entre los resultados obtenidos con los peces tratados con MC-LR en comparación tanto con los peces control como con los tratados con MC-RR (**Figura FR-9**).

La actividad **GR** sólo aumentó significativamente en el hígado de los peces expuestos a MC-LR. Ni en riñón ni en branquias se detectaron incrementos significativos de la actividad por su exposición a las distintas MC con respecto al grupo control (**Figura FR-10**).

En todos los órganos estudiados, se producen diferentes respuestas del sistema de defensa antioxidante en función de la variante de MC.

Mientras la MC-LR produjo una inducción de las actividades SOD y CAT en los tres órganos estudiados, la actividad GR solo se vió alterada en el hígado y la GPx en el riñón. En cambio, la MC-RR produjo una inducción de la actividad CAT en todos los órganos y de la actividad SOD sólo en el hígado. Además, este congénere de MC no consiguió alterar las actividades enzimáticas GPx ni GR.

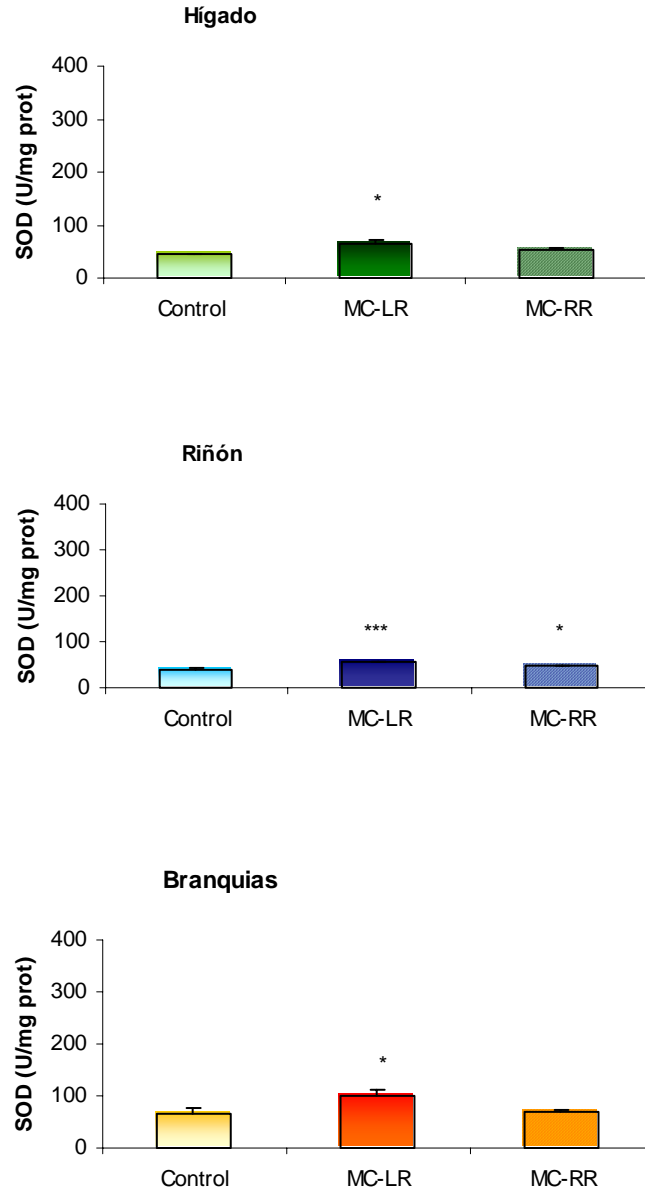


Figura FR-7: Valores de actividad SOD (U/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos de forma aguda a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR ó 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-RR. Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ de los grupos intoxicados comparados con los valores del grupo control.

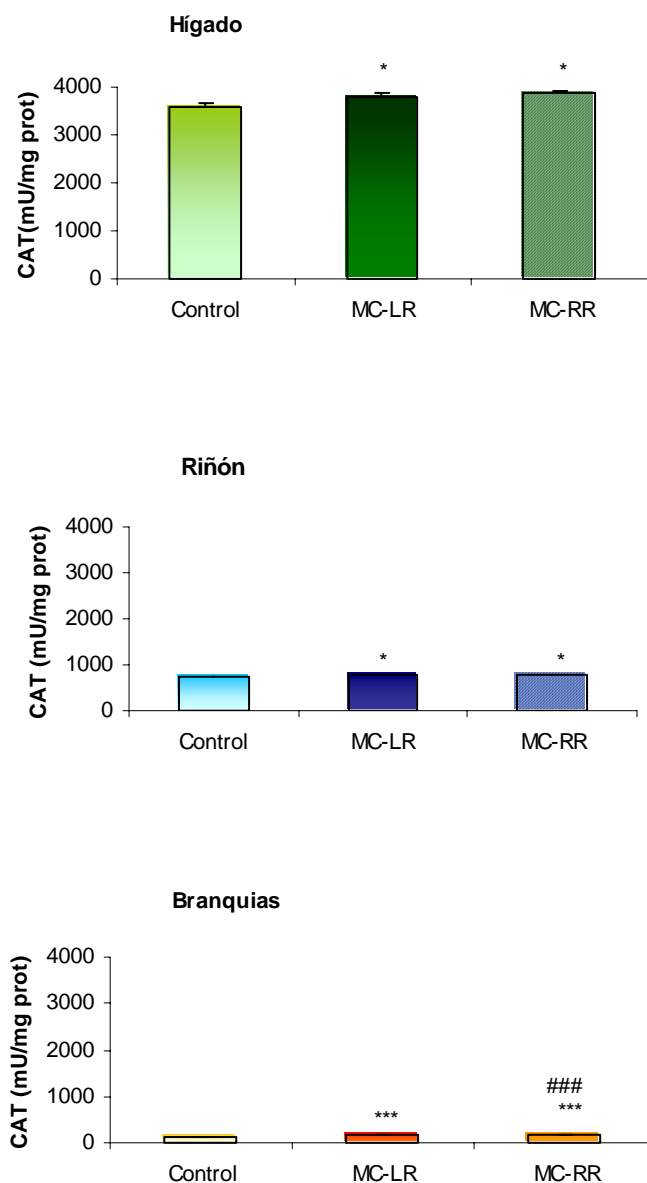


Figura FR-8: Valores de la actividad de CAT (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos de forma aguda a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR ó 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-RR. Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ de los grupos intoxicados comparados con los valores del grupo control y ### $p < 0,001$ comparando los grupos intoxicados con las diferentes MC (MC-LR con MC-RR).

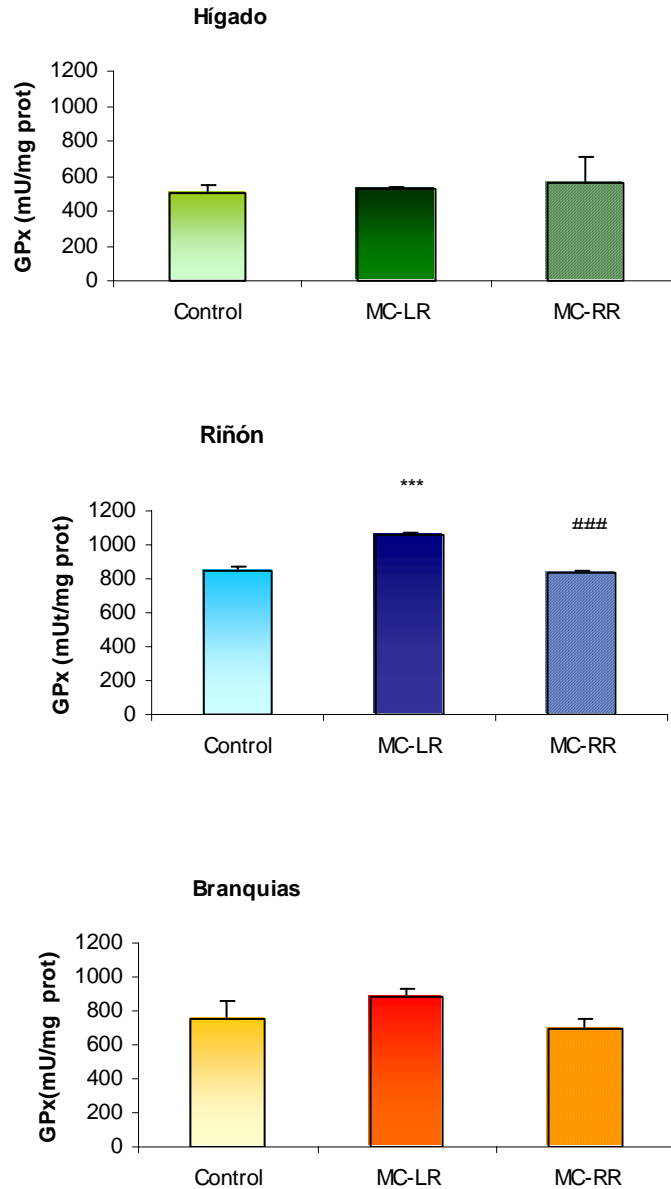


Figura FR-9: Valores de actividad de GPx (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos de forma aguda a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR ó 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-RR. Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido *** $p < 0,001$ de los grupos intoxicados comparados con los valores del grupo control y ### $p < 0,001$ comparando los grupos intoxicados con las diferentes MC (MC-LR con MC-RR).

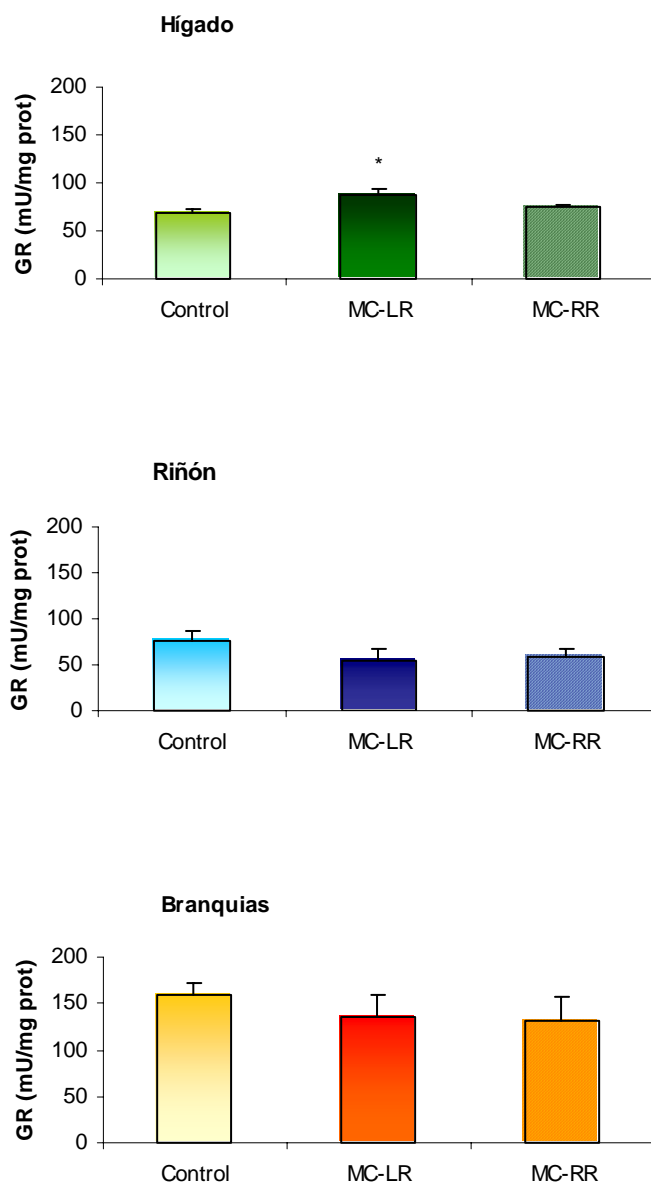


Figura FR-10: Valores de actividad de GR (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos de forma aguda a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR ó 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-RR. Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). El nivel de significación observado ha sido $*p < 0,05$ del grupo intoxicado comparado con los valores del grupo control.

❖ *4.2.4. Discusión de los resultados:*

Una vez demostrado que el estrés oxidativo puede jugar un papel importante en el mecanismo de acción tóxica de las MC, en concreto por exposición subcrónica a MC-LR proveniente de células de cianobacterias, nos interesó conocer si ésto también ocurría tras una exposición aguda, y estudiar, además, las posibles diferencias existentes en la acción o potencia tóxica de las MC. Siendo la MC-LR y la MC-RR las MC más comunes en floraciones tóxicas de cianobacterias, y de las que se disponen estándares de adecuada pureza en el mercado, fueron éstas las elegidas para nuestro trabajo de investigación. En el momento de estos ensayos no pudimos disponer de estándares adecuados de MC-YR.

En relación con las características generales de evolución de los peces tratados, hay que indicar que no hubo mortandad alguna. En este estudio llevado a cabo por vía i.p. las dosis de 500 µg/kg de MC-LR o de MC-RR utilizadas no resultaron letales para ninguno de los peces tras un periodo de observación de siete días. Ésto contrasta con los experimentos realizados por Rabergh y col., (1991) que encontraron que la DL₅₀ de MC-LR en carpa común (*Cyprinus carpio*) mediante inyección i.p. de la toxina, se encontraba entre 300 y 550 µg/kg, tras un periodo de observación igual al considerado en nuestro estudio, 7 días. Andersen y col. (1993) vieron una mortalidad muy baja en el salmón atlántico (*Salmo salar*) inyectado con tres dosis i.p. de 555 µg/kg/MC-LR (espaciadas cada 3 días) en un experimento llevado a cabo durante 36 días. Kotak y col., (1996) observaron que la DL₅₀ de MC-LR en la trucha arco iris se encontraba en un rango comprendido entre 400 y 1000 µg/kg y, sin embargo, Carbis y col., (1996) encontraron que la administración i.p. de 50 µg MC/kg en carpa resultaba letal a las 8 horas de exposición. Así, parece que aunque las MC pueden actuar de forma similar en los diferentes tipos de peces, hay diferencias interespecies

considerables en la susceptibilidad a la MC-LR (Kotak y col., 1996; Fisher y Dietrich., 2000a). Estas diferencias en la respuesta a las MC podría deberse a los diferentes mecanismos de detoxificación, siendo las especies de peces fitoplanctófagas más tolerantes a altas concentraciones de MC (Xie y col., 2007). No obstante, el estado nutricional y fisiológico de los peces puede tener mucha influencia en la toxicidad de las MC (Rabergh y col., 1991). Para la MC-RR son muy escasos los datos de la DL₅₀ en peces.

La exposición i.p. a MC en diferentes especies de peces ha producido asimismo efectos histopatológicos variados en la carpa común (Rabergh y col., 1991; Carbis y col., 1997) y la trucha arco iris (Kotak y col., 1996). Estos estudios muestran necrosis y degeneración del epitelio en hígado, riñón y branquias. En tilapias, nuestro equipo ha demostrado que exposiciones subcrónicas a MC de floraciones de cianobacterias producen alteraciones histopatológicas en hígado, riñón, branquias y en células de la mucosa intestinal (Molina y col., 2005).

Hay que indicar que éste es el primer estudio enfocado a estudiar posibles diferencias en la respuesta de estrés oxidativo producido por diferentes estándares de toxinas (MC-LR y MC-RR) en peces expuestos por vía i.p. Los resultados obtenidos revelan que ambas MC inducen estrés oxidativo en tilapia (*Oreochromis* sp.) aunque no se detectan efectos tóxicos observables en dicha especie.

Por vía i.p. la toxina MC-LR indujo un incremento en los niveles de ATB en todos los órganos estudiados, siendo los cambios más patentes en hígado seguido de riñón y por último de branquias. Ésto está de acuerdo con la bien conocida hepatotoxicidad de esta variedad de MC (Jacquemin y col., 1994; Sivonen y Jones, 1999; Humpage y col., 2000). MC-RR sólo induce

LPO en riñón y branquias; el hígado, por el contrario, no muestra ningún cambio en este biomarcador. Existen además diferencias significativas en los niveles de LPO en hígado y riñón en función de la variante de MC, siendo éstos más elevados en el caso de la MC-LR para el primero de los órganos y menos elevado para el segundo (**Figura FR-6**). Los menores cambios de LPO provocados por la MC-RR en el hígado, pueden deberse tanto a su menor toxicidad frente a la MC-LR, como a que el hígado es el órgano que presenta una mayor capacidad para eliminar ERO debido a su elevada actividad antioxidante. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Li y col., (2005a) quienes observaron que no se producía aumento en la LPO medida en lochas (*Misgurnus mizolepis*) expuestas a bajas dosis de MC-RR por vía oral. Otros autores, sin embargo, encuentran una disminución en los valores de LPO en hígado y branquias de peces (*Corydoras paleatus*) expuestos a MC-RR (Cazenave y col., 2006).

El aumento de las actividades de las enzimas SOD y CAT observados en hígado de tilapias después de la exposición aguda a MC-LR está de acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento anterior (tilapias expuestas a MC-LR de células de cianobacterias durante 21 días). Li y col., (2003) sólo observaron un aumento en estas actividades enzimáticas por exposición a MC-LR, en hepatocitos de carpa común (*Cyprinus carpio* L.). El hígado se ha descrito como el órgano más importante involucrado en la regulación redox del metabolismo y es el órgano diana de las MC (Falconer., 1991); por ello, el estado oxidativo de éste podría verse ampliamente afectado por estas toxinas. El riñón y las branquias muestran una respuesta similar, siendo este aumento mayor para la SOD en riñón y para la CAT en branquias.

La toxina MC-RR aumentó las actividades enzimáticas SOD y CAT en riñón mientras que en hígado y branquias sólo se observaron aumentos significativos en la actividad CAT manteniéndose los niveles de SOD similares a los del grupo control. La mayor susceptibilidad del riñón a la MC-RR comparado con hígado y branquias podría explicarse por la mayor hidrofilia de esta variante de MC comparado con la MC-LR, lo que facilita su distribución hacia este órgano. En cambio, Li y col., (2005a) sólo observaron aumento en la actividad SOD y CAT en hígado de lochas (*Misgurnus mizolepis*) expuestas a bajas dosis de MC-RR por vía oral. Cazenave y col. (2006) han encontrado una respuesta dual de la actividad CAT en el hígado de *Corydoras paleatus* tras la exposición a MC-RR disuelta, produciéndose un incremento a bajas concentraciones y una disminución a altas concentraciones de la toxina.

La exposición a MC-LR por vía i.p. produjo un incremento significativo en la actividad GPx en riñón, mientras que en hígado y branquias no se mostraron cambios significativos. Tampoco la MC-RR alteró los niveles basales de esta enzima en ninguno de los órganos estudiados. Sin embargo, tanto otros estudios como nuestros resultados obtenidos en la exposición por vía oral muestran, por el contrario, alteraciones en la actividad enzimática de GPx por MC-LR (Li y col., 2003) y por MC-RR (Li y col., 2005a; Cazenave y col., 2006). Ésto puede ser debido a las diferencias existentes en las condiciones de los sistemas experimentales, como tiempo de exposición, vía de administración y dosis empleadas.

La actividad de la enzima GR sólo aumentó en hígado en los peces expuestos a MC-LR. Otros autores, sin embargo, han observado alteraciones

de esta actividad enzimática en hígado, branquias y cerebro de *Corydoras paleatus* expuestos a MC-RR por inmersión (Cazenave y col., 2006).

El aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes puede indicar la formación de ERO en los órganos diana (Pinho y col., 2005a). En general, la SOD es la enzima que experimenta mayor respuesta frente a la exposición a MC, seguida de CAT, mientras que las actividades enzimáticas GPx y GR apenas muestran cambios. Esto puede explicarse por el importante papel de la SOD en la eliminación de los radicales libres superóxidos, lo que ayuda a mantener el balance entre oxidantes y antioxidantes. CAT y GPx actúan cooperando con la eliminación de peróxidos de hidrógeno y otros hidroperóxidos (en el caso de GPx). En este caso la actividad CAT parece ser suficiente para controlar los radicales de oxígeno, no siendo necesaria la inducción de la actividad GPx, y en consecuencia tampoco la de la GR que, como ya hemos comentado anteriormente, cataliza la reacción de recuperación de GSH a partir del GSSG producido por la GPx. Hay que tener en cuenta que el periodo de observación de este estudio (7 días, vía i.p.) podría haber sido corto para la inducción de una respuesta adaptativa de las enzimas que forman parte del sistema de defensa antioxidante en peces.

De las dos variantes estudiadas, MC-LR parece ser más potente como inductora de estrés oxidativo, ya que modifica la respuesta del sistema de defensa antioxidante de forma más extensa e incrementa la LPO en todos los órganos estudiados.

En este estudio, la administración i.p. aguda de ambos congéneres MC-LR y MC-RR, incrementa la LPO, siendo el hígado el órgano más sensible a MC-LR y el riñón a MC-RR. Esta respuesta del sistema de

defensa antioxidante frente a MC difiere de los obtenidos en estudios previos con mamíferos. En contraste con los peces, ratas macho wistar expuestas por vía i.p. a MC-LR mostraron una disminución de la actividad de estas enzimas, especialmente en hígado, y elevaciones significativas de LPO (Moreno y col., 2005a). Estas discrepancias, de nuevo, pueden deberse al modelo experimental escogido, y a las diferencias en las condiciones experimentales empleadas.

4.3. EXPOSICIÓN AGUDA (DOSIS ÚNICA)/ VÍA ORAL (TRITURADO)/ MC-LR/ SACRIFICIO A LAS 24 Y 72 HORAS

En tercer lugar, nos planteamos investigar la evolución de los biomarcadores afectados a corto plazo (24 y 72 horas) tras una administración aguda de 120 µg MC-LR/pez. La vía de administración elegida fue oral, ya que es la que más se asemeja a la exposición que pueden experimentar los peces cuando existe una floración de cianobacterias en la naturaleza.

❖ 4.3.1. Características generales de los peces

Tras la exposición aguda de tilapias al liofilizado de células de cianobacterias a una dosis de 120 µg MC-LR/pez por vía oral no se observó mortalidad alguna en ninguno de los periodos de observación (24 horas y 72 horas).

En la **Tabla TR-3** se exponen los pesos relativos y su contenido en proteínas de los órganos estudiados de los peces tratados con respecto a los del grupo control para ambos periodos experimentales.

ÓRGANO	CONTROL 24 HORAS	INTOXICADO 24 HORAS	CONTROL 72 HORAS	INTOXICADO 72 HORAS
Hígado g/10 g peso corporal mg prot/g hígado	0,095±0,020 20,04±0,98	0,259±0,164 11,14±1,32**	0,095±0,001 17,44±4,21	0,091±0,022 27,58±9,18
Riñón g/10 g peso corporal mg prot/g riñón	0,017±0,005 164,33±1,10	0,031±0,008 70,46±6,40***	0,020±0,003 82,46±2,30	0,021±0,010 118,06±40,61
Branquias g/10 g peso corporal mg prot/g branquias	0,424±0,021 4,09±0,01	0,360±0,050 3,45±0,45	0,355±0,002 2,65±0,02	0,450±0,100 2,90±0,52

Tabla TR-3: Características generales de los peces control y los expuestos por vía oral al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/pez) de forma aguda y sacrificados a las 24 y 72 horas. Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ del grupo intoxicado comparado con su grupo control.

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los pesos relativos de los órganos estudiados de los peces tratados con respecto a los de su grupo control. Sin embargo, sí se mostró una disminución significativa del contenido de proteínas en hígado y riñón de los peces sacrificados a las 24 horas con respecto a los de su grupo control (**Tabla TR-3**).

❖ **4.3.2. Medida de la LPO**

El hígado resultó el órgano más afectado a las 24 horas tras la exposición, mostrando un incremento en los valores de ATB de 3,6 veces en los peces expuestos al liofilizado de cianobacterias. En riñón y branquias no se observaron cambios en los niveles de LPO, los cuales mantuvieron valores iguales a los niveles basales. Tras 72 horas de exposición se observó un incremento significativo de este parámetro en todos los órganos estudiados. Comparando los resultados en ambos periodos experimentales (24 y 72 horas), se produjo un aumento tanto en riñón (1,8 veces) como en branquias (1,4 veces) de la LPO con el tiempo. Sin embargo, en hígado la LPO disminuyó del orden de 1,2 veces entre las 24 y 72 horas tras la exposición (**Figura FR-11**).

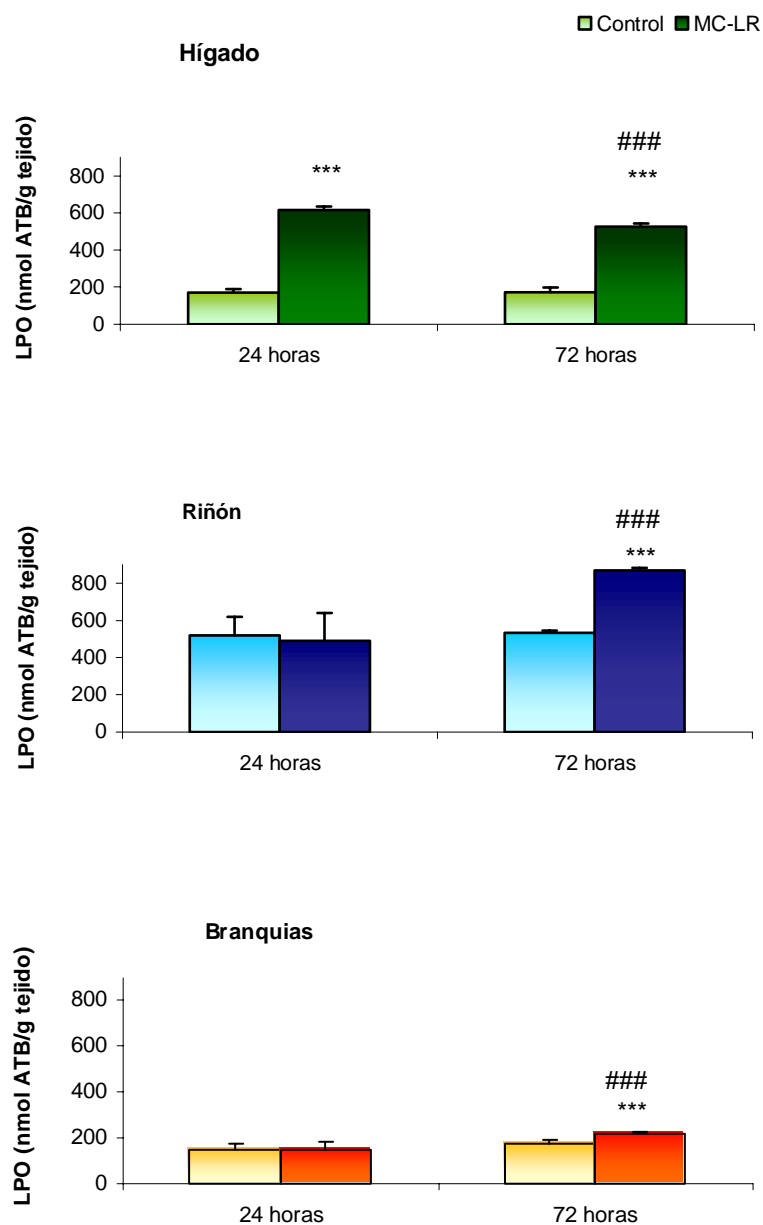


Figura FR-11: Valores de LPO (nmol ATB/g tejido) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas. Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido *** p<0,001 del grupo intoxicado comparado con los valores de su grupo control y ### p<0,001 para el grupo intoxicado 72 horas con respecto 24 horas.

❖ **4.3.3. Medida de la oxidación de proteínas: determinación de grupos carbonilos**

Otro de los parámetros indicadores de estrés oxidativo es la oxidación de proteínas. Para ambos periodos de tiempo quisimos evaluar la posible oxidación de proteínas, mediante la detección de grupos carbonilos en los peces intoxicados e investigar su evolución con el tiempo de sacrificio. En la **Tabla TR-4** se muestran los resultados obtenidos en hígado de peces expuestos a liofilizados conteniendo 120 µg/pez MC-LR y controles para ambos periodos experimentales (24 y 72 horas).

Tiempo de exposición	Grupo experimental (Hígado)	nmoles grupos carbonilos/mg proteína
24 horas	Control	61,8 ± 0,1
	Intoxicado	95,4 ± 4,0 ***
72 horas	Control	63,0 ± 0,2
	Intoxicado	85,6 ± 1,6 *** #

Tabla TR-4: Valores de oxidación de proteínas (nmoles grupos carbonilos/mg proteína) en peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas. Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido ***p<0,001 del grupo intoxicado comparado con los valores de su grupo control y #p<0,05 grupo intoxicado sacrificado a las 72 horas comparado con el sacrificado a las 24 horas.

Tanto a las 24 como a las 72 horas se observan incrementos significativos de los grupos carbonilos en las muestras de hígado de peces expuestos a la toxina, lo que se traduce en aumentos de 1,5 y 1,3 veces, respectivamente, de la oxidación de proteínas en dicho órgano con respecto a su grupo control. Además, comparando los resultados de ambos periodos de sacrificio tras la exposición, se observa una disminución significativa de la oxidación de proteínas en los peces sacrificados a las 72 horas de la exposición al tóxico con respecto a los sacrificados a las 24 horas.

❖ **4.3.4. Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR**

La actividad **SOD** disminuyó tanto en el hígado como en el riñón de los peces sacrificados a las 24 y 72 horas, siendo este descenso de actividad más significativo en el riñón, del orden de 1,4 veces. En branquias no se experimentaron cambios significativos de la actividad de esta enzima para ninguno de los periodos de observación. Además, no se observaron diferencias significativas entre ambos periodos experimentales (**Figura FR-12**).

La **CAT** disminuyó su actividad del orden de 2,1 veces en hígado y de 1,5 veces en riñón tras 24 horas desde la aplicación del tóxico, mostrándose así el hígado como el órgano más afectado para este periodo de tiempo. No se observaron cambios significativos en la actividad de esta enzima en branquias tras 24 horas desde la exposición. A las 72 horas también se observa una disminución significativa de la actividad de esta enzima en riñón (del orden de 1,6 veces) con respecto al grupo control, mientras que las branquias mantienen su actividad en su valor basal. En hígado, la disminución de la actividad CAT fue de 1,2 veces con respecto al control, por lo tanto, en este órgano aumenta la actividad CAT de forma significativa a las 72 horas con respecto a las 24 horas (**Figura FR-13**).

La actividad **GPx** tan sólo experimentó una leve disminución (del orden de 1,3 veces) en riñón tanto a las 24 como a las 72 horas desde la exposición. No se observaron cambios significativos de esta actividad ni en hígado ni en branquias en ninguno de los periodos de sacrificio (**Figura FR-14**).

La **GR** sólo disminuyó de forma significativa en el riñón de los peces expuestos al tóxico (del orden de 1,9 veces). Sin embargo, en hígado

se produjo un aumento de esta actividad del orden de 1,3 veces en un periodo de 72 horas tras la exposición. En branquias, sin embargo, no se produjeron cambios significativos en la actividad de esta enzima con respecto al grupo control para ninguno de los periodos experimentales (**Figura FR-15**).

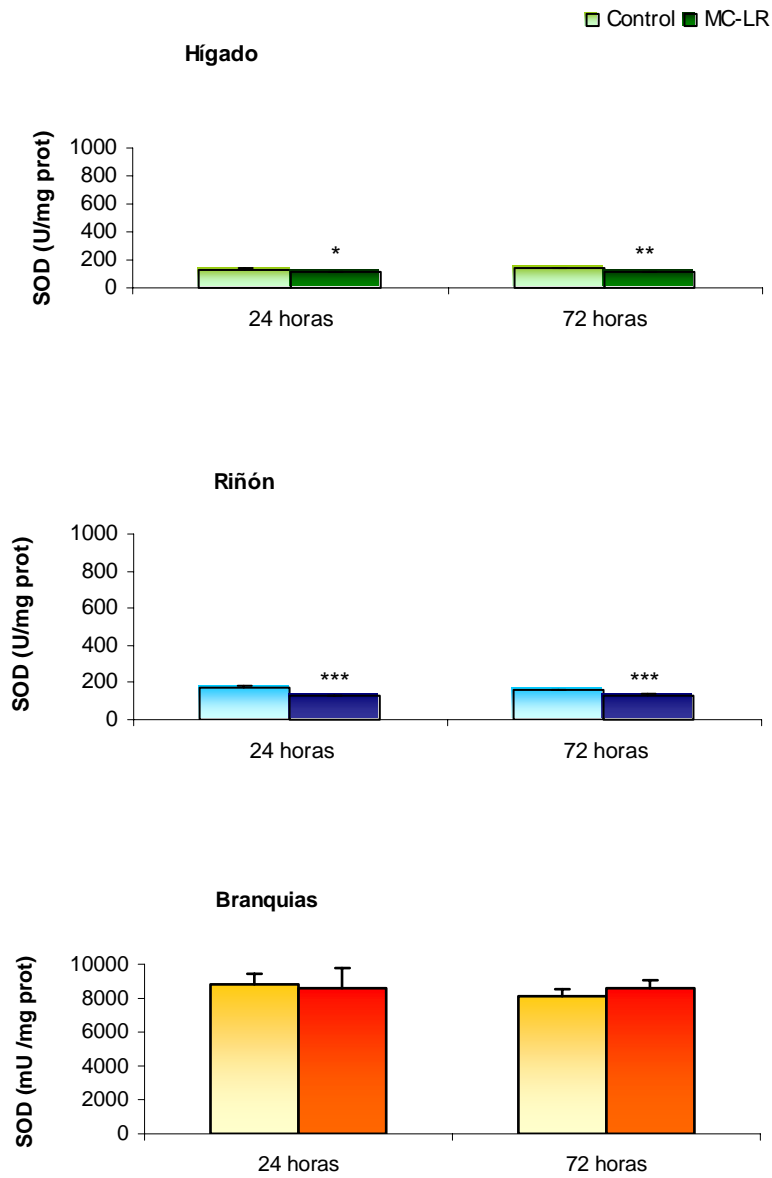


Figura FR-12: Valores de la actividad SOD en hígado (U/mg proteína), riñón (U/mg proteína) y branquias (mU/mg proteína) de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas. Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001 del grupo intoxicado comparado con su control.

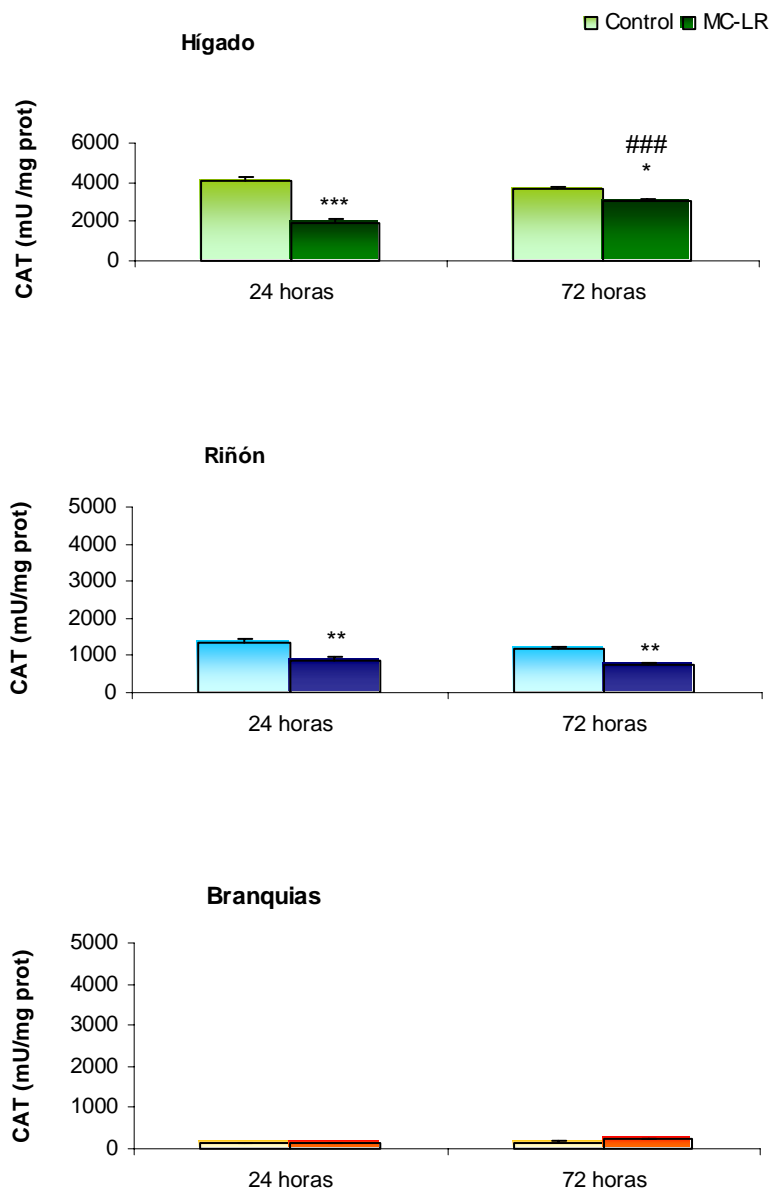


Figura FR-13: Valores de la actividad CAT (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 $\mu\text{g}/\text{pez}$) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas. Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ del grupo intoxicado comparado con los valores de su grupo control y ### $p < 0,001$ grupo intoxicado 72 horas con respecto a 24 horas.

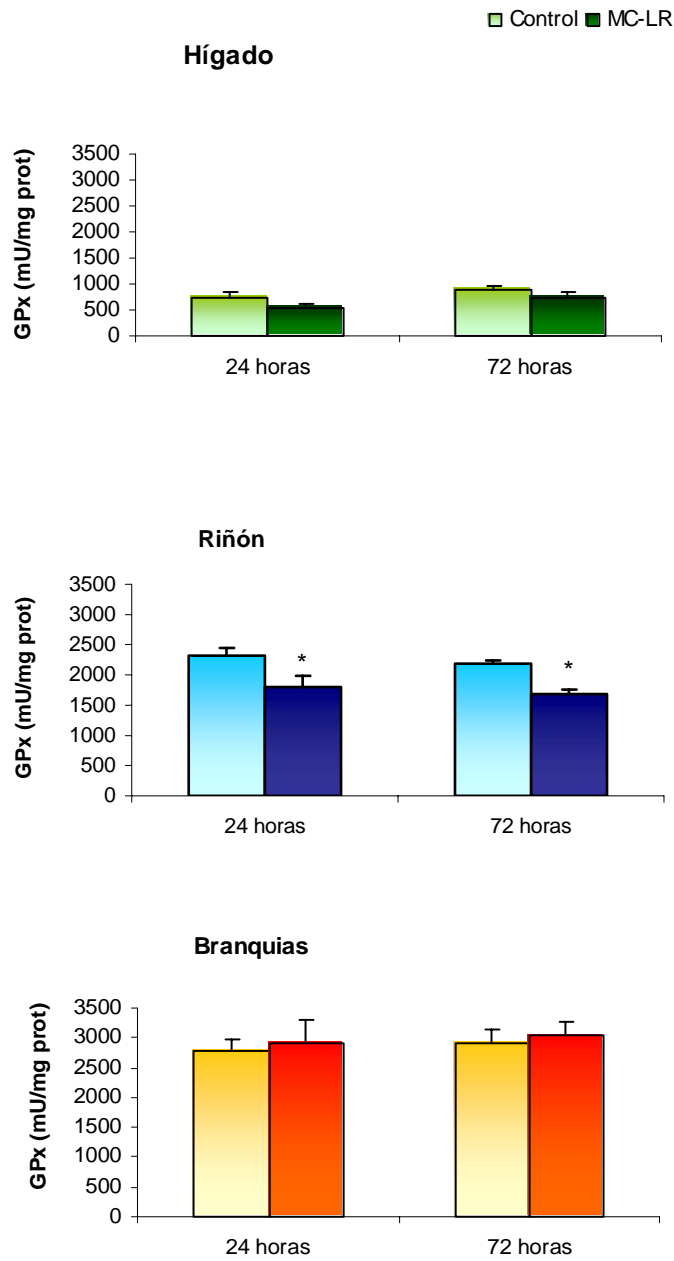


Figura FR-14: Valores de la actividad GPx (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 $\mu\text{g}/\text{pez}$) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas. Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). El nivel de significación observado ha sido $*p < 0,05$ del grupo intoxicado en comparación con los valores de su grupo control.

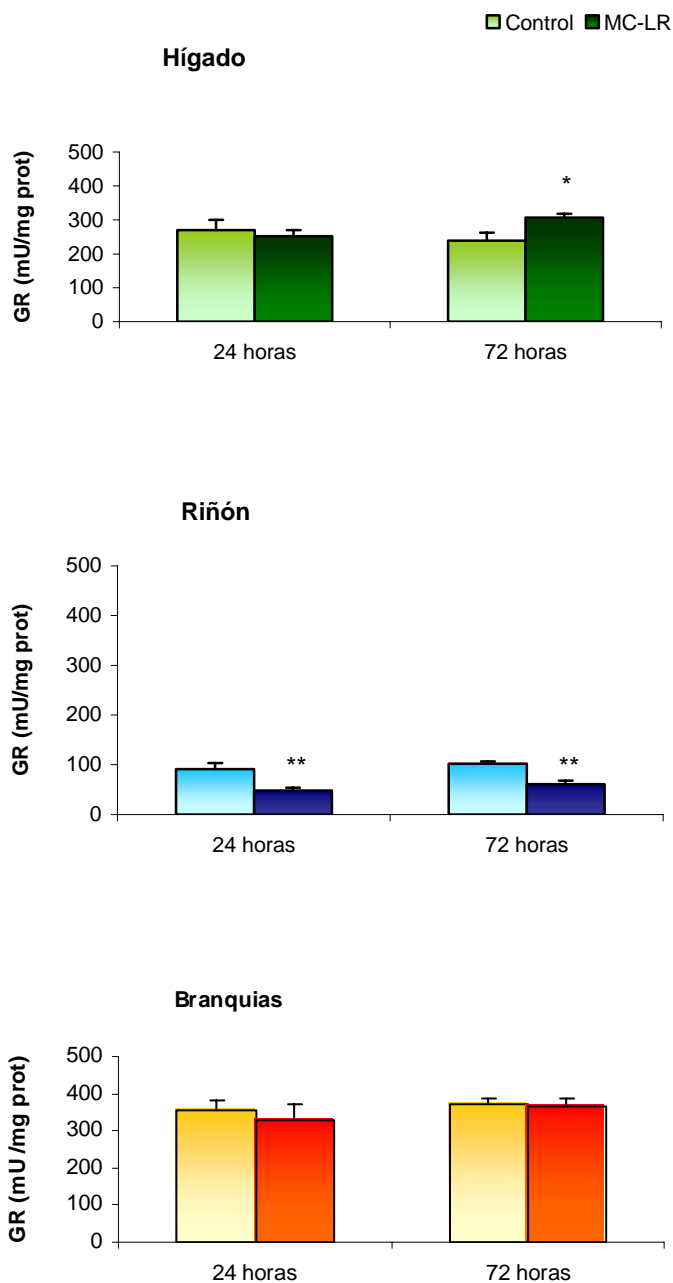


Figura FR-15: Valores de la actividad GR (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 $\mu\text{g/pez}$) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas. Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ del grupo intoxicado en comparación con los valores de su grupo control.

❖ **4.3.5. Determinación de MC-LR en las muestras: Test ELISA**

Después de ver diferencias significativas en la evolución, tanto de la actividad de algunos de los enzimas antioxidantes como de los niveles de LPO medidos para un mismo órgano, de peces sacrificados en diferentes periodos de tiempo (24 y 72 horas), nos interesó saber la presencia de MC-LR en dichas muestras para conocer si los peces podían realizar una depuración de la misma con el tiempo. En la **Tabla TR-5** se muestran los resultados obtenidos en hígado de peces expuestos a MC-LR y controles para ambos periodos experimentales (24 y 72 horas), mediante el Test de ELISA.

Periodo experimental	Grupo experimental	ng MC-LR equiv/g hígado
24 horas	Control	No se detecta
	Intoxicado	0,065- 0,10
72 horas	Control	No se detecta
	Intoxicado	No se detecta

Tabla TR-5: Cantidad de MC medida mediante el Test de ELISA en hígado de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda y sacrificados tras 24 y 72 horas. Los valores de MC se expresan en ng MC-LR equiv/g hígado.

Según los resultados obtenidos, tan sólo se detectó MC-LR en hígado de peces intoxicados y sacrificados a las 24 horas de su exposición, siendo detectada MC-LR en un rango de concentración de 0,065-0,10 ng MC-LR equiv/g. No se detectó la toxina en este órgano en peces expuestos y sacrificados a las 72 horas.

❖ **4.3.6. Discusión de los resultados:**

Después de comprobar la influencia de las MC, administradas tanto por vía oral como por vía intraperitoneal, en la actividad de las enzimas antioxidantes y en los niveles de LPO de hígado, riñón y branquias de tilapias expuestas, quisimos ver la evolución de sus efectos en el tiempo.

Existen diversos estudios centrados en la observación de efectos tóxicos producidos por exposición oral aguda en peces. Muchos documentan que la exposición a cianobacterias a través del sistema gastrointestinal puede causar efectos tóxicos en algunas especies piscícolas tales como la carpa común (Fischer y Dietrich, 2000a), carpa plateada (Xie y col., 2007), la locha (Li y col., 2005a), trucha arco iris (Tencalla y Dietrich, 1996) y tilapia (Mohamed y col., 2003; Mohamed y Hussein, 2006). En cambio son muy escasos los estudios centrados en los efectos orales agudos y particularmente en el estrés oxidativo, si bien Ernst y col., (2006) estudiaron la toxicidad oral de *Planktothrix rubescens* en el pez blanco europeo y mostraron efectos tóxicos después de las 24 horas de exposición.

Este estudio revela que el órgano más afectado en cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes fue el riñón. No obstante, el hígado fue el más afectado en relación con los niveles de LPO, observándose asimismo oxidación de proteínas. En branquias no se produjeron cambios significativos, con excepción de un aumento de los niveles de ATB en peces sacrificados a las 72 horas de la exposición. La mayor afectación encontrada en el hígado puede explicarse por la tropicidad de las MC por este órgano. Fisher y col., (2005) explicaron la hepatotoxicidad de las MC debido a su transporte mediado por polipéptidos transportadores de aniones orgánicos, una superfamilia de transportadores de membrana que se expresan en los

hepatocitos y en la barrera cerebral. Ésto puede explicar que los valores de LPO estuvieran alterados ya en hígado a las 24 horas y en cambio, en riñón y branquias, no se observaran diferencias significativas hasta las 72 horas tras la exposición.

Los órganos mas afectados en peces, generalmente, son hígado y riñón, con disociación y degeneración de hepatocitos en hígado y dilatación de la cápsula de Bowman en riñón (Zurawell y col., 2005). Indicios similares se observaron en estudios histopatológicos realizados por nuestro equipo de investigación en hígado y riñón de tilapias expuestas de forma subcrónica a floraciones tóxicas de cianobacterias, en los cuales sólo se detectaron leves cambios histopatológicos en branquias (Molina y col., 2005). Estos trabajos apoyan nuestros resultados, que muestran mayores alteraciones en la actividad de enzimas antioxidantes y en la LPO en hígado y en riñón, siendo las branquias el órgano menos afectado. Además, en otros estudios, no se observaron daños patológicos en las branquias del pez blanco europeo (*Coregonus lavaretus*) intoxicados con cianobacterias de *Planktothrix rubescens* que contenían MC (Ernst y col., 2006). Sin embargo, Cazenave y col. (2006) demostraron alteraciones en la actividad de enzimas antioxidantes (GPx y GR) en branquias de peces (*Corydoras paleatus*) expuestos a MC-RR por inmersión. Por tanto, la vía de exposición influye en la localización de efectos tóxicos producidos por MC.

Los niveles de ATB y la oxidación de proteínas son mayores después de 24 horas en hígado y disminuyen de forma significativa después de 72 horas, lo que indica que el sistema de defensa en tilapias es inicialmente destruido. Pinho y col., (2005a) además observaron un aumento de ambos parámetros en el hepatopáncreas de cangrejos oralmente expuestos a MC.

De nuevo los biomarcadores enzimáticos de estrés oxidativo más afectados han sido SOD y CAT. Li y col., (2005a) comprobaron una gran variación de las actividades SOD y CAT en comparación con GPx en hígado de lochas expuestas a floraciones de *Microcystis* durante 28 días por vía oral; no obstante, no se observaron cambios en la LPO. Sin embargo, mientras que tras la exposición oral subcrónica a MC-LR vía oral se observó un incremento de las enzimas antioxidantes estudiadas (apartado 4.1.3), tras la exposición oral aguda a la misma MC las actividades de estas enzimas disminuyeron con respecto al control. Esto podría ser debido a las diferencias en los periodos experimentales y la dosis de MC-LR utilizada (60 µg MC-LR/pez/día durante 21 días y una sola dosis de 120 µg MC-LR/pez sacrificándolos a las 24 y 72 horas de la exposición). Dosis altas de MC podrían producir daños en las proteínas enzimáticas mientras que dosis más bajas, administradas durante un periodo más largo de tiempo, podrían inducir una respuesta defensiva.

La recuperación de los daños producidos pueden ser explicados, en parte, por el aumento observado en hígado de CAT y GR después de 72 horas comparado con 24 horas. Sin embargo, las actividades de las enzimas antioxidantes estudiadas en riñón y branquias, al igual que SOD y GPx en hígado, no mostraron una clara recuperación funcional, posiblemente porque se requiera un periodo más largo de tiempo para la síntesis de proteínas. En este sentido, Sun y col. (2006) concluyeron que enzimas antioxidantes tales como CAT, SOD y glutathion-S-transferasa (GST) de peces expuestos a 0,05 mg/L de fenantreno, necesitaron 14 días para recuperarse después una disminución inicial de su actividad.

La disminución de los efectos observados en la LPO puede explicarse mediante la depuración de MC en peces. Existen evidencias de este hecho en algunos organismos acuáticos, tales como macrofitas,

moluscos, crustáceos y peces, que pueden acumular y destoxicar MC en sus tejidos por biotransformación de Fase II (Pflugmacher y Wiegand, 2001). Dichos estudios muestran la conversión de MC hasta compuestos más polares en el hígado, produciéndose una disminución del GSH celular para formar conjugados de glutatión-MC-LR vía GST (Pflugmacher y col., 1998b).

En este estudio, el nivel de MC detectado en el hígado de los peces expuestos aumenta a las 24 horas y no se detecta a las 72 horas de la exposición, lo que concuerda con los resultados obtenidos en las determinaciones de LPO y actividades enzimáticas. Se han realizado diversos estudios sobre la acumulación y depuración de MC en peces y otros organismos acuáticos que muestran una disminución del contenido de MC en distintos órganos (hígado y músculo) de manera tiempo dependiente (Williams y col., 1997; Smith y Haney, 2006). Mohamed y Hussein (2006) revelaron que la tilapia puede depurar y excretar MC por la bilis al medio acuático evitando así la toxicidad de estas hepatotoxinas. Soares y col. (2004), observaron un aumento y una temprana acumulación de MC en hígado comparado con el músculo, en experimentos realizados en *Tilapia rendalli*. Esto podría explicarse por dos razones: la primera, el hígado es el principal órgano de detoxificación en los peces y la segunda, a que las MC se acumulan mayoritariamente en hígado (Zhao y col., 2006; Chen y col., 2007) y la detoxificación de MC comenzaría en este órgano. En efecto, estudios de acumulación de MC en tilapia del Nilo en hígado, músculo, vesícula biliar y bazo, demostraron que alrededor del 90% de las MC se acumulan en hígado (Zhao y col., 2006).

Los cambios histopatológicos también están relacionados con el tiempo, de forma que las lesiones producidas por las MC en peces pueden recuperarse. Ernst y col. (2006) demostraron una recuperación de los efectos tóxicos producidos por MC a las 24-48 horas en el pez blanco europeo

(*Coregonus lavaretus*); Li y col., (2005b) observaron una recuperación de hepatocitos en la carpas a las 48 horas post-inyección. Malbrouck y col., (2004) observaron recuperación de la estructura hepática y regeneración de los hepatocitos del pez dorado (*Carasius auratus*) después de 96 horas, además de una reconstrucción de la estructura de los tejidos después de 21 días tras la inyección de 125 mg/kg peso corporal de MC-LR.

Además, de acuerdo con la bibliografía comentada, diferencias tiempo dependiente han sido observadas en la respuesta antioxidante ante situaciones de estrés oxidativo inducido por diferentes tóxicos en tilapias (Basha y Rani, 2003; Peixoto y col., 2006). En particular las MC, han sido capaces de producir una respuesta bifásica en los niveles de GSH en ratones y cangrejos (Ding y col., 2000a; Pinho y col., 2005a). Por consiguiente, la recuperación inicial observada en los peces expuestos después de 72 horas, principalmente en la LPO y oxidación de proteínas en hígado, podría llegar a apreciarse en los demás órganos más adelante, ya que podrían requerir un mayor periodo de tiempo para la síntesis de nuevas proteínas una vez depuradas las MC. No obstante, son necesarios más estudios para poder ilustrar la relación entre los efectos tóxicos de las MC y su concentración en tejido de peces.

4.4. EXPOSICIÓN AGUDA (DOSIS ÚNICA)/ VÍA ORAL (TRITURADO)/ MC-LR / DOS DOSIS DE VITAMINA E (200 y 700 mg/kg dieta)/ SACRIFICIO A LAS 24 HORAS

Conocida la capacidad antioxidante de la vit E en diferentes sistemas biológicos, y demostrados los efectos tóxicos producidos por las MC sobre el sistema de defensa antioxidante, nos planteamos investigar el papel que juega dicha vitamina en el mantenimiento del equilibrio del sistema antioxidante. Así, administramos un suplemento de vit E en la dieta con dos dosis diferentes (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta) con el fin de ver cual es la más adecuada en tilapias (*Oreochromis* sp.) intoxicadas de forma aguda por vía oral con 120 µg MC-LR/ pez y sacrificadas a las 24 horas.

❖ **4.4.1. Características generales de los peces**

Tras la exposición aguda de tilapias, pretratadas o no con diferentes dosis de vit E (200 mg vit E/kg dieta y 700 mg vit E*/kg dieta), al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/ pez por vía oral) no se observó mortandad alguna tras un periodo de observación de 24 horas. En la **Tabla TR-6** se exponen los pesos relativos y su contenido en proteínas de los órganos estudiados de los peces tratados, suplementados (grupo 4 con una dosis de vit E=200mg/kg dieta y grupo 6 con una dosis de vit E* = 700mg/kg dieta) o no con vit E (grupo 2), con respecto a sus correspondientes grupos control (grupos 3, 5 y 1).

Resultados y Discusión

ÓRGANO	CONTROL Grupo 1	INTOXICADO Grupo 2	CONTROL-Vit E (200 mg/kg) Grupo 3	INTOXICADO- Vit E (200 mg/kg) Grupo 4	CONTROL-Vit E* (700 mg/kg) Grupo 5	INTOXICADO- Vit E* (700 mg/kg) Grupo 6
<i>Hígado</i> g/10 g peso corporal mg prot/g hígado	0,098±0,011 17,68±2,50	0,074±0,012 18,77±1,58	0,067±0,017 19,07±2,70	0,082±0,005 18,56±1,07	0,091±0,026 17,18±3,00	0,050±0,016 22,26±2,13
<i>Riñón</i> g/10 g peso corporal mg prot/g riñón	0,020±0,002 74,00±3,50	0,017±0,001 77,00±2,75	0,023±0,004 77,00±11,00	0,026±0,001 133,00±15,00*	0,016±0,004 107,15±15,00	0,024±0,004 161,50±20,00*
<i>Branquias</i> g/10 g peso corporal mg prot/g branquias	0,356±0,001 3,48±0,21	0,350±0,030 2,96±0,20	0,370±0,024 2,47±0,34	0,423±0,033 2,54±0,02	0,346±0,010 2,89±0,22	0,353±0,013 3,33±0,37

Tabla TR-6: Características generales de los peces control y los expuestos al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/ pez) pretratados y sin pretratar con diferentes dosis de vitamina E (200 mg vit E/kg dieta y 700 mg vit E*/kg dieta). El nivel de significación observado ha sido * $p < 0,05$ del grupo intoxicado vit E y intoxicado vit E* comparado con su correspondiente grupo control.

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los pesos relativos de los órganos estudiados de los peces tratados con respecto a los de su grupo control. Sin embargo, sí se mostró un aumento significativo del contenido de proteínas en riñón de los peces intoxicados que fueron suplementados con ambas dosis de vit E, 200 y 700mg/kg dieta (grupos 4 y 6), en comparación con sus respectivos grupos controles (grupos 3 y 5) (**Tabla TR-4**).

❖ **4.4.2. Medida de la LPO**

En la **figura FR-16** se puede observar que se produjo un aumento en los valores de ATB tanto en hígado como en riñón de los peces intoxicados que no fueron suplementados con ninguna dosis de vit E (grupo 2). Concretamente en hígado se produjo un aumento 1,6 veces superior en la LPO en peces expuestos al liofilizado de células de cianobacterias y sacrificados a las 24 horas. En dicho órgano ambas dosis de vit E fueron suficientes para protegerlo del aumento de la LPO inducida por las MC. Un comportamiento similar se observa en riñón de forma que la vit E necesaria para que no se alterase este parámetro fue la mayor de las dosis administrada (700 mg/kg dieta). En branquias se experimenta una disminución significativa de los valores de LPO en los peces pretratados con la dosis mas baja de vit E (200 mg/kg dieta) (grupo 3) con respecto tanto al grupo intoxicado no pretratado con vit E (grupo 2), como al pretratado con la dosis más alta de vit E (700 mg/kg dieta) (grupo 6). (**Figura FR-16**)

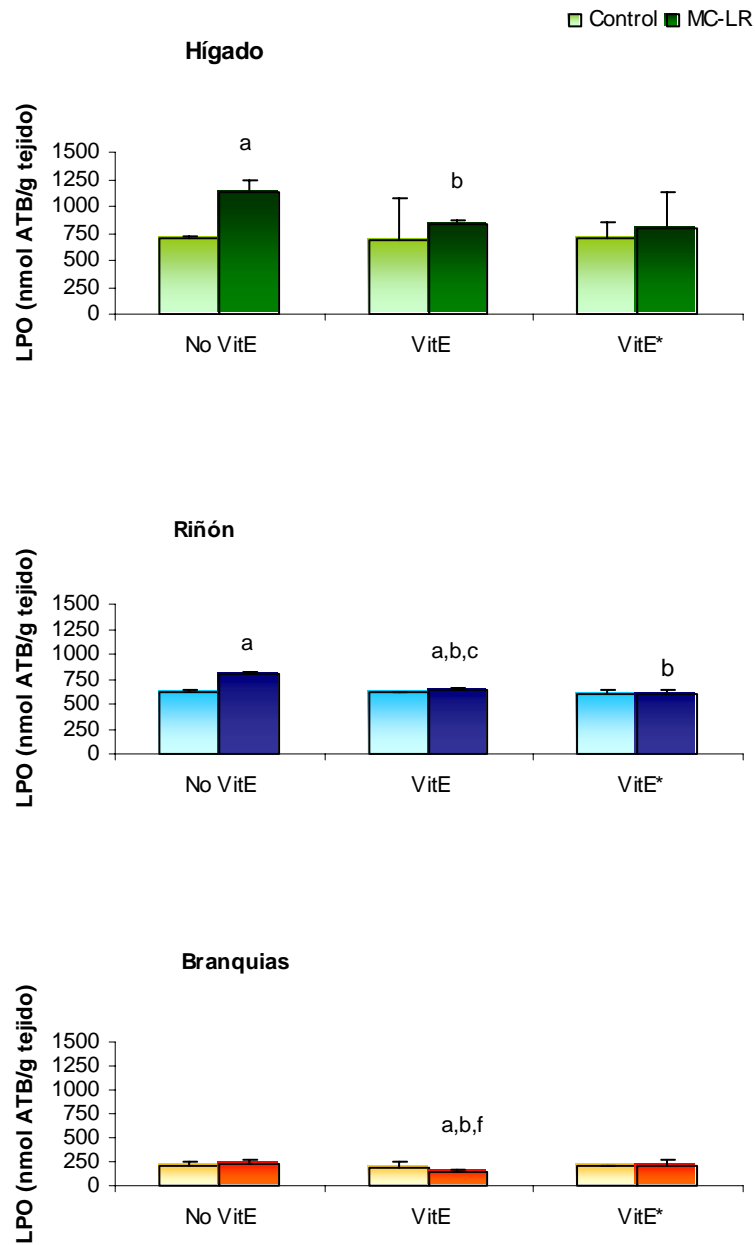


Figura FR-16: Valores de LPO (nmol ATB/g tejido) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 μ g/pez) por vía oral de forma aguda, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta). Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido (a) $p < 0,05$ para la comparación con el control no pretratado (grupo 1), (b) $p < 0,05$ para la comparación con el intoxicado no pretratado (grupo 2), (c) $p < 0,05$ para comparar el grupo intoxicado-vitE (200mg/kg dieta) con su control-vitE (grupos 3 y 4) y, por último, (f) $p < 0,05$ para comparar entre sí los grupos intoxicados suplementados con dosis diferentes de vitE (grupos 4 y 6).

❖ **4.4.3. Medida de la oxidación de proteínas: Determinación de grupos carbonilos**

Periodo experimental	Nº grupo experimental	Tratamiento	nmoles grupos carbonilos/mg proteína
24 horas	1	Control	97 ± 1
	2	Intoxicado	101 ± 1
	3	Control-vitE	83 ± 5 ^a
	4	Intoxicado-vitE	94 ± 3
	5	Control-vitE*	54 ± 6 ^{a,c}
	6	Intoxicado-vitE*	68 ± 5 ^{b,f}

Tabla TR-7: Valores de oxidación de proteínas (nmoles grupos carbonilos/mg proteína) en hígado de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda por vía oral, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta). Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido (a) p<0,05 para la comparación con el control no pretratado (grupo 1), (b) p<0,05 para la comparación con el intoxicado no pretratado (grupo 2), (c) p<0,05 para comparar entre sí los dos grupos controles suplementados con dosis diferentes de vitE (grupos 3 y 5) y, por último, (f) p<0,05 para comparar entre sí los grupos intoxicados suplementados con dosis diferentes de vit E (grupos 4 y 6).

En la tabla anterior se observa un leve aumento, aunque no significativo, de la oxidación de proteínas en hígado de los grupos intoxicados, suplementados (grupo 4 con una dosis de vit E=200mg/kg dieta y grupo 6 con una dosis de vit E* = 700mg/kg dieta) o no con vit E (grupo 2), con respecto a sus correspondientes grupos controles (grupos 3, 5 y 1). Además existe una disminución significativa de la oxidación de proteínas en hígado de peces intoxicados y pretratados con la mayor de las dosis vit E* (grupo 6) con respecto al grupo intoxicado pretratado con la dosis menor (grupo 4) y con respecto al grupo intoxicado que no recibió quimioprotección (grupo 2).

❖ **4.4.4. Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR**

Los valores de la actividad de la enzima **SOD** se vieron afectados tanto en hígado como en riñón por la MC aunque de forma diferente (grupo 2), así en el primero se produjo un aumento de la actividad del orden de 2,1 veces mientras que en el segundo ésta disminuyó 1,2 veces. En ambos órganos, las dos dosis de vit E ensayadas (grupos 4 y 6) fueron efectivas y consiguieron mantener la actividad de esta enzima en los mismos niveles que el grupo control (grupo 2). En branquias se experimenta una disminución significativa de la actividad de esta enzima en peces sólo intoxicados con MC, mientras que en peces pretratados con la vit E (grupos 4 y 6) no se observan cambios significativos. La administración de la vit E (grupos 4 y 6) produjo incrementos de la actividad SOD en comparación con los peces que no la recibieron (grupo 2) (**Figura FR-17**).

En hígado la actividad de la enzima **CAT** aumenta tanto en peces expuestos sólo a MC (grupo 2), del orden de 1,5 veces; como en los intoxicados pretratados con la dosis mas baja de vit E (grupo 4), del orden de 1,4 veces, en comparación con el grupo control (grupo 1); Los intoxicados pretratados con 700 mg de vitE/kg dieta (grupo 6) no muestran cambios significativos en la actividad de dicha enzima en comparación con su grupo control (grupo 5), además esta dosis de vitamina disminuyó de forma significativa los niveles de actividad en comparación con el grupo intoxicado no pretratado (grupo 2). En riñón se observa una disminución significativa (del orden de 1,2 veces) de la actividad CAT de peces expuestos sólo a MC (grupo 2), un aumento significativo (del orden de 1,9 veces) en los peces intoxicados pretratados con 200mg vitE/kg dieta (grupo 4) y no se produjeron cambios en los intoxicados pretratados con la dosis más alta de vitamina (grupo 6) en comparación con sus respectivos grupos

controles (grupos 1, 3 y 5). Se observó un aumento significativo de la actividad CAT del grupo intoxicado pretratado con la dosis más baja de vitamina (grupo 4) comparado con los no pretratados (grupo 2), así como comparado con los pretratados con la dosis más alta (grupo 6), del orden de 1,8 en ambos casos. En branquias aumentó la actividad CAT con respecto al grupo control (grupo 1) tanto en los peces expuestos sólo a MC (grupo 2) como en los pretratados con la dosis más baja del quimioprotector (grupo 4). Estos valores disminuían tras el pretratamiento con 700 mg vit E/kg dieta (grupo 6) resultando significativa con respecto al grupo intoxicado no pretratado (grupo 2) (**Figura FR-18**).

La actividad **GPx** experimentó un aumento significativo en hígado tanto en los peces sólo intoxicados con MC (grupo 2) como en los pretratados con ambas dosis de vit E (grupos 4 y 6) con respecto al grupo control (grupo 1), del orden de 1,5 veces en todos los casos. En riñón, sin embargo, disminuye dicha actividad con todos los tipos de tratamiento. Y en branquias se muestra una disminución de la actividad GPx en los peces no pretratados con vit E (grupo 2) y un aumento en los pretratados con ambas dosis de la vitamina (grupos 4 y 6) con respecto a sus correspondientes grupos control (grupos 1, 3 y 5) (**Figura FR-19**).

No se observan alteraciones significativas en la actividad **GR** de hígado y branquias. Sin embargo, en el riñón dicha actividad experimenta un importante descenso en todos los grupos con respecto al control (grupo 1). Además se produce un aumento significativo de la actividad de esta enzima en los grupos pretratados con el quimioprotector (grupos 4 y 6) comparados con el lote intoxicado (grupo 2) (**Figura FR-20**).

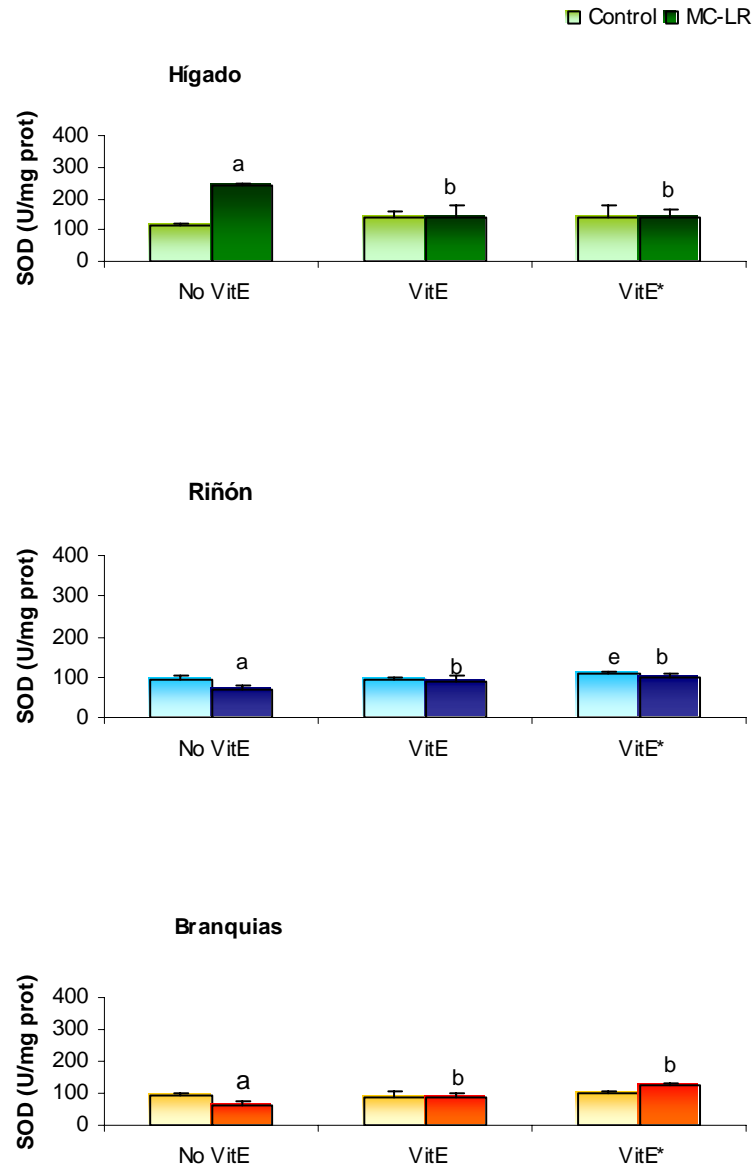


Figura FR-17: Valores de la actividad SOD (U/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 μ g/pez) por vía oral de forma aguda, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta). Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido (a) $p < 0,05$ para la comparación con el control no pretratado (grupo 1), (b) $p < 0,05$ para la comparación con el intoxicado no pretratado (grupo 2) y (e) $p < 0,05$ para comparar entre sí los dos grupos controles suplementados con dosis diferentes de vit E (grupos 3 y 5).

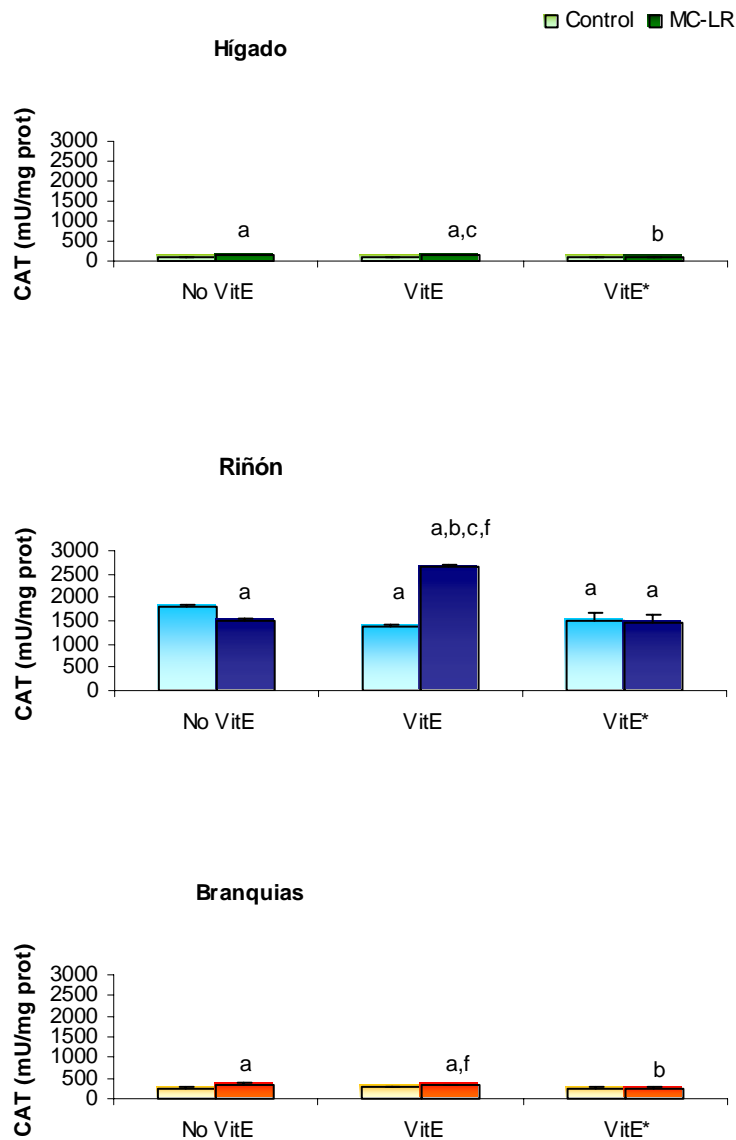


Figura FR-18: Valores de la actividad CAT (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 μ g/pez) por vía oral de forma aguda, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta). Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido (a) $p < 0,05$ para la comparación con el control no pretratado (grupo 1), (b) $p < 0,05$ para la comparación con el intoxicado no pretratado (grupo 2), (c) $p < 0,05$ para comparar el grupo intoxicado-vit E (200mg/kg dieta) con su control-vit E (grupos 3 y 4) y (f) $p < 0,05$ para comparar entre sí los grupos intoxicados suplementados con dosis diferentes de vit E (grupos 4 y 6).

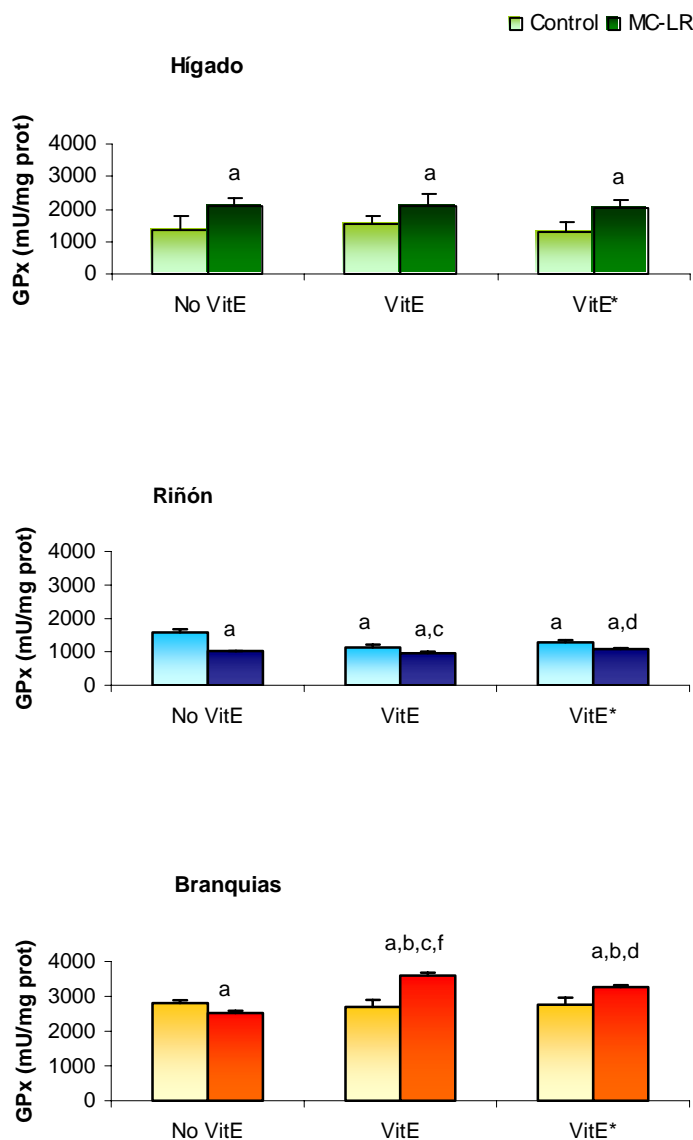


Figura FR-19: Valores de la actividad GPx (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 μ g/pez) por vía oral de forma aguda, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta). Los valores son expresados como la media \pm S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido (a) $p < 0,05$ para la comparación con el control no pretratado (grupo 1), (b) $p < 0,05$ para la comparación con el intoxicado no pretratado (grupo 2), (c) $p < 0,05$ para comparar el grupo intoxicado-vit E (200mg/kg dieta) con su control-vit E (grupos 3 y 4), (d) $p < 0,05$ para comparar el grupo intoxicado-vitE* (700mg/kg dieta) con su control-vitE* (grupos 5 y 6) y (f) $p < 0,05$ para comparar entre sí los grupos intoxicados suplementados con dosis diferentes de vit E (grupos 4 y 6).

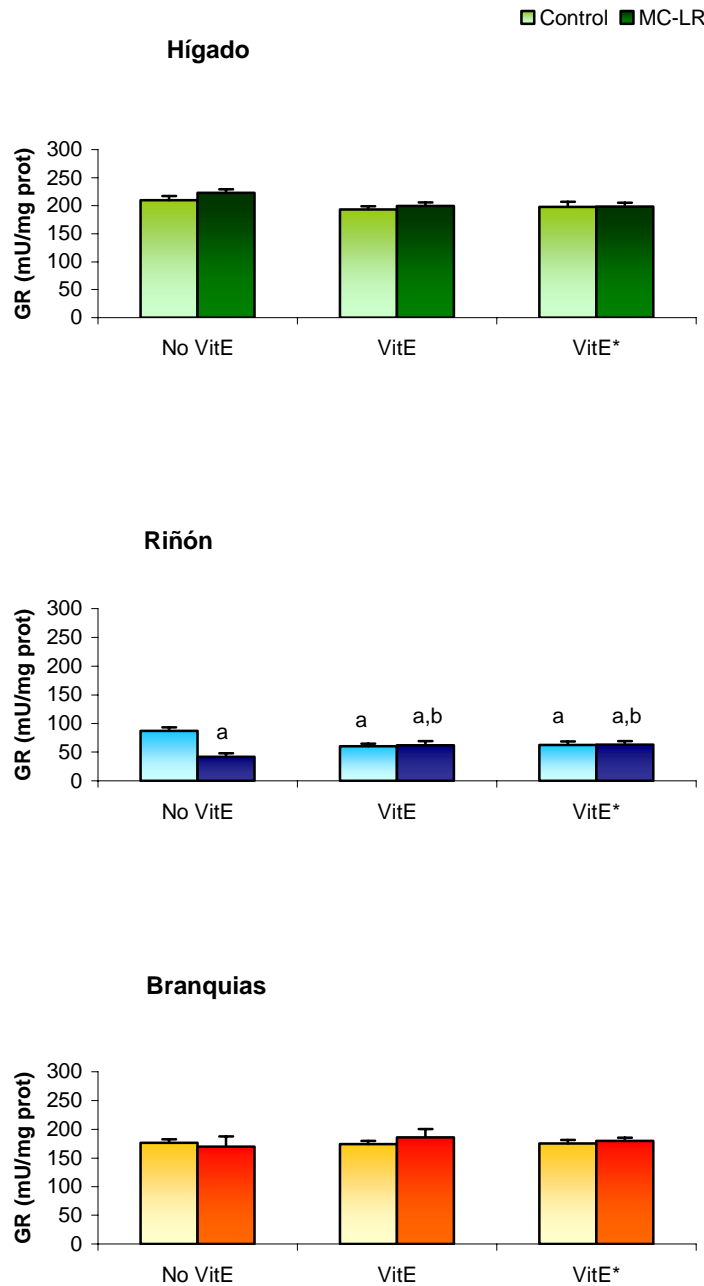


Figura FR-20: Valores de la actividad GR (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) por vía oral de forma aguda, suplementados o no, con diferentes dosis de vitamina E (vit E = 200mg/kg dieta y vit E* = 700mg/kg dieta). Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido (a) p<0,05 para la comparación con el control no pretratado (grupo 1) y (b) p<0,05 para la comparación con el intoxicado no pretratado (grupo 2).

❖ *4.4.5. Discusión de los resultados:*

Tras realizar los experimentos anteriormente descritos de los que se deduce que, efectivamente, las MC producen cambios tanto en la actividad de las enzimas antioxidantes como en los niveles de LPO en hígado, riñón y branquias de tilapias y que éstos dependen de la dosis administrada, periodo de exposición, vía de administración, etc., nos planteamos estudiar el efecto que tendría en estos parámetros un suplemento de antioxidantes, como es la vit E, en la dieta.

En este experimento, la dosis de 120 µgMC/pez produjo un incremento significativo de la LPO y una disminución general de la actividad de las enzimas estudiadas en riñón y branquias, aunque aumentan de forma significativa en hígado. Esto se puede explicar nuevamente porque el hígado es el órgano que posee mayor capacidad de defensa que lo previene del daño inducido.

Elegimos la vit E porque es un importante antioxidante involucrado en la protección de membranas frente al daño oxidativo. Los requerimientos de vit E en la dieta de tilapias dependen de distintos factores tales como el nivel de lípidos de la dieta y su grado de saturación, del estado de oxidación de los mismos, de la presencia de antioxidantes, etc. (Esterbauer y col., 1990; Huang y col., 2003). Ambas dosis de vit E muestran tener un efecto protector de los valores de LPO en todos los órganos estudiados. La vit E inhibe la fase de propagación de LPO atrapando los radicales libres. Su actividad antioxidante se basa en que pueden donar el hidrógeno que forma parte del grupo hidroxilo del anillo de cromano neutralizando los radicales peróxidos lipídicos (LOO[·]), creando así radicales tocoferoxilos más estables (Kelly y col., 1998). Éstos pueden restaurarse directamente a tocoferoles por ubiquinol o la vit C, y luego por el glutatión o ácido lipoico (vía vitC). La

influencia positiva de la vit E en estos biomarcadores ha sido documentada por Gehringer y col. (2003) quienes observaron una disminución de los valores de LPO en ratones expuestos a MC-LR por vía intraperitoneal después de haber sido suplementados con vit E en la dieta.

El papel protector de la vit E en la oxidación de proteínas hepáticas no está muy claro. Son escasos los trabajos sobre la influencia de este protector químico sobre estos parámetros en peces. Passi y col. (2004) sugieren que en peces tanto de agua dulce como salada, la LPO y la acumulación de proteínas oxidadas durante el envejecimiento está vinculado probablemente con una disminución del contenido en vit C y de antioxidantes lipofílicos (tales como la vit E) contenidos en el tejido muscular. En modelos de mamíferos, no obstante, los beneficios del suplemento de la vit E son más conocidos (Gulec y col., 2006).

La vit E mejora los niveles de la actividad CAT en todos los órganos estudiados mostrando una influencia dosis dependiente principalmente en hígado y riñón. Con la dosis mas baja se produce una respuesta enzimática defensiva en riñón, aumentando de forma considerable la actividad CAT, mientras en hígado esta actividad enzimática aumenta en menor grado. Y con la dosis más alta de vit E ensayada se conseguía mantener la actividad de esta enzima al mismo nivel en el grupo intoxicado que en su control. Estos resultados concuerdan con Pinho y col. (2005b) quienes además observaron que el pretratamiento del cangrejo de estuario (*Chasmagnathus granulatus*) con 600 mg/kg vit E era efectiva reduciendo la actividad CAT en las branquias posteriores.

La vit E muestra además protección de la actividad SOD, principalmente en hígado, y de las actividades GPx y GR. Los efectos beneficiosos sobre las actividades CAT, SOD y GPx podrían explicarse

debido a su papel captador de radicales libres. Venkasteswara y col. (2006) observaron una importante disminución de la actividad SOD de ratones tratados con níquel y cromo; por el contrario, un suplemento con 2 mg/kg de vit E con $\text{NiCl}_2 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ no produjo cambios significativos en el sistema antioxidante hepático comparado con el del grupo control, indicando así su papel protector.

Otros autores han mostrado la influencia del pretratamiento con vit E sobre el estrés oxidativo inducido por MC en diferentes biomarcadores. Pinho y col. (2005b) observaron un aumento de la actividad GST en cangrejos expuestos a MC, la cual disminuía con el pretratamiento de vit E. No obstante, Gehringer y col. (2003) detectaron una disminución de la actividad GST en ratones intoxicados con MC y esta disminución se reducía cuando los ratones recibían un suplemento de vit E. Además, observan protección del daño hepático, reflejado en una disminución significativa de los niveles séricos de alanina transaminasa (ALT). Igualmente, Al-Jassabi y Khalil (2006) apreciaron una importante protección frente a la letalidad de ratones expuestos a MC producida por la vit E. Ello concuerda con los resultados obtenidos previamente por Hermansky y col. (1991) que comprobaron una protección significativa de la vit E en la letalidad de ratones expuestos a MC. Autores como Weng y col. (2007) han demostrado que la vit E disminuye de forma significativa la generación de ERO y que inhibe la apoptosis en hepatocitos inducida por MC-LR y el daño hepático en ratón. El estrés oxidativo inducido por MC no sólo afecta a las proteínas y lípidos sino que también produce daño en el ADN. La vit E ha mostrado inhibir la formación de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OH-dG), de manera dosis dependiente, un biomarcador relevante en la carcinogénesis, en hígado de ratones expuestos a MC (Al-Jassabi y Khalil, 2006).

Éste es uno de los primeros estudios sobre los efectos de la suplementación con vit E en biomarcadores de estrés oxidativo tales como las actividades SOD, CAT, GPx, GR, LPO y oxidación de proteínas después de una exposición a MC en peces. La literatura científica muestra que la mayoría de los estudios acerca de los efectos protectores de la vit E sobre la toxicidad inducida por MC han sido realizados en mamíferos. Ya que los peces y otros organismos acuáticos están expuestos a MC de forma natural tanto en el medio ambiente como en acuicultura, sería importante investigar en esta línea para establecer la utilidad potencial de quimioprotectores similares a la vit E como medida preventiva o terapéutica para peces que viven o se cultivan en aguas contaminadas de forma crónica con MC.

4.5. EXPOSICIÓN AGUDA (DOSIS ÚNICA)/ VÍA ORAL (TRITURADO)/ MC-LR / UNA DOSIS DE VITAMINA E (700 mg/kg dieta)/ SACRIFICIO A LAS 24, 48 Y 72 HORAS

❖ *4.5.1. Características generales de los peces*

Tras la exposición aguda de tilapias, pretratadas con vit E (700 mg vit E/kg dieta) y sin pretratar, con el liofilizado de células de cianobacterias en una dosis de 120 µg MC-LR/ pez por vía oral, no se observó mortandad alguna tras los periodos de observación de 24, 48 y 72 horas. En la **Tabla TR-8** se exponen los pesos relativos y su contenido en proteínas de los órganos estudiados en peces tratados (pretratados o no con vit E) con respecto a sus correspondientes grupos control.

Resultados y Discusión

ÓRGANO 24 HORAS	CONTROL 24 HORAS	INTOXICADO 24 HORAS	CONTROL-Vit E (700 mg/kg) 24 HORAS	INTOXICADO- Vit E (700 mg/kg) 24 HORAS
Hígado g/10 g peso corporal mg prot/g hígado	0,440±0,060 10,50±1,44	0,170±0,020*** 11,94±3,10	0,380±0,068 7,53±0,60	0,280±0,040 7,50±0,65
Riñón g/10 g peso corporal mg prot/g riñón	0,009±0,002 203,00±20,00	0,020±0,002* 234,00±39,40	0,013±0,001 274,50±54,00	0,015±0,002 197,50±30,50
Branquias g/10 g peso corporal mg prot/g branquias	0,356±0,050 8,60±1,85	0,330±0,013 11,52±1,77	0,360±0,010 7,09±1,61	0,340±0,016 6,19±0,66

Tabla TR-8: Características generales de los peces control y los expuestos al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/ pez) pretratados con 700 mg vitamina E/kg dieta y sacrificados a las 24 horas tras la exposición. Los niveles de significación observados han sido * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ del grupo intoxicado comparado con su correspondiente grupo control.

Resultados y Discusión

ÓRGANO 48 HORAS	CONTROL 48 HORAS	INTOXICADO 48 HORAS	CONTROL-Vit E (700 mg/kg) 48 HORAS	INTOXICADO- Vit E (700 mg/kg) 48 HORAS
<i>Hígado</i> g/10 g peso corporal mg prot/g hígado	0,128±0,008 31,50±3,50	0,130±0,022 23,19±5,12	0,124±0,010 39,60±10,00	0,154±0,031 28,30±1,70
<i>Riñón</i> g/10 g peso corporal mg prot/g riñón	0,028±0,004 410,00±50,00	0,021±0,004 314,00±58,00	0,014±0,002 236,50±24,50	0,013±0,001 285,00±35,70
<i>Branquias</i> g/10 g peso corporal mg prot/g branquias	0,430±0,108 12,37±0,68	0,374±0,028 11,48±3,00	0,343±0,012 13,92±2,19	0,360±0,020 8,76±2,31

Tabla TR-9: Características generales de los peces control y los expuestos al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/ pez) pretratados con 700 mg vitamina E/kg dieta y sacrificados a las 48 horas tras la exposición.

Resultados y Discusión

ÓRGANO 72 HORAS	CONTROL 72 HORAS	INTOXICADO 72 HORAS	CONTROL-Vit E (700 mg/kg) 72 HORAS	INTOXICADO- Vit E (700 mg/kg) 72 HORAS
Hígado g/10 g peso corporal mg prot/g hígado	0,116±0,018 42,00±3,46	0,093±0,007 39,32±5,39	0,104±0,017 40,33±5,23	0,093±0,008 46,60±9,60
Riñón g/10 g peso corporal mg prot/g riñón	0,017±0,005 348,00±68,72	0,011±0,002 333,60±65,80	0,013±0,001 329,33±30,00	0,013±0,002 298,00±37,75
Branquias g/10 g peso corporal mg prot/g branquias	0,416±0,014 11,35±1,01	0,410±0,050 8,64±1,88	0,365±0,045 11,74±1,15	0,330±0,031 13,32±0,75

Tabla TR-10: Características generales de los peces control y los expuestos al liofilizado de células de cianobacterias (120 µg MC-LR/ pez) pretratados con 700 mg vitamina E/kg dieta y sacrificados a las 72 horas tras la exposición.

Se produjeron diferencias significativas en los pesos relativos de hígado y riñón de los peces que fueron sólo intoxicados y sacrificados a las 24 horas (grupo 2) con respecto a los de su grupo control (grupo 1). Y sin embargo, no se mostraron cambios del contenido de proteínas en ninguno de los órganos estudiados como ocurría en casos anteriores (**Tabla TR-8**).

❖ *4.5.2. Medida de la LPO*

Después de un periodo de exposición al tóxico de 24 horas (grupo 2), se observa un aumento significativo de los niveles de LPO en todos los órganos estudiados. Tras un pretratamiento con la vit E (grupo 4) estos niveles no manifiestan alteraciones significativas ni en riñón ni en branquias y aunque en hígado sí experimentan un aumento significativo, éste es menor que en el caso de los peces intoxicados sin pretratamiento con la vitamina. Los niveles normales de LPO se recuperan a partir de las 48 horas en hígado, riñón y branquias en peces pretratados o no con vit E (grupos 6, 8, 10 y 12) (**Figura FR-21**).

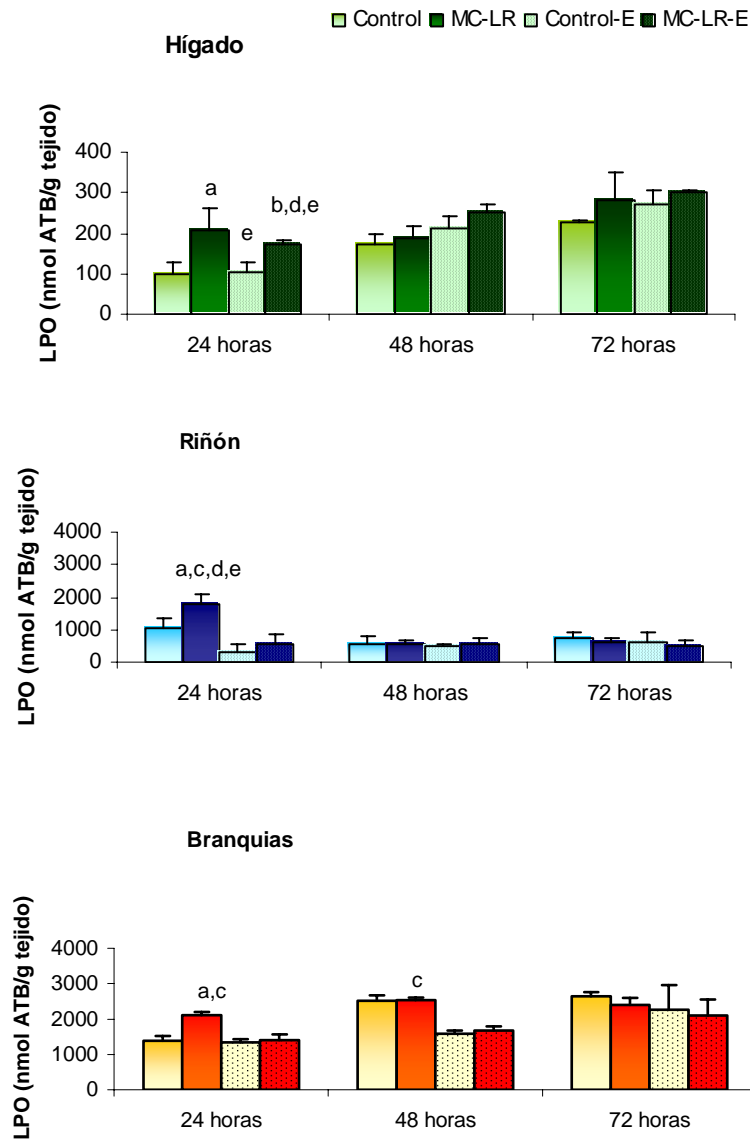


Figura FR-21: Valores de LPO (nmol ATB/g tejido) en hígado, riñón y branquias de peces controles y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas). Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido (a) $p < 0,05$ para el grupo intoxicado sin vit E (grupo 2) comparado con su control (grupo 1), (b) $p < 0,05$ grupo intoxicado suplementado con vit E (grupo 4) comparado con su control (grupo 3), (c) $p < 0,05$ grupo intoxicado comparado con el intoxicado suplementado con vit E para un mismo periodo experimental (grupos 2-4 para 24h y 6-8 para 48h) y (d) $p < 0,05$ al comparar grupos sometidos a un mismo tratamiento pero con un periodo experimental diferente (24 y 48 horas) y (e) para 24-72 horas.

❖ **4.5.3. Medida de la oxidación de proteínas: determinación de grupos carbonilos**

Periodo experimental	Nº Grupo experimental	Grupo experimental	nmoles grupos carbonilos/mg proteína
24 horas	1	Control	23 ± 1
	2	Intoxicado	27 ± 2 ^a
	3	Control-vitE	20 ± 1
	4	Intoxicado-vitE	26 ± 2 ^b
48 horas	5	Control	20 ± 3
	6	Intoxicado	25 ± 3
	7	Control-vitE	23 ± 3
	8	Intoxicado-vitE	23 ± 2
72 horas	9	Control	24 ± 2
	10	Intoxicado	25 ± 3
	11	Control-vitE	22 ± 2
	12	Intoxicado-vitE	25 ± 3

Tabla TR-11: Valores de oxidación de proteínas (nmoles grupos carbonilos/mg proteína) en peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con 700mg/kg dieta de vitamina E para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas). Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido (a) p<0,05 para el grupo intoxicado sin vit E (grupos 2) comparado con su control (grupos 1) y (b) p<0,05 grupo intoxicado suplementado con vit E (grupos 4) comparado con su control (grupos 3).

Se observa un aumento significativo de la oxidación de proteínas en hígado de los grupos intoxicados, suplementados (grupo 4) o no con vit E (grupo 2), con respecto a sus correspondientes grupos controles (grupos 3 y 1) a las 24 horas tras la exposición. Sin embargo, no se experimentan diferencias significativas en la oxidación de proteínas en este órgano a partir de las 48 horas de observación para ninguno de los grupos (pretratados o no con vit E) (**Tabla TR-11**).

❖ **4.5.4. Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx y GR**

En un periodo de tiempo de 24 horas tras la exposición la actividad de la enzima **SOD** de peces expuestos a MC (grupo 2) aumentó y disminuyó de forma significativa en hígado y riñón, respectivamente. Sin embargo, este parámetro no se vio alterado en branquias. A las 48 horas (grupo 6) los órganos afectados son riñón y branquias con una disminución y un aumento significativos de la actividad SOD, respectivamente. No se producen cambios enzimáticos significativos en ninguno de los órganos tras las 72 horas (grupo 10). El suplemento de vit E (grupo 4, 8 y 12) consigue restaurar los niveles normales de esta actividad enzimática en todos los órganos y para todos los periodos de exposición ensayados. (**Figura FR-22**)

En la **Figura FR-23** observamos que la actividad de la enzima **CAT** de peces expuestos a MC aumentó y disminuyó de forma significativa en hígado y riñón, respectivamente para los periodos de 24 (grupo 2) y 48 horas (grupo 6). La vit E consigue restaurar los niveles de esta actividad enzimática a partir de las 48 horas (grupo 8) en hígado y de las 24 horas (grupo 4) en riñón. Las branquias experimentaron un aumento significativo de la actividad de esta enzima sólo a 48 horas tras la exposición (grupo 6). El pretratamiento con vit E consigue restaurar la afectación de la actividad CAT en este órgano.

Tanto para la **GPx** como para la **GR** las mayores alteraciones enzimáticas se observaron a las 24 horas de la exposición (grupo 2) en hígado y riñón. En hígado los aumentos de actividad GPx y GR observados se restauran a las 24 horas de la exposición con el pretratamiento de vit E (grupo 4). A las 48 horas la vit E (grupo 8) consigue disminuir los valores de GR de los peces intoxicados. En riñón el pretratamiento con la vit (grupo

4) no consiguió recuperar la actividad GPx a las 24 horas, sin embargo sí se recuperó la actividad de la enzima GR para este mismo periodo en este órgano. En las branquias no se observaron cambios significativos en estas actividades enzimáticas para ninguno de los periodos estudiados. A las 48 y 72 horas de la exposición no se observan diferencias significativas en los diferentes grupos experimentales suplementados (grupos 8 y 12) o no (grupos 6 y 10) con vit E (**Figura FR-24 y FR-25**).

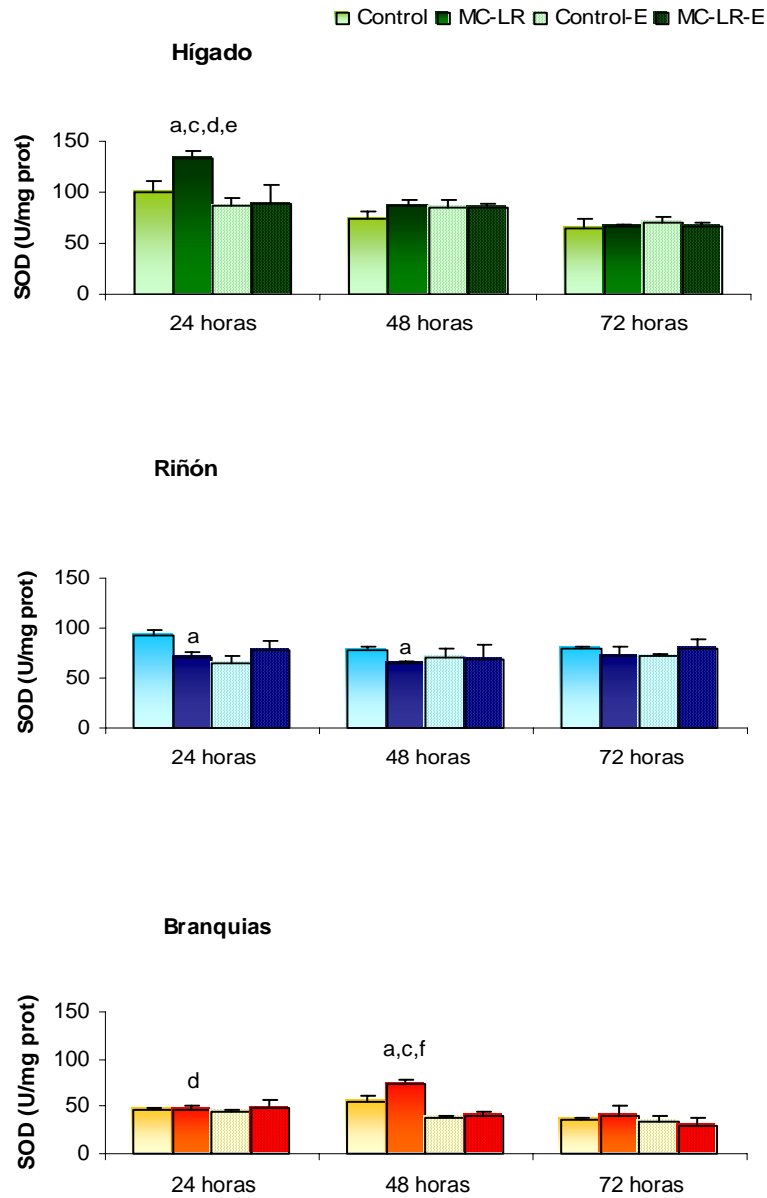


Figura FR-22: Valores de la actividad SOD (U/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas). Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación han sido (a) $p < 0,05$ para el grupo intoxicado sin vit E (grupos 2 para 24h y 6 para 48h) comparado con su control (grupos 1 para 24h y 5 para 48h), (c) $p < 0,05$ grupo intoxicado comparado con el intoxicado suplementado con vit E para un mismo periodo experimental (grupos 2-4 para 24h y 6-8 para 48h), (d) $p < 0,05$ al comparar grupos sometidos a un mismo tratamiento pero durante un periodo experimental diferente (24 y 48 horas), (e) para 24-72 horas y (f) para 48-72 horas.

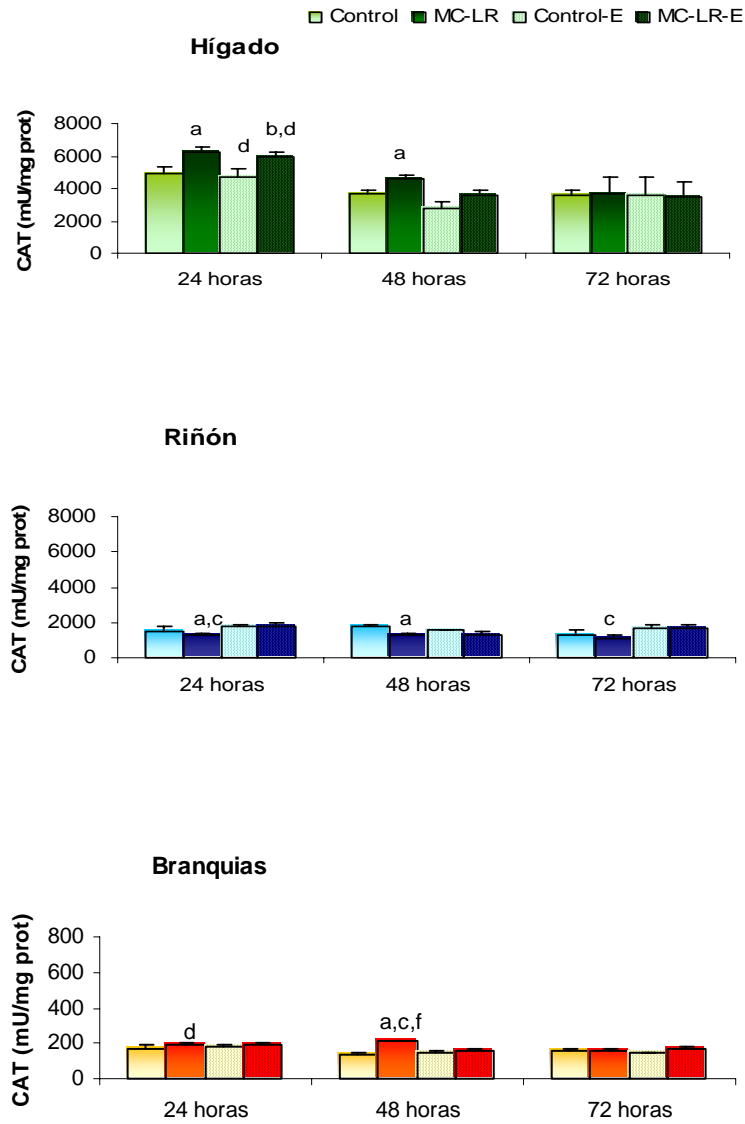


Figura FR-23: Valores de la actividad CAT (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas). Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación han sido (a) $p < 0,05$ para el grupo intoxicado sin vit E (grupos 2 para 24h y 6 para 48h) comparado con su control (grupos 1 para 24h y 5 para 48h), (c) $p < 0,05$ grupo intoxicado comparado con el intoxicado suplementado con vit E para un mismo periodo experimental (grupos 2-4 para 24h, 6-8 para 48h y 10-12 para 72h), (d) $p < 0,05$ al comparar grupos sometidos a un mismo tratamiento pero durante un periodo experimental diferente (24 y 48 horas) y (f) para 48-72 horas.

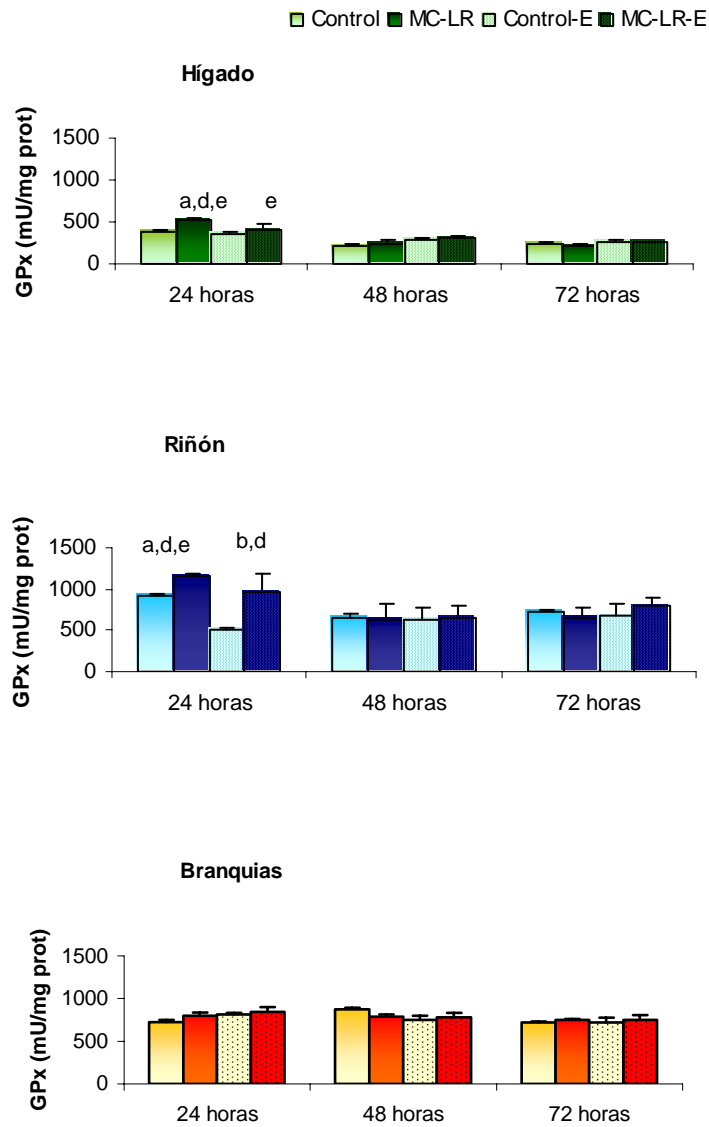


Figura FR-24: Valores de la actividad GPx (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas). Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación han sido (a) $p < 0,05$ para el grupo intoxicado sin vit E (grupo 2) comparado con su control (grupo 1), (b) $p < 0,05$ grupo intoxicado suplementado con vit E (grupo 4) comparado con su control (grupo 3), (d) $p < 0,05$ al comparar grupos sometidos a un mismo tratamiento pero durante un periodo experimental diferente (24 y 48 horas) y (e) para 24-72 horas.

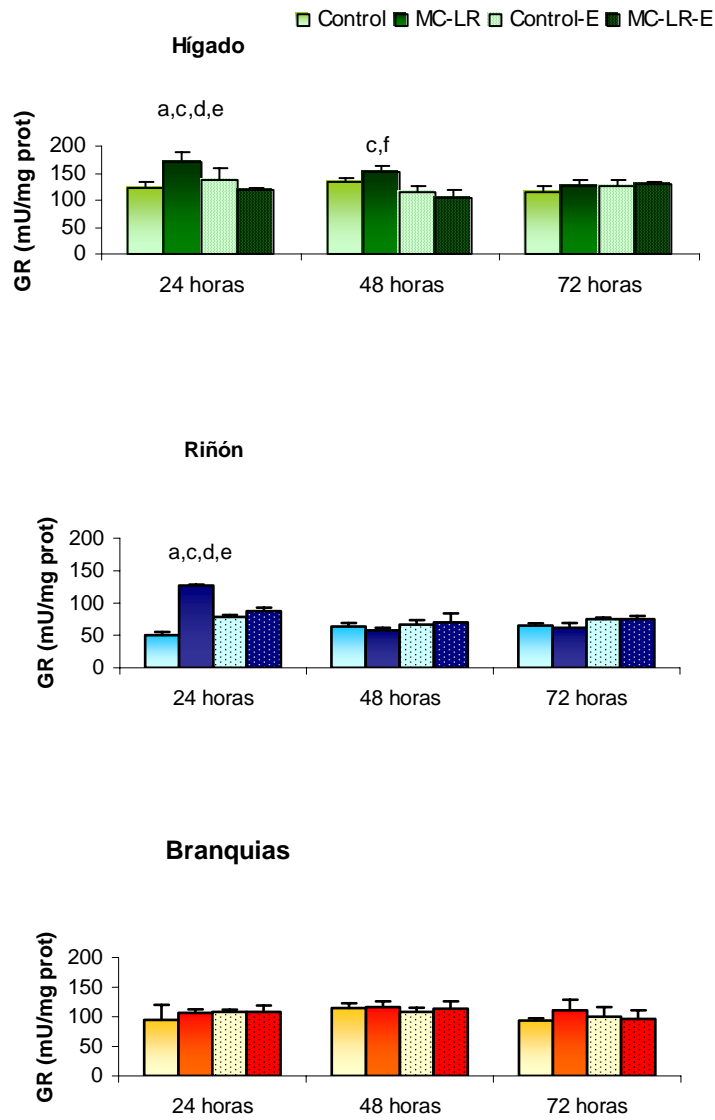


Figura FR-25: Valores de la actividad GR (mU/mg proteína) en hígado, riñón y branquias de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no, con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas). Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación han sido (a) $p < 0,05$ para el grupo intoxicado sin vit E (grupo 2) comparado con su control (grupo 1), (c) $p < 0,05$ grupo intoxicado comparado con el intoxicado suplementado con vit E para un mismo periodo experimental (grupos 2-4 para 24h y 6-8 para 48h), (d) $p < 0,05$ al comparar grupos sometidos a un mismo tratamiento pero durante un periodo experimental diferente (24 y 48 horas), (e) para 24-72 horas y (f) para 48-72 horas.

❖ 4.5.5. Medida de Glutación reducido (GSH)

Periodos experimentales	Nº grupo experimental	Grupo experimental	nmoles GSH/g tejido
24 horas	1	Control	2370 ± 464
	2	Intoxicado	1160 ± 279 ^a
	3	Control-vitE	2337 ± 371
	4	Intoxicado-vitE	1750 ± 300 ^b
48 horas	5	Control	1640 ± 180
	6	Intoxicado	1292 ± 241
	7	Control-vitE	2088 ± 297
	8	Intoxicado-vitE	2041 ± 100
72 horas	9	Control	2572 ± 374
	10	Intoxicado	2000 ± 140
	11	Control-vitE	2110 ± 682
	12	Intoxicado-vitE	1873 ± 367

Tabla TR-12: Valores de glutación reducido (GSH) (nmoles GSH /g tejido) en hígado de peces control y peces expuestos a floraciones de cianobacterias (MC-LR, 120 µg/pez) de forma aguda, suplementados o no con vitamina E (700mg/kg dieta) para tres periodos experimentales (24, 48 y 72 horas). Los valores son expresados como la media ± S.E. (n=8). Los niveles de significación observados han sido (a) p<0,05 para el grupo intoxicado sin vit E (grupos 2) comparado con su control (grupos 1) y (b) p<0,05 grupo intoxicado suplementado con vit E (grupos 4) comparado con su control (grupos 3).

Como se muestra en la tabla anterior, los niveles de GSH medidos en hígado de los peces intoxicados, pretratados (grupos 4, 8 y 12) o no con vitamina E (grupos 2, 6 y 10), fueron menores que los de sus correspondientes grupos controles (grupos 3, 7, 11 y 1, 5, 9 respectivamente) para los tres periodos experimentales (grupos 4 y 2), aunque esta disminución tan sólo fue significativa a las 24 horas de exposición. Dentro de este periodo el pretratamiento con la vit E, aunque no logró restaurar los niveles del antioxidante (grupo 4 respecto al 3), hizo que su disminución fuese menos pronunciada que la experimentada por el grupo intoxicado no pretratado (grupo 2 respecto al 1).

❖ *4.5.6. Discusión de los resultados:*

Después de comprobar que ambas dosis de vit E ensayadas tienen un efecto protector en la actividad de las enzimas antioxidantes y niveles de LPO de tilapias a las 24 horas tras la exposición a MC-LR, en particular la dosis más alta; nos planteamos estudiar la influencia del tiempo de protección de dicha dosis de vit E (700 mg/kg dieta).

Sustancias antioxidantes como los flavonoides quercetina, silibina y morina, muestran un efecto protector de forma tiempo dependiente (1 día y 3 días tras la exposición) sobre la hepatotoxicidad inducida por la MC-LR en ratón. Estos compuestos consiguen restaurar con el tiempo alteraciones en las actividades enzimáticas ALT, AST, LDH, CAT y fosfatasa de proteínas producidas por estas toxinas (Jayaraj y col., 2007).

No obstante, según la bibliografía consultada, sólo Pinho y col. (2005b) contemplan el estudio de la actividad antioxidante de la vit E frente al tiempo. Observaron que la vit E producía una recuperación del aumento significativo de las actividades enzimáticas CAT y GST producido en branquias de cangrejos por la MC-LR tras 7 días de exposición. Sin embargo, a los 2 días de la exposición no observaron dichos cambios en estas actividades, pero sí un aumento de los grupos sulfidrilos no proteicos en los grupos sólo suplementados con la vit E.

En nuestro estudio, el aumento de los niveles de LPO producido en los tres órganos analizados a las 24 horas de la exposición a MC, conseguía restaurarse en riñón y branquias tras un suplemento con 700 mg vit E/kg dieta. En hígado, sin embargo, aunque la vit E consiguió disminuir dicha elevación de los niveles de LPO para este periodo, fueron necesarias 48 horas para alcanzar los valores medidos en el grupo control. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en tilapias alimentadas

durante 14 días con una dieta que contenía un 12% de aceites oxidados. Un suplemento de 300 UI vit E/kg dieta generaba un aumento de la capacidad antioxidante así como una disminución de la LPO (Huang y Huang, 2004).

Con el tiempo, no se observan diferencias significativas de los niveles de LPO en hígado, riñón y branquias de los peces expuestos (suplementados o no con la vit E), en comparación con los de sus respectivos grupos control. Ello puede ser debido a una posible depuración de las MC en el tiempo, tal y como comprobamos en el tercer experimento de esta Tesis. Además, el tiempo consiguió disminuir el aumento significativo producido en la oxidación de proteínas tras 24 horas de la exposición. Este aumento fue observado en hígado de peces tanto suplementados como no suplementados con vit E, por lo que no se demuestra la acción protectora de la vit E con respecto a este parámetro.

En relación con las enzimas antioxidantes, son muchos los estudios que revelan la relación del estrés oxidativo en la patogénesis de las MC en diferentes modelos experimentales (Bury y col., 1996; Wiegand y col., 1999; Ding y col., 2001a; Ding y Ong., 2003; Li y col., 2003; Bouaïcha y Maatouk., 2004; Moreno y col., 2003b; Pinho y col., 2005a; Li y col., 2005a), como ya se ha comentado previamente.

En hepatocitos de carpa común expuestos a MC-LR se ha comprobado un incremento de ERO y depleción del GSH, además de un aumento de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx (Li y col., 2003). El presente estudio revela un aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y GR en hígado en 24 horas tras la exposición, dichos resultados son similares a los observados por Li y col. (2005b) en hepatocitos de carpa.

En riñón, se produce una disminución de las actividades SOD y CAT tras los periodos de 24 y 48 horas y, sin embargo, las actividades GPx y GR aumentan a las 24 horas post-exposición. Estas diferencias en la respuesta pueden ser debidas al tipo de órgano afectado. El hígado es el principal órgano destoxicador y acumulador de MC en peces (Dawson, 1998; Magalhaes y col., 2001; Malbrouck y col., 2003; 2004; Jang y col., 2004), lo que hace que tenga una mayor capacidad de respuesta aumentando así la actividad de su sistema enzimático antioxidante.

En branquias sólo se produce un aumento en las actividades SOD y CAT, a las 48 horas tras la exposición al tóxico. No se detectaron cambios significativos en las actividades GPx ni GR de este órgano. Estos pequeños cambios podrían explicarse porque las MC se acumulan menos en este órgano (del orden de 0,8%) en comparación con el hígado (4%) y con el riñón (1,5%) (Malbrouck y Kestemont, 2005).

En los tres órganos, los cambios producidos en las actividades SOD y CAT ocurren de forma paralela, aumentan ó disminuyen simultáneamente. Esto puede explicarse por la interrelación existente entre estas dos enzimas en el mecanismo de acción del sistema antioxidante, actuando de forma conjunta en la primera parte del proceso. Dicha interrelación también ha sido demostrada por Dimitrova y col. (1994).

Tras el suplemento con vit E, la mayoría de las actividades antioxidantes volvieron a sus valores basales tanto en hígado (SOD, GPx y GR) como en riñón (CAT, SOD y GR). Sin embargo, fue necesario un periodo de 48 horas tras la exposición, para restaurar la actividad de la enzima CAT en hígado y GPx en riñón. El aumento de las actividades enzimáticas en branquias también se restauró en los peces suplementados con vit E para el periodo de 48 horas.

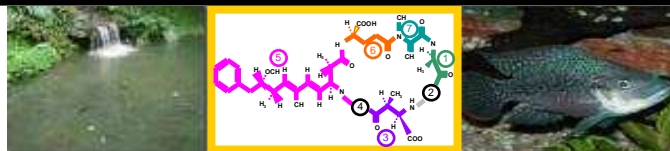
En concordancia con estos resultados, Pinho y col. (2005b) demostraron que la vit E era eficaz combatiendo el estrés oxidativo inducido por MC en cangrejos de río tal y como se ha comentado previamente.

Con respecto a los niveles de GSH, Xu y col. (2000) observaron una disminución de la concentración de este antioxidante en hígado de carpa expuesta a MC-LR por vía i.p. Resultados parecidos fueron obtenidos por Runnegar y col. (1994) en hepatocitos primarios de rata expuestos a cilindrospermopsina, observando una reducción de la concentración del GSH. De forma similar a estos trabajos, en este estudio observamos una disminución significativa del GSH en el hígado de los peces expuestos a MC-LR (suplementados o no con vit E) a las 24 horas. Esta disminución del GSH tras la exposición a MC-LR puede explicarse bien por un aumento de su utilización en los procesos de detoxificación celular, bien por una disminución de su síntesis, o por ambos mecanismos. Se sabe que el glutatión juega un papel importante en procesos de detoxificación mediante su conjugación con MC-LR a través de la GST en plantas y animales expuestos (Pflugmacher y col., 1998b). Hindi y col. (2003), observaron una disminución del glutatión hepático en ratones 30 minutos después de su tratamiento con tres microcistinas diferentes (MC-LR, MC-RR y MC-YR). No obstante, en nuestro estudio, la disminución del GSH fue menor para el grupo que recibió el suplemento de vit E en comparación con el no pretratado. Este hecho podría explicarse porque la vit E aumenta la concentración de sulfidrilo no proteicos (NP-SH) cuando son incorporados a los tejidos (Dandapat, 2000; Pinho y col., 2005b) y éstos, pueden reemplazar al GSH como antioxidante.

No se produjeron cambios significativos en los valores de este parámetro en ninguno de los peces expuestos en función del tiempo (48 y 72 h). Li y col. (2007a) tampoco observaron cambios significativos del GSH en

hígado de carpas tratadas con MC durante ninguno de los periodos de observación (1, 3, 12, 24 y 48 horas). Ellos apuntaban que la alta tolerancia de las carpas a las MC, podría deberse a un alto nivel basal de este antioxidante en el hígado.

DISCUSIÓN GENERAL



Con el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral, se dio comienzo a las investigaciones sobre estrés oxidativo inducido por MC en peces, ya que todos los modelos experimentales utilizados hasta el momento habían sido mamíferos (Bury y col., 1996; Wiegand y col., 1999; Ding y col., 2001b; Ding y Ong., 2003; Moreno y col., 2003b; Bouaïcha y Maatouk., 2004).

En general el estrés oxidativo inducido por MC en peces se manifiesta por:

- 1- Un aumento de los niveles de LPO.
- 2- Alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes con respecto a sus valores basales, siendo la SOD y la CAT las que muestran mayor grado de alteración.

El órgano más afectado por las MC es el hígado, lo que podría explicarse por la organotropidad de estas toxinas por dicho órgano, lo que hace además que estén clasificadas como hepatotoxinas (Dawson, 1998; Milutinovic y col., 2003; Fisher y col., 2005). En branquias, sin embargo, es donde se produce una menor alteración de las actividades de las enzimas antioxidantes, aunque sí muestran un aumento de los valores de LPO. Ésto podría deberse a que este órgano es menos eficiente que el hígado y el riñón en el proceso de neutralización del daño oxidativo (Sayeed y col., 2003; Ahmad y col., 2004).

Los efectos de las MC sobre los biomarcadores de estrés oxidativo estudiados, varían en función de diversos parámetros:

1- Dosis de exposición: los efectos tóxicos observados son mayores a las dosis más elevadas de MC ensayadas. Así, dosis repetidas de 60 µg MC-LR/pez durante 14 días produjeron menos alteraciones que una sola dosis de 120 µg MC-LR/pez. Además, las dosis elevadas producen daños en las proteínas enzimáticas mientras que dosis bajas inducen una respuesta defensiva. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación en ratas expuestas a MC-LR pura de forma aguda por vía i.p. (Moreno y col., 2005a).

2- Vía de exposición: el tratamiento con MC produjo estrés oxidativo en las tilapias expuestas tanto por vía oral como por vía i.p. No se puede hacer una comparación directa de los resultados obtenidos por ambas vías de exposición en nuestro estudio, ya que se utilizaron diferentes variables en ambos experimentos (diferentes dosis y lotes de peces distintos). Hasta donde nosotros conocemos, no se han realizado estudios en los que se puedan comparar la influencia de las diferentes vías de administración de MC en peces. En este sentido, otros estudios apuntan que tanto las branquias como el tejido epitelial de los peces de agua dulce, suponen una barrera en el transporte de MC (Tencalla, 1994; Bury y col., 1995) lo que podría indicar que por la vía de inmersión los efectos tóxicos producidos pudieran ser menores.

En mamíferos, la toxicidad aguda de la MC-LR por la vía oral e i.p. se estima en un factor que oscila entre 30 a 100. De forma similar, la DL₅₀ de extractos de *Microcystis* en ratón fue de 50 a 100 veces superior por vía oral que por inyección i.p. (Falconer, 1991; Kotac y col., 1993).

3- Forma de administración: la forma de administración de la dosis influye de manera que: 1º) si la dosis es única, los efectos tóxicos disminuyen con el tiempo debido a la puesta en marcha de mecanismos

depuradores en el pez; 2º) si la dosis se administra de forma repetida, los efectos tóxicos se mantienen en el tiempo.

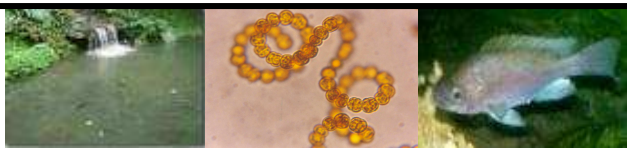
La forma de administración del liofilizado junto con la dieta también muestra su influencia en los efectos tóxicos, siendo éstos mayores cuando éste es triturado previamente con la comida de los peces. El proceso de triturado produce la rotura celular del liofilizado, lo que aumenta la biodisponibilidad de las MC en el pez, teniendo como consecuencia directa la producción de un mayor efecto tóxico.

4- Tiempo de exposición: en unas mismas condiciones, el tiempo de exposición a las MC de forma continuada aumenta los daños oxidativos producidos en los peces. Así a los 14 días de exposición continuada a 60 µg MC-LR/pez/día no se aprecia ninguna alteración en estos parámetros y, en cambio, tanto la actividad de las enzimas antioxidantes como la LPO se ven afectadas en los distintos órganos tras un periodo de exposición de 21 días.

5- La variante de MC: de los congéneres de MC utilizados, se observa una mayor afectación de los biomarcadores de estrés oxidativo hepáticos producidos por la MC-LR frente a los producidos por la MC-RR. Sin embargo, tanto el riñón como las branquias se vieron afectadas por ambas MC. Esto podría deberse a que mientras la eliminación de la primera de ellas ocurre principalmente en el intestino, la degradación de la segunda lo hace en el hígado (Li y col., 2007c). La toxina MC-RR aumentó más las actividades enzimáticas SOD y CAT en riñón, que en hígado y branquias. Esta mayor susceptibilidad del riñón a la MC-RR podría explicarse porque MC-RR, debido a su estructura química, posee mayor hidrofilia que la MC-LR. La característica química de esta MC podría facilitar su distribución en el riñón, resultando este órgano más afectado que el hígado y las branquias.

6- Aplicación de antioxidantes en la dieta (vitamina E): se observan efectos protectores de la vitamina E sobre los parámetros de estrés oxidativo de forma dependiente de la dosis (200 mg vit E/kg dieta y 700 mg vit E*/kg dieta). Ésto se ha observado principalmente a las 24 horas tras la exposición al tóxico ya que tras periodos mayores (48 y 72 horas) los órganos conseguían reducir dichas alteraciones sin necesidad de aporte vitamínico, ya que las MC eran depuradas por el pez. Esto está de acuerdo con otros autores que apuntan que la vitamina E, tomada como suplemento en la dieta, puede tener un efecto protector frente a la exposición crónica a MC-LR en ratones (Gehring y col., 2003). Nuestros resultados apuntan a que la vitamina E también tiene un efecto positivo sobre la toxicidad de las MC en exposiciones agudas.

CONCLUSIONES



De los resultados obtenidos en este estudio se obtienen las conclusiones siguientes:

PRIMERA- El sistema de defensa antioxidante endógeno de tilapias expuestas, bajo condiciones de laboratorio, por vía oral a dosis repetidas de liofilizados de células de cianobacterias con un contenido de 60 µg MC-LR/pez/día se altera de forma tiempo dependiente aumentando de forma significativa la actividad de las diferentes enzimas antioxidantes, siendo las actividades SOD y CAT las más afectadas.

SEGUNDA- De forma similar, los niveles de LPO aumentan de forma significativa en hígado, riñón y branquias de los peces tratados con MC-LR durante 21 días, principalmente cuando la exposición a MC es mediante la forma triturada del liofilizado junto con la dieta.

TERCERA- La exposición de tilapias a 500 µg/kg MC-LR y 500 µg/kg MC-RR por vía i.p. produce una inducción del estrés oxidativo como respuesta adaptativa, así como un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes, principalmente SOD y CAT, y manifestaciones tóxicas mediadas por oxidantes tales como la LPO, principalmente producida por MC-LR en hígado y por ambas MC en riñón y branquias.

CUARTA- La MC-LR produce, en igualdad de condiciones experimentales, mayores cambios tanto en el sistema enzimático de defensa antioxidante como en los niveles de LPO que su congénere la MC-RR.

QUINTA- A una dosis aguda de 120 µg MC-LR/pez por vía oral produjo una mayor alteración de los valores de LPO en hígado a las 24 horas que a las 72 horas. Sin embargo, el riñón y las branquias necesitaron

un periodo de 72 horas para manifestar dichas alteraciones de forma significativa. Este hecho podría explicarse por la organotropidad de las MC por el hígado.

SEXTA- El aumento significativo observado en los valores de LPO y de oxidación de proteínas en hígado transcurridas 24 horas desde una exposición aguda oral de 120 µg MC-LR/pez es mayor que a las 72 horas. Esto indica una destrucción inicial del sistema de defensa antioxidante y su posterior recuperación.

SÉPTIMA- La recuperación de los daños producidos en el sistema de defensa antioxidante tras una exposición oral aguda de 120 µg MC-LR/pez pueden ser explicados además, por el aumento de las actividades CAT y GR en hígado después de 72 horas de la exposición. Sin embargo, es necesario un mayor periodo de tiempo para la síntesis de novo de proteínas ya que ni las actividades de las enzimas antioxidantes en riñón y branquias ni las actividades SOD y GPx en hígado, mostraron una clara recuperación funcional.

OCTAVA- La vitamina E protege del estrés oxidativo inducido por MC en tilapias expuestas por vía oral en peces pretratados de forma dosis dependiente y sacrificados a las 24 horas de la exposición. La mayor protección de la dosis más elevada (700 mg vit E/kg dieta) se demuestra en una menor alteración de los niveles de las enzimas antioxidantes, LPO y GSH en los peces tratados con la vitamina en comparación con los peces control.

NOVENA- La protección proporcionada por el suplemento de vitamina E en la dieta (700 mg vit E/kg dieta) en peces tratados de forma

aguda con 120 µg MC-LR/pez se manifiesta tras 24 horas de la exposición, ya que en este periodo es en el que se producen diferencias significativas de los niveles de las enzimas antioxidantes, LPO y GSH en todos los órganos estudiados (hígado, riñón y branquias). Tras los periodos de 48 y 72 horas de la exposición estos parámetros se recuperan de forma natural, no apreciándose el efecto protector de la vitamina E.

DÉCIMA- Podría afirmarse que, a la dosis empleada (120 µg MC-LR/pez) y en las condiciones descritas en este estudio experimental, la depuración de MC llevada a cabo en el hígado comienza a ser efectiva a partir de las 48 horas de la exposición y que además, esta depuración no se ve acelerada por un pretratamiento con vitamina E.

UNDÉCIMA- De forma global, el estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad inducida *in vivo* por la MC-LR en tilapia (*Oreochromis sp.*) con independencia de la vía de administración (oral, intraperitoneal), forma de administración (triturado, sin triturar), tiempo de exposición (agudo, crónico) y de la dosis administrada.

DUODÉCIMA- Por último, una aplicación práctica del presente estudio podría ser el uso de la vitamina E como medida preventiva o terapéutica frente a la toxicidad inducida por MC en peces.

BIBLIOGRAFÍA



- Abe T, Kakyō M, Sakagami H, Tokui T, Nishio T, Tanemoto M, Nomura H, Hebert SC, Masuno S, Kondo H, Yawo H (1998). Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *Journal of Biological Chemistry* 273, 22395-22401.
- Aboal M, Puig MA (2005). Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicon* 45, 509-518.
- Adams GE, Posener ML, Bisby RH, Cundall RB, Key JR (1979). Free radical reactions with proteins and enzymes: the inactivation of pepsin. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 35, 497-507.
- Aguete EC, Gago-Martinez A, Leao JM, Rodriguez-Vazquez JA, Menard C, Lawrence JF (2003). HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction. *Talanta* 59, 697-705.
- Ahmad I, Pacheco M, Santos MA (2004). Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 290-302.
- Albay M, Matthiensen A, Codd GA (2005). Occurrence of Toxic Blue-Green Algae in the Kucukcekmece Lagoon (Istanbul, Turkey). *Environmental Toxicology* 20, 277-284.
- Al-Jassabi S (2005). Biochemical studies on the role of lycopene in the protection of mice against microcystin toxicity. *Chemistry and Ecology* 21, 143-148.
- Al-Jassabi S, Khalil AM (2006). Microcystin-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by Melatonin, vitamin C and vitamin E in mice. *Biochemistry* 10, 1115-1119.
- Altuntas I, Delibas N, Sutcu R (2002a). The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: Role of vitamins E and C. *Human & Experimental Toxicology* 21, 681-685.
- Altuntas I, Delibas N, Demirci M, Kilinc I, Tamer N (2002b). The effects of methidathion on lipid peroxidation and liver enzymes: role of vitamins E and C. *Archives of Toxicology* 76, 470-473.
- Amorim A, Vasconcelos V (1999). Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 37, 1041-1052.
- Andersen RJ, Luu HA, Chen DZX, Holmes CFB, Kent ML, LeBlanc M, Taylor FJRM, Williams DE (1993). Chemical and biological evidence links microcystins to salmon netpen liver disease. *Toxicon* 31, 1315-1323.
- Arteel GE, Sies H (2001). The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10, 153-158.
- Arthur J (1995). Non - Glutathione peroxidase functions of Selenium. En; Proceedings of the Symposium On Biotechnoloin Feed Industry (13^o: 1997: Nottingham). Memories of the XII Symposium on biotechnology in the feend industry. Nottingham: Alltech; p. 143-14-54. 1995.
- Arthur KA (2002). The Effects of the Toxic Cyanobacteria *Lyngbya majuscula* on the Green Turtle *Chelonia mydas*. Annual report for Great Barrier Reef Marine Park Authority, p. 14.

- Aune T (1989). Toxicity of marine and freshwater algal biotoxins towards freshly prepared hepatocytes. *Mycotoxins and Phycotoxins* 461-468
- Azevedo SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181-182, 441-446.
- Baganz D, Staaks G, Steinberg C (1998). Impact of the cyanobacterial toxin, Microcystin-LR on behaviour of zebra fish, *Dario rerio*. *Water Research* 32, 948-952.
- Bagnyukova TV, Storey KB, Lushchak VI (2003). Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *Journal of Thermal Biology* 28, 21-28.
- Baker RTM, Davies SJ (1997). Modulation of tissue α -tocopherol in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), fed oxidised oils, and the compensatory effect of supplemental dietary vitamin E. *Aquaculture Nutrition* 3, 91-98.
- Ballot A, Krienitz A, Kotut K, Wiegand C, Pflugmacher S (2005). Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae* 4, 139-150.
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews Biochemistry* 22, 111-180.
- Barco M, Lawton LA, Rivera J, Caixach J (2005). Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance chromatography. *Journal of Chromatography A* 1074, 23-30.
- Barco M, Rivera J, Caixach J (2002). Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 959, 103-111.
- Basha PS, Rani AU, (2003). Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 218-221.
- Batista T, de Sousa G, Suput JS, Rahmani R, Suput D (2003). Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 65, 85-91.
- Beasley VR, Lovell RA, Holmes KR, Walcott HE, Schaeffer DJ, Hoffmann WE, Carmichael WW (2000). Microcystin-LR decreases hepatic and renal perfusion, and causes circulatory shock, severe hypoglycemia, and terminal hyperkalemia in intravascularly dosed swine. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 61, 281-303.
- Beattie KA, Ressler J, Wiegand C, Krause E, Codd GA, Steinberg CE, Pflugmacher S (2003). Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquatic Toxicology* 62, 219-226.
- Beers RF, Sizer IW (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry* 195, 133-140.
- Belda Sanchís J, Puertas J, Boshch Morell F, Romero Gómez B, Marín N, Díaz-Llopis M, Romero Gómez F (1999). Determinación de los niveles de glutatión, enzimas del sistema glutatión y productos de la peroxidación lipídica en el cristalino cataroso y en el cristalino sano. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, Nº 11.

- Bell SG, Codd GA. (1994). Cyanobacterial toxins and human health. *Reviews in Medical Microbiology* 5, 256-264.
- Benavides ST, Silva MF (1965). Seleniosis. (2 Ed.) Bogotá: Instituto Geográfico Agustín Codazzi p, 151.
- Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Free Radical Biology and Medicine* 2, 419-444.
- Benson JM, Hutt JA, Rein K, Boggs SE, Barra EB, Fleming LE (2005). The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure *Toxicol* 45, 691-698.
- Best JH, Eddy FB, Codd GA (2001). Effects of purified microcystin-LR and cell extracts of *Microcystis* strains PCC 7813 and CYA 43 on cardiac function in brown trout (*Salmo trutta*) alevine. *Fish Physiology and Biochemistry* 24, 171-178.
- Best JH, Eddy FB, Codd GA (2003). Effects of *Microcystis* cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in *rainbow trout* and *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquatic Toxicology* 64,419-426.
- Bickel H, Lyck S (2001). Importance of energy charge for microcystin production. En: Chorus I (Ed.) *Cyanotoxins-Occurrence, Causes, Consequences*. Springer, Berlin p, 133-141.
- Bires JA, Michna P, Bartko J, Pistl Z, Juhasova (1993). Zinc, selenium and copper supplementation by means of reticulo-rumen pellets and its effect on the cellular and humoral immune response in sheep. *Veterinnární Medicína* 38, 597-607.
- Blom JF, Robinso JA, Jüttner F (2001). High grazer toxicity of [D-Asp³, (E)-Dhb⁷] microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicol* 39,1923-1932.
- Blom JF, Jüttner F (2005). High crustacean toxicity of microcystin congeners does not correlate with high protein phosphatase inhibitory activity. *Toxicol* 46, 465-470.
- Botes DP, Wessels PL, Kruger H, Runnegar MTC, Santikarn S, Smith RJ, Barna JCJ, Williams DH (1985). Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society* 1, 2747-2748.
- Botha N, Gehringer MM, Downing T, van de Venter M, Shepard EG (2004a). The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicol* 43, 85-92.
- Botha N, van de Venter M, Downing TG, Shepard EG, Gehringer MM (2004b). The effect of intraperitoneally administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice. *Toxicol* 43, 251-254.
- Böttcher G, Chorus I, Ewald S, Hintze T, Walz N (2001). Lightlimited growth and microcystin content of *Planktothrix agardhii* and *Microcystis aeruginosa* in turbidostats. En: Chorus I (Ed.) *Cyanotoxins-Occurrence, Causes, Consequences*. Springer, Berlin p, 115-133.
- Bouaïcha N, Maatouk I, Vincent G, Levi Y (2002). A colorimetric and fluorometric microplate assay for the detection of microcystin-LR in drinking water without preconcentration. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1677-1683.

- Bouaïcha N, Maatouk I (2004). Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicology Letters* 148, 53-63.
- Boudier C, Bieth JG (1994). Oxidized mucus proteinase inhibitor: a fairly potent neutrophil elastase inhibitor. *The Biochemical Journal* 303, 61-68.
- Bowen SH (1982) Feeding and digestion and growth-qualitative considerations. En: Pullin RSV, Lowe-McConnell RH (Ed.) *The biology and culture of tilapias*. Manila, Philippines p, 141-156.
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Briand JF, Jacket S, Bernard C, Humbert JF (2003). Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 34, 361-377.
- Brusick D (1987). Genetic risk assessment. *Journal of the air Pollution Control Association* 37, 795.
- Bu YZ, Li XY, Zhang BJ, Chung IK, Lee JA (2006). Microcystins cause embryonic toxicity in mice. *Toxicol* 48, 966-972.
- Burton GW, Ingold KU (1986). Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts Chemical Research* 19, 194-201.
- Bury NR, Eddy FB, Codd GA (1996a). Stress responses of brown trout, *Salmo trutta* L, to the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 11, 187-193
- Bury NR, Flik G, Eddy FB, Codd GA (1996b). The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca²⁺ transport and Na⁺/K⁺-ATPase in tilapia gills. *Experimental Biology* 199, 1319-1326.
- Bury NR, Eddy FB, Codd GA (1995). The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout. *Journal of Fish Biology* 46, 1042-1054.
- Bury NR, McGeer JC, Eddy FB, Codd GA (1997). Liver damage in brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial hepatotoxin MC-LR via the dorsal aorta. *Journal of Fish Diseases* 20, 209-215.
- Bury NR, Codd GA, Wendelaar SE, Flik G (1998a). Fatty acids from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with potent inhibitory effects on fish gills Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Experimental Biology* 201, 81-89.
- Bury NR, Newlands AD, Eddy FB, Codd GA (1998b). *In vivo* and *in vitro* intestinal transport of ³H-microcystin-LR a cyanobacterial toxin, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 42, 139-148.
- Calberg I, Mannervik B (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal Biological and Chemistry* 250, 5475-80.

- Cameán A, Moreno IM, Ruiz MJ, Pico Y (2004). Determination of microcystins in natural blooms and cyanobacterial strain cultures by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380, 537-544.
- Cameán AM, Molina R, Moreno IM, Pichardo S, Jos A, Moyano R (2005). Biochemical and pathological characterization of Microcystin-induced liver and kidney damage in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Journal of Physiological Biochemistry* 61, 201-202.
- Campbell DL, Lawton LA, Beattie KA, Codd GA (1994). Comparative Assessment of the Specificity of the Brine Shrimp and Microtox Assays to Hepatotoxic (Microcystin-LR-Containing) Cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9, 71-77.
- Carbis CR, Rawlin GT, Mitchell GF, Anderson JW, McCauley I (1996). The histopathology of carp, *Cyprinus carpio*, L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *Journal of Fish Diseases* 19, 199-207.
- Carbis CR, Rawlin GT, Grant P, Mitchell GF, Anderson JW, McCauley I (1997). A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *Journal of Fish Diseases* 20, 81-91.
- Carmichael WW (1992). Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 445-459.
- Carmichael WW, Falconer IR (1993). Diseases related to freshwater blue green algal toxins, and control measures. En: Falconer IR (Ed.) *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press, London p, 187-209.
- Carmichael WW (1994). The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* 270, 78-86.
- Carmichael WW (1996a). Toxic *Microcystis* and the environment. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (Ed.) *Toxic Microcystis*. Boca Raton p, 1-11.
- Carmichael WW (1996b). Cyanobacterial Toxins. En: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella A.D (Ed.) *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides n° 33. UNESCO 1995 p, 163-175.
- Carmichael WW (1997). The Cyanotoxins. En: *Advances in Botanical Research*. Academic Press, London p, 211-256.
- Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109, 663-668.
- Castaño A, Tarazona JV (1995). The use of cultured cells in environmental toxicology: in vitro toxicity tests. *Cell Biology in Environmental Toxicology* 11, 279-288.
- Castaño A, Gómez-Lechón MJ (2005). Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. *Toxicology in Vitro* 19, 695-705.
- Cazenave J, Wunderlin DA, Bistoni MA, Amé MA, Krause E, Pflugmacher S, Wiegand C (2005). Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in

- Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis* a field and laboratory study. *Aquatic Toxicology* 75, 178-190.
- Cazenave J, Bistoni MA, Pesce SF, Wunderlin DA (2006). Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic Toxicology* 76, 1-12.
- Chen J, Song L, Dai J, Gan N, Liu Z (2004). Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon* 43, 393-400.
- Chen J, Xie P (2005). Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon* 45, 615-625.
- Chen J, Xie P, Zhang D, Lei H (2007). *In situ* studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a biomanipulation fish bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environmental Pollution* 147, 150-157.
- Cheng WH, Fu YX, Porres JM, Ross DA, Lei XG (1999). Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids and protein. *FASEB Journal* 13, 1467-1475.
- Chorus I, Bartram J (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, World Health Organization.
- Chorus I, Falconer IR, Salas HJ, Bartram J (2000). Health Risk Caused by Freshwater Cyanobacteria in Recreational Waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health B* 3, 323-347.
- Chorus I (2001). Cyanotoxin occurrence in freshwaters-a summary of survey results from different countries. En: Chorus I (Ed.) *Cyanotoxins*. Umweltbundesamt, Berlin, Germany p, 75-82.
- Codd GA (1995). Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance. *Water Science Technology* 32, 149-156.
- Codd GA, Ward CJ, Beatle KA, Bell SG (1999). Widening Perceptions of the Occurrence and Significance of Cyanobacterial Toxins. En: Peschek GA, Löffelhardt W, Schmetterer G (Ed.) *The Phototrophic Prokaryotes*. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York p, 623-632.
- Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund M (1995). Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *Journal of Pineal Research* 19, 123-6.
- Craig M, Luu HA, McCready T, Williams DE, Andersen RJ, Holms CFB (1996). Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporiun and microcystins with type-1 and 2A protein phosphatases. *Biochemistry and Cell Biology* 74, 569-578.
- Creasia DA (1990). Acute inhalation toxicity of microcystin-LR with mice. *Toxicon* 28, 605.
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* 9, 169-179.
- Dandapat J, Chainy GB, Rao KJ (2000). Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiol C* 127, 101-115.

- Datta S, Jana BB (1998). Control of bloom in a tropical lake. Grazing efficiency of some herbivorous fishes. *Journal Fish Biology* 53, 12-24.
- Davies MJ (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochemistry and Biophysical* 1703, 93-109.
- Dawson RM (1998). The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36, 953-962.
- De Figueiredo D, Azeiteiro UM, Esteves SM, Goncalves FJM, Pereira MJ (2004). Microcystin-producing blooms- a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 151-163.
- Deans RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 324, 1-18.
- Demple B, Levin J (1991). Repair systems for radical-damaged DNA. En: Sies H (Ed.) *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, New York p, 119-154.
- Dempster PW, Beveridge MCM, Baird, DJ (1993). Herbivory in the tilapia *Oreochromis niloticus*: a comparison of feeding rates on phytoplankton and periphyton. *Journal of Fish Biology* 43, 385-392.
- Dimitrova MST, Tsinova V, Velcheva V (1994). Combined effects of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 108, 43-46.
- Ding Q, Dimayuga E, Keller JN (2006). Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxidants and Redox Signaling* 8, 163-172.
- Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Ong CN (1998a). Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environmental Research Section A* 78, 12-18.
- Ding WX, Shen HM, Shen Y, Zhu HG, Ong CN (1998b). Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environmental Health Perspectives* 106, 409-413.
- Ding WX, Shen HM, Ong CN (2000a). Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environmental Health Perspectives* 108, 605-609.
- Ding WX, Shen HM, Ong CN (2000b). Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 32, 547-555.
- Ding WX, Shen HM, Ong CN (2001a). Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 64, 507-519.
- Ding WX, Shen HM., and Ong CN (2001b). Pivotal Role of Mitochondrial Ca²⁺ in Microcystin-induced Mitochondrial Permeability Transition in Rat Hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, 1155-1161.
- Ding WX, Shen HM, Ong CN (2002). Calpain Activation after Mitochondrial Permeability Transition in Microcystin-Induced Cell Death in Rat Hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291, 321-331.

- Directiva 2000/60/EC del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de febrero de 2006, relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño.
- Directiva 98/83/CE, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas de consumo humano.
- Dow CS, Swoboda UK (2000). Cyanotoxins. En: Whitton BA, Potts M (Ed.) *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands p, 613-632.
- Dunlop RA, Rodgers KJ, Dean RT (2002). Recent development in the intracellular degradation of oxidized proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 894-906.
- Eriksson JE, Meriluoto JAO, Kujari HP, Al-Layl KJ, Codd GA (1988). Cellular effects of cyanobacterial peptide toxins. *Toxicity Assessment* 3, 511-517.
- Eriksson JE, Meriluoto JAO, Lindholm T (1989). Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the fresh water mussel *Anodonta cygnea*. *Hydrobiologia* 183, 211-216.
- Eriksson JE, Gronberg L, Nygard S, Slotte JP, and Meriluoto JA (1990). Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochemistry and Biophysical Acta* 1025, 60-66.
- Eriksson JE, Toivola DM, Reinikainen M, Rabergh CMI, Meriluoto JAO (1994). Testing of toxicity in cyanobacteria by cellular assays. *The Royal Society of Chemistry* 149, 15-84.
- Ernst B, Hitzfeld B, Dietrich D (2001). Presence of *Planktothrix* sp. and cyanobacterial toxins in lake Ammersee, Germany and their impact on Whitefish (*Coregonus lavaretus* L). *Environmental toxicology* 16, 483-488.
- Ernst B, Dietz L, Hoeger SJ, Dietrich DR (2005). Recovery of MC-LR in fish liver tissue. *Environmental Toxicology* 20, 449-458.
- Ernst B, Hoeger SJ, O'Brien E, Dietrich DR (2006). Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquatic Toxicology* 79, 31-40.
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonetal. *Methods in Enzymology* 186, 407-421.
- Falconer IR (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality* 6, 177-184.
- Falconer IR, Choice A, Hosja W (1992a). Toxicity of edible mussels (*Mytilus edulis*) growing naturally in an estuary during a water bloom of the blue-green alga *Nodularia spumigena*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 7, 119-123.
- Falconer IR, Dornbusch M, Moran G, Yeung SK (1992b). Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicon* 30, 790-793.
- Falconer IR, Burch MD, Steffensen DA, Choice M, Coverdale OR (1994). Toxicity of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to

- growing pigs, as an animal model for human injury and risk assesment. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9, 31-139.
- Falconer IR (1999). An overview of problems caused by toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology* 14, 5-12.
- Falconer IR (2007). Cyanobacterial toxins present in *Microcystis aeruginosa* extracts-More than microcystin! *Toxicon* 50, 585-588.
- Fastner J, Heinze R, Chorus I (1995). Microcystins-content, hepatotoxicity and cytotoxicity of cyanobacteria in some german water bodies. *Water Science and Technology* 32, 165-270.
- Fastner J, Neumann U, Wirsing B, Weckesser J, Wiedner C, Nixdorf B, Chorus I (1999). Microcystins (Hepatotoxic Heptapeptide) in German Fresh Water Bodies. *Environmental Toxicology* 14, 13-22.
- Fastner J, Erhard M, Döhren H (2001). Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* sp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5069-5076.
- Favier AE (1995). How to demonstrate the occurrence of an oxidative stress in humans? En: Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre J-L, (Ed.) *Analysis of free radicals in Biological Systems*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag p, 99-117.
- Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE (1999). The Toxicity of Cyanobacterial Toxins in the Mouse: I Microcystin-LR. *Human and Experimental Toxicology* 18, 162-167.
- Fiorentini C, Falzano L, Rivabene R, Fabri A, Malorni W (1999). Acetylcysteine protects epithelial cells against the oxidative imbalance due to *Clostridium difficile* toxins. *FEBS Letters* 453, 124-128.
- Fischer TW, Scholz G, Knoell B, Hipler UC, Elsner P (2004). Melatonin suppresses reactive oxygen species induced by UV irradiation in leukocytes. *Journal of Pineal Research* 37, 107-112.
- Fischer WJ, Dietrich DR (2000a). Pathological and biochemical characterization of Microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 164, 73-81.
- Fischer WJ, Dietrich DR (2000b). Toxicity of the cyanobacterial cyclic heptapeptide toxins microcystin-LR and -RR in early life-stages of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Aquatic Toxicology* 49, 189-198
- Fischer WJ, Hitzfeld BC, Tencalla F, Eriksson JE, Mikhailov A, Dietrich DR (2000). MC-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology Science* 54, 365-373.
- Fischer WJ, Altheimera S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 257-263.
- Fitzgeorge RB, Clark SA, Keevil CW (1994). Routes of intoxication. En: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E (Ed.) *1st International Symposium on Detection*

- Methods for Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins. The Royal Society of Chemistry. Cambridge p, 69-74.
- Fitzgerald DJ (2001). Cyanotoxins and human health-overview. En: Chorus I (Ed.) Cyanotoxins-Occurrence, Causes, Consequences. Springer, Berlin p, 179-190.
- Fladmark KE, Serres MH, Larsen NL, Yasumoto T, Aune T, Doskeland SO (1998). Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon* 36, 1101-1114.
- Flury T, Heinze R, Wirsing B, Fastner J, Neumann U, Weckesser J (2001). Cyanotoxins En: Chorus I (Ed.) Springer-Verlag, Berlin, Germany p, 330-339, 350-353.
- Francis G (1878). Poisonous Australian lake. *Nature* 18, 11-12.
- Frank CAP (2002). Microcystin-producing cyanobacteria in recreational waters in southwestern Germany. *Environmental Toxicology* 17, 361-366.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, (2006). DNA repair and mutagenesis. Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T (Ed.) ASM Press, Washington D. C., p, 1118.
- Frigg M, Prabucki AL, Ruhdel EU (1990). Effect of dietary vitamin E levels on oxidative stability of trout fillets. *Aquaculture* 84, 145-158.
- Fu WY, Chen JP, Wang XM, Xu LH (2005). Altered expression of p53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR in vivo and *in vitro*. *Toxicon* 46, 171-177.
- Fucci L, Oliver CN, Coon MJ, Stadtman ER (1983). Inactivation of key enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 1521-1525.
- Fujiki H, Sueoka E, Suganuma M (1996). Carcinogenesis of Microcystin. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H,C.R.C (Ed.). *Toxic Microcystis*. Press, Boca Raton p, 203-232.
- Gaete V, Canelo E, Lagos N, Zambrano F (1994). Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon* 32, 121-127.
- Gantchev TG, Van Lier J (1995). Catalase inactivation following photosensitization with tetrasulfonated metallophthalocyanines. *Photochemistry and Photobiology* 62, 123-134.
- García-Villada L, Rico M, Altamirano M, Sanchez-Martin L, Lopez-Rodas V, Costas E (2004). Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulfate as algacide. *Water Research* 38, 2207-2213.
- Gehring MM, Downs KS, Downing TG, Naudé RJ, Shephard EG (2002). An investigation into the effect of selenium supplementation on microcystin hepatotoxicity. *Toxicon* 41, 1-8.
- Gehring MM, Govender S, Shah S, Downing TG (2003). An investigation of the role of vitamin E in the protection of mice against microcystin toxicity. *Environmental Toxicology* 18, 142-148.
- Gehring MM (2004). Microcystin-LR and okadaic acid cellular effects: a dualistic response. *FEBS Letters* 557, 1-8.

- Ghosh S, Khan SA, Wickstrom M, Beasley V (1995). Effects of Microcystin-LR on Actin and the Actin-Associated Proteins α -Actinin and Talin in Hepatocytes. *Natural Toxins* 3, 405-414.
- Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC, Kuriyan J (1995). Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376, 745-753.
- Gorham PR, Carmichael WW (1988). Hazards of freshwater blue-green algae (cyanobacteria). En: Lembi CA, Waaland JR (Ed.) *Algae and Human Affairs*. Cambridge University Press, Cambridge p, 403-431.
- Gulec M, Gurel A, Armutcu F (2006). Vitamin E protects against oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 290, 61-67.
- Guzman RE, Solter PF (1999). Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. *Toxicology Pathology* 27, 582-588.
- Hagenbuch B, Meier PJ (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609, 1-18.
- Hagenbuch B, Meier PJ (2004). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Archives* 447, 653-665.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280, 1-8.
- Harada KI, Ogawa K, Matsuura K, Murata H, Suzuki M, Watanabe MF, Itezono Y, Nakayama N (1990). Structure determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chemical Research in Toxicology* 3, 473-481.
- Harada KI, Ogawa K, Matsuura K, Nagai H, Murata H, Suzuki M, Itezono Y, Nakayama N, Shirai M, Nakano M (1991). Isolation of two toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon* 29, 479-489.
- Harris CM, Stone WL (1987). The effects of *in vitro* lipid peroxidation on the activity of liver microsomal glutathione S-transferase from rats supplemented or deficient in antioxidants. *Life Science* 42, 415-420.
- Heinze R, Fastner J, Neumann U, Chorus I (2001) Testing cyanobacterial toxicity with primary rat hepatocyte and cell-line assays. En: *Cyanotoxins*. Chorus I (Ed.). Umweltbundesamt, Berlin, Germany, pp 317-324, 350-353.
- Henning M, Rohrlack T, Kohl JG (2001). Responses of *Daphnia galeata* fed with *Microcystis* strains with and without microcystins. En: *Cyanotoxins-Occurrence, Causes, Consequences*. Springer, Berlin p, 266-280.
- Hermansky SJ, Stohhs SJ, Eldeen ZM, Roche VF, Mereish KA (1991). Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *Journal of Applied Toxicology* 11, 65-74.
- Hernández M, Macía M, Padilla C, Del Campo EF (2000). Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherent by cyanopeptide toxins. *Environmental Research Section A* 84, 4-68.

- Hesse K, Kohl JG (2001). Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa*. En: Chorus I (Ed.) Cyanotoxins-Occurrence, Causes, Consequences. Springer, Berlin p, 104-115.
- Hindi MM, White CA, Kozub RL (2003). Double K-shell ionization probability in 54Mn. *Physical Review C* 68, 014306.
- Hiripi L, Nagy L, Kalmár T, Kovács A, Vörös L (1998). Insect (*Locusta migratoria migratorioides*) test monitoring the toxicity of cyanobacteria. *Neurotoxicology* 19, 605-608.
- Hitzfeld BC, Lampert CS, Spaeth N, Mountfort D, Kaspar H, Dietrich DR (2000). Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Toxicon* 38, 1731-1748.
- Hold GL, Smith EA, Rappé MS, Maas EW, Moore ERB, Stroempl C, Stephen JR, Prosser J, Birkbeck TH, Gallacher S (2001). Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. *FEMS Microbiology Ecology* 37, 161-173.
- Hooser SB (2000). Fulminant hepatocyte apoptosis in vivo following Microcystin-LR administration to rats. *Toxicology Pathology* 28, 726-733.
- Howard JA, (1972). Absolute rate constants for reactions of oxyl radicals. *Advances in free radical chemistry* 4, 49-173.
- Huang CH, Chang RJ, Huang SL, Chen WL (2003). Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 134, 265-270.
- Huang CH, Huang SL (2004). Effect of dietary vitamin E on grow, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, fed oxidized oil. *Aquaculture* 237, 381-389.
- Humpage AR, Hardy SJ, Moore EJ, Froschio SM, Falconer IR (2000). Microcystin (Cyanobacterial Toxins) in Drinking Water Enhance the Growth of Aberrant Crypt Foci in the Mouse Colon. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 61, 155-165.
- Huynh-Delerme C, Edery M, Huet H, Puisieux-Daob S, Bernard C, Fontaine JJ, Crespeau F, de Luze A (2005). Microcystin-LR and embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. I. Effects on the digestive tract and associated systems. *Toxicon* 46, 16-23.
- Ito E, Kondo F, Harada K (1997). Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of Microcystin-LR. *Toxicon* 35, 231-239.
- Ito E, Kondo F, Harada K (2001). Intratracheal administration of microcystin-LR, and its distribution. *Toxicon* 39, 265-271.
- Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ (1994). Expression Cloning of a Rat Liver Na⁺-Independent Organic Anion Transporter. *National Academy of Sciences* 91, 133-137.
- Jacquet C, Thermes V, de Luze A, Puisieux-Dao S, Bernard C, Joly JS, Bourrat F, Edery M (2004). Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicon* 43, 141-147.

- Jang MH, Ha K, Lucas MC, Joo GJ, Takamura N (2004). Changes in Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. *Aquatic Toxicology* 68, 51-59.
- Janna-Para G, Schwob I, Feuillade M (2004). Occurrence of toxic *Planktothrix rubescens* blooms in lake Nantua, France. *Toxicon* 43, 279-285.
- Jayaraj R, Deb U, Bhaskar ASB, Prasad GBKS, Rao PVL (2007). Hepatoprotective efficacy of certain flavonoids against microcystin induced toxicity in mice. *Environmental Toxicology* 22, 472-479.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes BC, Liho DAM, Lyra TM, Barreto VST, Azevedo SMFO, Jarvis WR (1998). Liver Failure and Death After Exposure to Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *The New England Journal of Medicine* 338, 873-878.
- Jungmann D (1992). Toxic compounds isolated from *Microcystis* PCC7806 that are more active against *Daphnia* than two microcystins. *Limnology and Oceanography* 37, 1777-1783.
- Jurczak T, Tarczynska M, Izydorczyk K, Mankiewicz J, Zalewski M, Meriluoto J (2005). Elimination of microcystins by water treatment processes examples from Sulejow Reservoir, Poland. *Water Research* 39, 2394-2406.
- Kaebnick M, Neilan BA, Börner T, Dittman E (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied Environmental Microbiology* 66, 3387-3392.
- Kaebnick M, Neilan BA (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35, 1-9.
- Kagan VE (1988). Molecular mechanisms of biomembrane damage caused by LPO. En: Kagan VE (Ed.) *Lipid Peroxidation on Biomembranes*. FC: CRC Press. Boca Raton p, 55-117.
- Kamjunke N, Mendonca R, Hardewig I, Mehner T (2002a). Assimilation of different cyanobacterial as food and the consequences for internal energy stores of juvenile roach. *Journal of Fish Biology* 60, 731-738.
- Kamjunke N, Schmidt K, Pflugmacher S, Mehner T (2002b). Consumption of cyanobacteria by roach (*Rutilus rutilus*): Useful or harmful to the fish? *Freshwater Biology* 47, 243-250.
- Kankaanpää HT, Holliday J, Schröder H, Goddard TJ, von Fister R, Carmichael WW (2005). Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia-A case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 243-256
- Kao CY (1993). Paralytic shellfish poisoning. En: Falconer IR (Ed) *Algal Toxins in seafood and drinking water*. Academic Press, San Diego p, 75-86.
- Karbonik M, Reiter RJ (2000). Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 225, 9-22.
- Karlsson KM, Kankaanpää H, Huttunen M, Meriluoto J (2004). First observation of microcystin-LR in pelagic cyanobacterial blooms in the northern Baltic Sea. *Harmful Algae* 4, 163-166.

- Kaya K (1996). Toxicology of Microcystins. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (Ed.) Toxic Microcystis. Boca Raton p, 175-202.
- Kelly SA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED (1998). Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. *Environ Health Perspect* 106, 375-384.
- Keshavanath P, Beveridge MCM, Baird DJ, Lawton LA, Nimmo A, Codd GA (1994). The functional grazing response of a phytoplanktivorous fish *Oreochromis niloticus* to mixtures of toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Fish Biology* 45, 123-129.
- Khan SA, Ghosh S, Wickstrom M, Miller LA, Hess R, Haschek WA, Beasley VR (1995). Comparative Pathology of MCLR in Cultured Hepatocytes, Fibroblast and Renal Epithelial Cells. *Natural Toxins* 3, 119-128.
- Kondo F, Ikai Y, Oka H, Okumura M, Ishikawa N, Harada K, Matsuura K, Murata H, Suzuki M (1992). Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chemical Research in Toxicology* 5, 591-596.
- Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, Nagata S, Ueno Y, Suzuki M, Harada K (1996). Detection and identification of metabolites of microcystins formed *in vivo* in mouse and rat livers. *Chemistry Research in Toxicology* 9, 1355-1359.
- Koop R, Hetesa J (2000). Changes of Haematological indices of juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) under the influence of natural populations of cyanobacterial water blooms. *Acta Veterinaria Brno* 69, 131-137.
- Kotak BG (1991). Occurrence and health significance of algal toxins in Alberta surface waters. *Proceeding of the Alberta Lake Management Society, Camrose, Alberta* p, 1-8.
- Kotak BG, Kenefick SL, Fritz DL, Rousseaux CG, Prepas EE, Hrudrey SE (1993). Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. *Water Research* 27, 5-506.
- Kotak BG, Lamak Y, Prepas EE, Kenefick SL, Hrudey SE (1995). Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes. *Journal of Phycology* 31, 248-263.
- Kotak BG, Souleh S, Fritz DL, Prepas EE, Hrudey SE, Coppock RW (1996). Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 34, 517-525.
- Kotak BG, Lam AKY, Prepas EE, Hrudey SE (2000). Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1584-1593.
- Kuiper-Goodman T, Falconer I, Fitzgerald J (1999). Human Health Aspects. En: Chorus I, Bartram J (Ed.) Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E&FN Spon, New York p, 113-153.
- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Scheingart CD, Hoffmann AF, Wolkoff AW, Meier PJ (1995). Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 109, 1274-1284.

- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B (2001). Gastroenterology 120, 525-533.
- Kurmayer R, Jüttner F (1999). Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. Journal of Plankton Research 21, 659-683.
- Lankoff A, Banasik A, Obe G, Deperas M, Kuzminski K, Tarczynska M, Jurczak T, Wojcik A (2003). Effect of microcystin-LR and cyanobacterial extract from polish reservoir of drinking water on cell cycle progression, mitotic spindle, and apoptosis in CHO-K1 cells. Toxicology and Applied Pharmacology 189, 204-213.
- Lawrence A, Burk RF (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. Biochemical and Biophysical Research Communications 71, 952-958.
- Lawrence JL, Menard C (2001). Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. Journal of Chromatography A 922, 111-117.
- Lawton LA, Codd GA (1991). Cyanobacterial (blue-green algal) toxins and their significance in UK and European waters. Journal of Industrial Waste Management Evaluation Model 5, 460-465.
- Lee SJ, Jang MH, Kim HS, Yoon BD, Oh HM (2000). Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage. Journal of Applied Microbiology 89, 323-329.
- Lenartova V, Holovska K, Pedrajas JR, Martínez-Lara E, Peinado J, López-Barea J, Rosival I, Kosuth P (1997). Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers or river pollution. Biomarkers 2, 247-252.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shatiel S, Stadman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology 186, 464-478.
- Li L, Xie P, Chen J (2005b). In vivo studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.-injected with extracted microcystins. Toxicol 46, 533-545.
- Li L, Xie P, Li S, Qiu T, Guo L (2007a). Sequential ultrastructural and biochemical changes induced *in vivo* by the hepatotoxic Microcystins in liver of the phytoplanktivorous silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. Comparative Biochemistry and Physiology C 146, 357-367.
- Li S, Xie P, Xu J, Li L, Liang G, Zheng L (2007c). Tissue distribution of microcystins in bighead carp via intraperitoneal injection. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 79, 297-300.
- Li X, Liu Y, Song L (2001). Cytological alteration in isolated hepatocytes from common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystin-LR. Environmental toxicology 16, 517-522.
- Li X, Liu Y, Song L, Liu J (2003). Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. Toxicol 42, 85-89.

- Li X, Chung IK, Kim JI, Lee JA (2004). Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol* 44, 821-827.
- Li X, Chung I, Kim J, Lee J (2005a). Oral exposure to *Microcystis* increases activity-augmented antioxidant enzymes in the liver of loach (*Misgurnus mizolepis*) and has no effect on lipid peroxidation. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 141, 292-296.
- Li X, Wang J, Liang J-B, Liu Y-D (2007b). Toxicity of microcystins in the isolated hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 447-451.
- Liras V, LindberG M, Nystrom P, Annadotter H, Lawton LA, Graf B (1998). Can ingested cyanobacteria be harmful to the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*)? *Freshwater Biology* 39, 233-242.
- Liu Y, Song L, Li X, Liu T (2002). The toxic effects of MC-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misguruns mizolepis* Gunthe. *Toxicol* 40, 395-399.
- Long BM, Jones GJ, Orr PT (2001). Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 278-283.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-75.
- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264, 187-192.
- Magalhaes VF, Soares RM, Azevedo SMFO (2001). Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicol* 39, 1077-1085.
- Magalhaes VF, Marinho MM, Domingos P, Oliveira AC, Costa SM, Azevedo LO, Azevedo SMFO (2003). Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicol* 42, 289-295.
- Malbrouck C, Trausch G, Devos P, Kestemont P (2003). Hepatic accumulation and effects of Microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratu*. L. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 135, 39-48.
- Malbrouck C, Trausch G, Devos P, Kestemont P (2004). Effect of microcistin-LR on protein phosphatase activity in fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Toxicol* 43, 295-301.
- Malbrouck C, Kestemon P (2006). Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 72-86.
- Mankiewicz J, Tarczynska M, Fladmark KE, Doskeland SO, Walter Z, Zalewski M (2001). Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. *Environmental Toxicology* 16, 225-233.
- Mankiewicz J, Komárková J, Izydorczyk K, Jurczak T, Tarczynska M, Zalewski M (2005). Hepatotoxic Cyanobacterial Blooms in the Lakes of Northern Poland. *Environmental Toxicology* 20, 499-506.

- Martin-Luna B, Hernandez JA, Bes TM, Fillat MF, Peleado ML (2006a). Identification of a Ferric uptake regulator from *Microcystis aeruginosa* PCC7806. FEMS Microbiological Letter 254, 63-70.
- Martin-Luna B, Sevilla E, Hernandez JA y col (2006b). Fur from *Microcystis aeruginosa* binds *in vitro* promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. Phytochemistry 67, 876-81.
- Martins R, Pereira P, Welter M, Fastner J, Vasconcelos VM (2005). Toxicity of culturable cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. Toxicon 46, 454-464.
- McDermott CM, Nho CW, Howard W, Holton B (1998). The Cyanobacterial Toxin, Microcystin-LR, Can Induce Apoptosis in a Variety of Cell Types. Toxicon 36, 1981-1996.
- McElhiney J, Lawton LA, 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.
- McElhiney J, Lawton LA (2005). Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. Toxicology and Applied Pharmacology 203, 219-230.
- Mereish KA, Solow R, Singh Y, Bhatnager R (1989). Comparative toxicity of cyclic peptides and depsipeptides in cultured rat hepatocytes. Medical Science Research 17, 869-871.
- Meriluoto J, Sandström A, Eriksson JE, Remaud G, Craig AG, Chattopadhyaya J (1989). Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. Toxicon 27, 1021-1034.
- Meriluoto J, Gueimonde M, Haskard CA, Spoo L, Sjövall O, Salminen S (2005). Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by human probiotics. Toxicon 46, 111-114.
- Metcalf JS, Bell SG, Codd GA (2000). Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. Water Research 34, 2761-2769.
- Metcalf JS, Bell SG, Codd GA (2001). Colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology 67, 904-909.
- Mez K, Hanselmann K, Preisig HR (1998). Environmental conditions in high mountain lakes containing toxic benthic cyanobacteria. Hydrobiologia 368, 1-15.
- Mikhailov A, Härmälä -Brasken AS, Hellman J, Meriluoto J, Eriksson JE (2003). Identification of ATP-synthetase as a novel intracellular target for microcystin-LR. Chemo-Biological Interactions 142, 223-237.
- Milutinovic A, Sedmak B, Horvat-Znidarsic I, Suput D (2002). Renal injuries induced by chronic intoxication with microcystins. Cellular and Molecular Biology Letters 7, 139-141.
- 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.
- Milzani A, DalleDone I, Colombo R (1997). Prolonged oxidative stress on actin. Archives of Biochemistry and Biophysics 339, 267-274.

- Mitrovic SM, Allis O, Furey A, James KJ (2005). Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 345-352.
- Miura GA, Robinson NA, Geisbert TW, Bostian KA, White JD, Pace JG (1989). Comparison of *in vivo* and *in vitro* toxic effects of microcystin-LR in fasted rats. *Toxicon* 27, 1229-1240.
- Miura GA, Robinson NA, Lawrence WB, Pace JG (1991). Hepatotoxicity of Microcystin-LR in Fed and Fasted Rats. *Toxicon* 29, 337-346.
- Mohamed ZA, Carmichael WW, Hussein AA (2003). Estimation of Microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a Microcystis bloom. *Environmental Toxicology* 18, 137-141.
- Mohamed ZA, Hussein AA, (2006). Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study. *Ecotoxicology Environmental Safety* 63, 424-429.
- Molina R, Moreno I, Pichardo S, Jos A, Moyano R, Monterde JG, Cameán A (2005). Acid and alkaline phosphatases activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicon* 46, 725-735.
- Moreno I, Cameán A, Tavares MJ, Pereira P, Franca S (2003a). Toxicity of cyanobacteria isolated from the Guadiana river. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 6, 409-415.
- Moreno I, Mate A, Repetto G, Vázquez CM, Cameán AM (2003b). Influence of Microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. *Journal of Physiological Biochemistry* 59, 293-300.
- Moreno I, Pereira P, Franca S, Cameán, A (2004). Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana River (Southwest of Spain). *Biological Research* 37, 405-417.
- Moreno I, Pichardo S, Jos A, Gómez-Amores L, Mate A, Vazquez CM, Cameán AM (2005a). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicon* 45, 395-402.
- Moreno I, Repetto G, Carballal E, Gago A, Cameán A (2005b). Cyanobacteria and Microcystins Occurrence in the Guadiana River (SW Spain). *International Journal Environmental Analytical Chemistry* 7, 461-474.
- Moreno I, Molina R, Jos A, Picó Y, Cameán AM (2005c). Determination of microcystins in fish by solvent extraction and liquid chromatography. *Journal Chromatography A*. 1080, 199-203.
- Morgante M, Beghelli D, Ranucci S, Pauselli M, Tessi B (1996). Effetto della somministrazione di selenio e vitamina E sul test di riduzione dell NBT in pecore in lattazione. En: IV Congreso de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes. Murcia, España, p, 32.
- Nagaoka S, Okauchi Y, Urano S, Nagashima U, Mukai K (1990). Kinetic and ab initio study of the prooxidant effect of vitamin E: hydrogen abstraction from fatty acid esters and egg yolk lecithin. *Journal of Analytical Chemistry* 112, 8921-8924.

- Nagata S, Soutome H, Tsutsumi T, Hasegawa A, Sekijima M, Sugamata M, Harada K, Sukanuma M, Ueno Y (1995). Novel Monoclonal Antibodies Against Microcystin and Their Protective Activity for Hepatotoxicity. *Natural Toxins* 3, 78-86.
- Namikoshi M, Rinehart KL, Sakai R, Stotts RR, Dahlem AM, Beasley VR, Carmichael WW, Evans WR (1992). Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: Nine new microcystins. *Journal of Organic Chemistry* 57, 866-872.
- Naseem SM, Mereish KA, Solow R, Hines HB (1991). Microcystin-induced Activation of Prostaglandin Synthesis and Phospholipid Metabolism in Rat Hepatocytes. *Toxicology in vitro* 5, 341-345.
- Navrátil S, Palíková M, Vajcová V (1998). The effects of pure microcystin LR and biomass of blue-green algae on blood indices of carpa (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno* 67, 273-279.
- Neilan BA, Dittmann E, Rouhianinen L, Bass RA, Sivonen K, Börner T (1999). Non-ribosomal peptide synthesis and the toxigenicity of cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 181, 4089-4097.
- Nemec M, Hidioglou M, Nielsen K, Proulx J (1990). Effect of vitamin E and selenium supplementation on some immune parameters following vaccination against brucellosis in cattle. *Journal of Animal Sciences* 68, 4303-4309.
- Niki E (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* 44, 227-253.
- Noé B, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1997). Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 10346-10350.
- O'Brien PJ (1969). Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid hydroperoxide by metal ions, heme compounds, and nucleophiles. *Canadian Journal of Biochemistry* 47, 485-492.
- Oberemm A, Fastner J, Steinberg C (1997). Effects of Microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*). *Water Research* 31, 2918-2921.
- Oberemm A, Becker J, Codd GA, Steinberg C (1999). Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environmental Toxicology* 14, 77-88.
- Oberemm A (2001). A fish-embryo bioassay for the assessment of cyanobacterial toxicity. En: Chorus I (Ed.) *Cyanotoxins-Occurrence, Causes, Consequences*. Springer, Berlin p, 339-343.
- Ognjanovic BI, Pavlovic SZ, Maletic SD, Zikic RV, Stajn AS, Radojicic RM, Saicic ZS, Petrovic VM (2003). Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiological Research* 52, 563-570.
- Oliveira ACP, Magalhaes VF, Soares RM, Azevedo SMFO (2005). Influence of drinking water composition on quantitation and biological activity of dissolved *Microcystin* (cyanotoxin). *Environmental Toxicology* 20, 126-130.

- OMS (1998). Guidelines for Drinking Water Quality. En: Health Criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva.
- OMS (2003). Algae and cyanobacteria in fresh water. En: Guidelines for safe recreational water environments, vol. 1: Coastal and fresh waters. World Health Organization. Geneva, Switzerland p, 136-158.
- Oruc E, Üner N (2000). Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology C 127, 291-296.
- Ostensvik O, Skulberg OM, Underdal B, Hormazabal V (1998). Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria- a comparative study of bacterial bioassays. Journal of Applied Microbiology 84, 1117-1124.
- Ouahid Y, Pérez-Silva G, del Campo FF (2005). Identification of Potentially Toxic Environmental Microcystis by Individual and Multiple PCR Amplification of Specific Microcystin Synthetase Gene Regions. Environmental Toxicology 20, 235-242.
- Oudra B, Loudiki M, Sbiyyaa B, Martins R, Vasconcelos V, Namikoshi N (2001). Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of LallacTakerkoust lake-reservoir (Morocco). Toxicon 39, 1375-1381.
- Paley RK, Twitchen ID, Eddy FB (1993). Ammonia, Na⁺, K⁺, Cl⁻ levels in rainbow trout yolk-sac fry in response to external ammonia. Journal of Experimental Biology 180, 273-284.
- Palíková M, Kovárú F, Kubala L, Pesak S, Vajcová V (1998). The effects of pure microcystin LR and biomass of blue-green algae on selected immunological indices of carp (*Cyprinus carpio* L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). Acta Veterinaria Brno 67, 265-272.
- Palikova M, Navratil S, Marsalek B, Blaha L (2003). Toxicity of crude extract of cyanobacterial for embryos and larvae of carp (*Cyprinus carpio* L.) Acta Veterinaria Brno 72, 437-443.
- Palikova M, Navratil S, Tichy F, Sterba F, Marsalek B, Blaha L (2004). Histopathology of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae exposed to cyanobacterial extract. Acta Veterinaria Brno 73, 253-257.
- Park H, Watanabe MF (1996). Toxic Microcystis in Eutrophic Lakes. En: Watanabe MF, Harada KH, Carmichael WW, Fujiki H (Ed.) Toxic Microcystis. C.R.C. Press, Boca Raton p, 57-77.
- Park HD, Iwami C, Watanabe MF, Harada KI, Okino T, Hayashi H (1998). Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). Environmental Toxicology and Water Quality 13, 61-72.
- Parker RS (1989). Dietary and biochemical aspects of vitamine E. Advances in Food Nutrition and Research 33, 157-232.
- Passi S, Ricci R, Cataudella S, Ferrante I, De Simone F, Rastrelli L (2004). Fatty acid pattern, oxidation product development, and antioxidant loss in muscle tissue of Rainbow trout and *Dicentrarchus labrax* during growth. Journal of Agricultural Food Chemistry 52, 2587-2592.

- Pedersen JZ, Finazzi-Agro A (1993). Protein-radical enzymes. *FEBS Letters* 325, 53-58.
- Peixoto F, Alves-Fernandes D, Santos D, Fontaínhas-Fernandes A (2006). Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85, 91-96.
- Peña Morant VJ, Martín Loeches I, Ruiz Santana S (2005). Requerimientos nutricionales e ingestas dietéticas recomendadas. En: Gil Hernández A. (Ed) *Nutrición humana en el estado de salud* (Tomo III). Grupo acción médica. Madrid, España, p, 63-73.
- Peñaloza R, Rojas M, Vila I, Zambrano F (1990). Toxicity of a soluble peptide from *Microcystis aeruginosa* to zooplankton and fish. *Freshwater Biology* 24, 133-240.
- Pflugmacher S, Codd GA, Steinberg CEW (1998a). Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environmental Toxicology* 14, 111-115.
- Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, Beattie KA, Krause E, Codd GA, Steinberg, CEW (1998b). Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochemistry and Biophysical Acta* 1425, 527-533.
- Pflugmacher S, Wiegand C (2001). Metabolism of microcystin-LR in aquatic organisms. En: Chorus I (Ed.) *Cyanotoxins*. Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries. Berlin, Germany p, 257-260, 276-280.
- Pflugmacher S, Wiegand C, Beattie KA, Krause E, Codd GA, Steinberg CEW, Codd GA (2001). Uptake, effects and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (Cav). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 846-852.
- Pflugmacher S (2004). Promotion of oxidative stress in *C. demersum* due to exposure to cyanobacterial toxin. *Aquatic Toxicology* 3, 169-178.
- Pflugmacher S, Jung K, Lundvall L, Neumann S, Peuthert A (2006). Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of Alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2381-2387.
- Pflugmacher S, Hofmann J, Huebner B (2007). Effects on grow and physiological parameters in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in soil and irrigated with cyanobacterial toxin contaminated water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 2710-2716.
- Pichardo S, Jos A, Zurita J, Salguero M, Camean AM, Repetto G (2005). The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by Microcystins LR and RR. *Toxicology in vitro* 19, 865-873.
- Pichardo S, Jos A, Zurita JL, Salguero M, Camean AM, Repetto G (2006). Toxic effects produced by microcystins from a natural cyanobacterial bloom and a *Microcystis aeruginosa* isolated strain on the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 86-96.
- Pichardo S, Jos A, Zurita JL, Salguero M, Cameán AM, Repetto G (2007). Acute and subacute toxic effects produced by microcystin-YR on the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1. *Toxicology in vitro* 21, 1460-1467.
- Pillet S, Pereira A, Brackman JC, Houvenaghel G (1995). Patterns in log-term accumulation of okadaic acid and DTX-1 in blue mussels, *Mytilus edulis*,

- experimentally fed with the DSP containing alga *Prorocentrum lima*. En: Lasso P, Arzul G, Erard E, Gentien C, Marcaillou C (Ed.) Harmful Marine Algal Blooms-Lavoasier. Intercept Ltd p, 487-492.
- Pinho GLL, Moura da Rosa C, Maciel FE, Bianchini A, Yunes JS, Proença LAO, Monserrat JM (2005a). Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 353-360.
- Pinho GLL, Moura da Rosa C, Maciel FE, Bianchini A, Yunes JS, Proença LAO, Monserrat JM (2005b). Antioxidant responses after microcystin exposure in gills of an estuarine crab species pre-treated with vitamin E. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 361-365.
- Pizzolon L (1996). Importancia de las Cianobacterias como Factor de Toxicidad en las Aguas Continentales. *Interciencia* 21, 239-245.
- Pomati F, Sacchi S, Rossetti C, Giovannardi S, Onodera H, Oshima Y, and Neilan BA (2000). The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: Molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal Phycology* 36, 553-562.
- Poon KF, Lam MH, Lam PK, Wong BS (2001). Determination of microcystins in cyanobacterial blooms by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography. *Environmental toxicology and chemistry* 20, 1648-55.
- Pouria S, De Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ, Preiser W, Poon GK, Neild GH, Codd GA (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet* 352, 21-26.
- Premazzi G, Volterra L (1993). Microphite Toxins: A Manual for Toxin Detection, Environmental Monitoring and Therapies to Counteract Intoxications. European Communities Commission. Luxemburg p, 137.
- Prepas EE, Kotak BG, Campbell LM, Evans JC, Hruddy SE, Holmes CFB (1997). Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam, *Anodonta grandis simpsoniana*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 41-46.
- Qiu T, Xie P, Ke Z, Li L, Guo L (2007). In situ studies on physiological and biochemical responses of four fishes with different trophic levels to toxic cyanobacterial blooms in a large Chinese lake. *Toxicon* 50, 365-376.
- Rabergh CMI, Bylund G, Eriksson JE (1991). Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L). *Aquatic Toxicology* 20, 131-146.
- Rao PVL, Bhattacharya R, Parida MM, Jana AM, Braskar A (1998). Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 5, 1-6.
- Rao PVL, Jayaraj R, Bhaskar ASB (2004). Protective efficacy and the recovery profile of certain chemoprotectants against lethal poisoning by microcystin-LR in mice. *Toxicon* 44, 723-730.
- Rapala J, Sivonen K, Lyra C, Niemelä SI (1997). Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* sp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2206-2212.

- Rapala J, Sivonen K (1998). Assessment of environmental conditions that favour hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* sp. strains cultured under light limitation at different temperatures. *Microbial Ecology* 36, 181-192.
- Rapala J, Erkomaa K, Kukkonen J, Sivonen K, Lahti K (2002). Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay. Comparison of methods. *Analytical Chemical Acta* 466, 213-231.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- Reinikainen M, Kiviranta J, Ulvi V, Niku-Paavola ML (1995). Acute toxic effects of a novel cyanobacterial toxin on the crustaceans *Artemia salina* and *Daphnia pulex*. *Archives of Hydrobiology* 133, 61-69.
- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research* 18, 1-11.
- Ressom R, Soong FS, Fitzgerald J, Turczynowicz L, El-Saadi O, Roder D, Maynard T, Falconer IR (1994) Health Effects of Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae). National Health and Medical Council, The Australian Government Publishing Service. Canberra, Australia, p, 108.
- Rinta-Kanto JM, Ouellette AJA, Boyer GL, Twiss MRT, Brigdeman TB, Wilhelm SW (2005). Quantification of toxic *Microcystis* sp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environmental Science and Technology* 39, 4198-4205.
- Robinson NA, Miura GA, Matson CF, Dinterman RE, Pace JG (1989). Characterization of Chemically Tritiated Microcystin-LR and its Distribution in Mice. *Toxicol* 27, 1035-1042.
- Rodger HD, Turnbull T, Edwards C, Codd GA (1994). Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout (*Salmo trutta* L) in Loch Leven Scotland. *Journal of Fish Diseases* 17, 177-181.
- Rodríguez-Ariza A, Peinado J, Pardo C, López-Barea J (1993). Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 2568-2573.
- Roem AJ, Kohler CC, Stickney RR (1990). Vitamin E requirements of blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner) in relation to dietary lipid level. *Aquaculture* 87, 155-164.
- Rohrlack T, Dittmann E, Henning M, Börner T, Kohl JG (1999). Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 737-739.
- Rohrlack T, Dittmann E, Börner T, Christoffersen K (2001). Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3523-3529.
- Rokutan K, Thomas JA, Sies H (1989). Specific S-thiolation of a 30-kDa cytosolic protein from rat liver under oxidative stress. *European Journal of Biochemistry* 179, 233-239.

- Runnegar M, Andrews J, Gerdes RG, Falconer IR (1987). Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 25, 1235-1239.
- Runnegar M, Kong S-M, Zhong Y-Z, Ge J-L, Lu SC, (1994). The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Biophysical Research Communication* 201, 235-241.
- Runnegar M, Berdt N, Kong S-M, Lee EYC, Zhang L (1995). In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216, 162-169.
- Sabour B, Loudiki M, Oudra B, Vasconcelos V, Oubraim S, Fawzi B (2005). Dynamics and toxicity of *Anabaena aphanizomenoides* (Cyanobacteria) waterblooms in the shallow brackish Oued Mellah lake (Morocco). *Aquatic Ecosystem Health y Management* 8, 95-104.
- Sahin A, Tencalla FG, Dietrich DR, Naegeli H (1996). Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. *Toxicology* 106, 123-130.
- Saker ML, Jungblut AD, Neilan BA, Rawn DFK, Vasconcelos VM (2005). Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon* 46, 555-562.
- Samokyszyn VM, Miller DM, Reif DW, Aust SD (1990). Iron-catalyzed lipid peroxidation. En: Vigo-Pelfrey C (ed.) *Membrane Lipid Oxidation*. FL: CRC Press. Boca Raton, Vol 1 p, 101-127
- Saqrane S, El ghazali I, Ouahid Y, El Hassni M, El Hadrami I, Bouarab L, F. del Campo F, Pudra B, Vasconcelos VM (2007). Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquatic Toxicology* 83, 284-294.
- Satoh S, Takeuchi T, Watanabe T (1987). Requirement of tilapia for α -tocopherol. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 119-164.
- Sayed I, Parvaez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 295-301.
- Scaife JR, Onibi GE, Murray I, Fletcher TC, Houlihan DF (2000). Influence of α -tocopherol acetate on the short-and long-term storage properties of fillets from Atlantic salmon *Salmo salar* fed a high lipid diet. *Aquaculture Nutrition* 6, 65-71.
- Schaeffer DJ, Malpas PB, Barton LL (1999). Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon flos-aquae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 73-80.
- Sevilla E, (2007). Estudio de factores que inciden en la síntesis de microcistina en *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 y diseño de un kit para su cuantificación. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza.
- Shiau SY, Hsu CY (2002). Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture* 210, 335-342.
- Shida CS, Castrucci AM, Lamy-Freund MT (1994). High melatonin solubility in aqueous medium. *Journal of Pineal Research* 16, 198-201.

- Shinall H, Song ES, Hersh LB (2005). Susceptibility of amiloid β peptide degrading enzymes to oxidative damage: A potential Alzheimer's disease spiral. *Biochemistry* 44, 15345-15350.
- Sipiä VO, Kankaanpää HT, Flinkman J, Lahti K, Merriluoto JAO (2001). Time-dependent accumulation of cyanobacterial hepatotoxins in flounders (*Platichthys flesus*) mussels (*Mytilus edulis*) from the northern Baltic Sea. *Environmental Toxicology* 16, 330-336.
- Sivonen K (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* 35, 12-24.
- Sivonen K (1998). Toxins Produced by Cyanobacteria. En: Miraglia M, Van Egmond H, Brera C, Gilbert J (Ed.) *Phycotoxins-Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*. USA p, 547-567.
- Sivonen K, Jones G (1999). Cyanobacterial Toxins En: Chorus, I, Bartram, M J (Ed.) *Toxic Cyanobacteria in Water A guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management* E & FN Spon, London p, 41-111.
- Smienk HGF, Sevilla E, Peleato ML, Razquin Casquero P, Mata Vallespín L (2007). Evaluación de un kit para la detección de microcistinas en agua. II Reunión Española de Cianobacterias.
- Smith CE, Stack MS, Johnson DA (1987). Ozone effects on inhibitors of human neutrophil proteinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 253, 146-155.
- Smith JL, Haney JF (2006). Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* 48, 580-589.
- Soares RM, Magalhaes VF, Azevedo SMFO (2004). Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology* 70, 1-10.
- Sommer U, Gliwicz Z M, Lampert W, Duncan A (1986). The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in freshwaters. *Archives of Hydrobiology* 106, 433-471.
- Song L, Chen W, Peng L, Wang N, Gan N, Zhang X (2007). Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: A systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang Bay, Lake Taihu. *Water Research* 41, 2853-2864.
- Spataru P, Gophen M (1985). Feeding behavior of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* Val. And its impact on the food web of Lake Kinneret, Israel. *Hydrobiologia* 120, 53-61.
- Stadtman ER, Chock PB (1978). Interconvertible enzyme cascades in metabolic regulation. *Current Topics in Cellular Regulation* 13, 53-95.
- Stadtman ER (1990). Discovery of glutamine synthetase cascade. *Methods in Enzymology* 182, 793-809.
- Stephensen E, Svavarsson J, Sturve J, Ericson G, Adolfsson-Erici M, Forlin L (2000). Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology* 48, 431-442.
- Stirling DJ, Quilliam MA (2001). First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in New Zealand. *Toxicon* 39, 1219-1222.

- Stoner RD, Adams WH, Slatkin DN, Siegelman HW (1989). The Effects of Single L-amino Acid Substitutions on the Lethal Potencies of the Microcystins. *Toxicon* 27, 825-828.
- Stotts RR, Namikoshi M, Haschek WM, Rinehart KL, Carmichael WW, Dahlem AM, Beasley VR (1993). Structure modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* sp. *Toxicon* 31, 783-789.
- Stüven J, Pflugmacher S (2007). Antioxidative stress response of *Lepidium sativum* due to exposure to cyanobacterial secondary metabolites. *Toxicon* 50, 85-93.
- Sukenik A, Rosin C, Porat R, Teltsch B, Banker R, Carmeli S (1998). Toxins from cyanobacteria and their potential impact on water quality of lake Kinneret, Israel. *Israel Journal of Plants Sciences* 46, 109-115.
- Sun Y, Yu H, Zhang J, Yim Y, Shi H, Wang X (2006). Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere* 63, 1319-1327.
- Takenaka S y Otsu R (1999). Effects of L-cysteine and reduced glutathione on the toxicities of microcystin LR: the effect for acute liver failure and inhibition of protein phosphatase 2A activity. *Aquatic Toxicology* 48, 65-68.
- Takenada S (2001). Covalent glutathione to cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferase. *Environmental Toxicology Pharmacology* 9, 135-139.
- Tappel AL (1980). Measurement of and protection from *in vivo* lipid peroxidation. En: Pryor WA, (ed.) *Free Radicals in Biology*. New York: Academic Press Vol 4 p, 1-47.
- Teixeira MGL, Costa MCN, Carvalho VLP, Pereira MS, Hage E (1993). Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO* 27, 244-253.
- Tencalla F, Dietrich DR, Schlatter C (1994). Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 30, 215-224.
- Tencalla F, Dietrich D (1997). Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 35, 583-595.
- Teneva I, Dzhambazov B, Koleva L, Mladenov R, Schirmer K (2005). Toxic potential of five freshwater Phormidium species (Cyanoprokaryota). *Toxicon* 45, 711-725.
- Theiss W, Carmichael WW (1985). Physiological effect of a peptide toxin produced by the freshwater Cyanobacteria (Blue-Green algae) *Microcystis aeruginosa* strain 7820. En: Steyn PS, Vleggaar (Ed.) *Microcystins and Phycotoxins*. Six International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Pretoria, Republic of South Africa p, 353-364.
- Theiss W, Carmichael WW, Wyman J, Bruner R (1988). Blood pressure and hepatocellulareffects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. *Toxicon* 26, 603-613.
- Thompson WL, Pace JG (1992). Substances that protect cultured hepatocytes from the toxic effects of Microcystin-LR. *Toxicology in vitro* 6, 579-587.

- Thostrup L, Christoffersen K (1999). Accumulation of microcystins in *Daphnia Magna* feeding on toxic *Microcystis*. Archives of Hydrobiology 145, 447-467.
- Tocher DR, Mourente G, Van der Eecken A, Evjemo JO, Diaz, Bell JG, Geurden I, Lavens P, Olsen Y (2002). Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture Nutrition 8, 195-207.
- Torokne AK, Laszlo E, Chorus I, Sivonen K, Barbosa FAR (2000). Cyanobacterial toxins detected by thamnotoxkit (a double blind experiment). Environmental Toxicology 15, 549-553.
- Towner RA, Sturgeon SA, Hore KE (2002). Assesment of *in vivo* oxidative lipid metabolism following acute Microcystin-LR-induced hepatotoxicity in rats. Free Radical Research 36, 63-71.
- Tuomainen JM, Hietanen S, Kuparinen J, Martikainen PJ, Servomaa K (2003). Baltic Sea cyanobacterial bloom contains denitrification and nitrification genes, but has negligible denitrification activity. FEMS Microbiology Ecology 45, 83-96.
- Turker H, Eversole AG, Brune DE (2003a). Filtration of green algae and cyanobacteria by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in the Partitioned Aquaculture System. Aquaculture 215, 93-101.
- Turker H, Eversole AG, Brune DE (2003b). Comparative Nile tilapia and silver carp filtration rates of Partitioned Aquaculture System phytoplankton. Aquaculture 220, 449-457.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 2001. "National Primary Drinking Water Regulations; Arsenic and Clarifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring (Final rule.)" Fed. Reg. 66:6975-7066. January 22, 2001.
- Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, Chen G, Yu SZ (1996). Detection of Microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. Carcinogenesis 17, 1317-1321.
- Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidatives degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. Biochemical and Biophysical Acta 710, 197-211.
- Ursini F, Maiorino M, Gregolin C (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Biochemical and Biophysical Acta 839, 62-70.
- Ursini F, Maiorino M, Sevanian A (1991). Membrane hydroperoxides. En: Sies H, (Ed.) Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. London: Harcourt Brace Jovanovich p,319-336.
- Utkilen H, Gjølme, N (1995). Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology 61, 797-800.
- Vajcová V, Mavrátíl S, Palíková M (1998). The effect of intraperitoneally applied pure microcystin LR on haematological biochemical and morphological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). Acta Veterinaria Brno 67, 281-287.

- Vale P, Sampayo MAM (2000). Dinophysistoxin-2: a rare diarrhetic toxin associated with *Dinophysis acuta*. *Toxicon* 38, 1599-1606.
- Van der Oost R, Goksóyr A, Celander M, Heida H, Vermeulen NPE (1996). Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). 2. Biomarkers: Pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology* 36, 189-222.
- Van Gorp RM, Broers JL, Reutelingspepper CP, Hornstra G, van Dam-Mieras MC, Heemskerk JW (1999). Peroxide-induced membrane blebbing in endothelial cells associated with glutathione oxidation but not apoptosis. *American Journal of Physiology* 277, 20-28.
- Vasconcelos VM (1995). Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 32, 227-237.
- Vasconcelos VM (1999). Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32, 249-254.
- Vasconcelos VM (2001). Freshwater cyanobacteria and their toxins in Portugal. En: Chorus I (Ed.) *Cyanotoxins*. Springer-Verlag, Berlin, Germany p, 62-67, 78-82.
- Vasconcelos VM, Oliveira S, Teles FO (2001). Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkia*. *Toxicon* 39, 1461-1470.
- Vasconcelos VM, Pereira E (2001). Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Water Research* 35, 1354-1357.
- Vasconcelos VM, Wiegand C, Pflugmacher S (2007). Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. *Toxicon* 50, 740-745.
- Venkateswara M, Sudhir S, Lalchand S (2006). Vitamin-E supplementation ameliorates chromium-and/or nickel induced oxidative stress in vivo. *Journal of Health Sciences* 52,142-147.
- Vézie C, Rapala J, Vaitomaa J, Seitsonen J, Sivonen K (2002). Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and non-toxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbiology Ecology* 43, 443-454.
- Vieira JM, Azevedo MT, Azevedo SM, Honda RY, Corrêa B (2005). Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 45, 901-909.
- Von Sonntag C (1987). *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis (Ed.) London UK p, 520.
- Von Westernhagen H, (1988). Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. *Fish Physiology* 11, 253-346.
- Wang Y, Yuen KH, Ng WK (2006). Deposition of tocotrienols and tocopherols in the tissues of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., fed a tocotrienol-rich fraction extracted from crude palm oil and its effect on lipid peroxidation. *Aquaculture* 253, 583-591.
- Watanabe MF (1996). Production of Microcystins. En: Watanabe MF, Harada K, Carmichael WW, Fujiki H (Ed.) *Toxic Microcystis*. Boca Raton p, 35-56.

- Watanabe MF, Park HD, Kondo F, Harada KI, Hayashi H, Okino T (1997). Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. *Natural Toxins* 5, 31-35.
- Waters WA (1976). Kinetics and mechanism of metal catalyzed autooxidation. *Journal of American Oil Chemists Society* 48, 427-433.
- Weber P, Bendich A, Schalch W (1996). Vitamin C and human health-a review of recent data relevant to human requirements. *International Journal of Vitamin and Nutrition research* 66, 19-30.
- Welker M, Fastner J, Erhard M, Von Dohren H (2002). Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. *Environmental Toxicology* 17, 367-374.
- Weng D, Lu Y, Wei Y, Liu Y, Shen P (2007). The role of ROS in Microcystin-LR-induced hepatocytes apoptosis and liver injury in mice. *Toxicology* 232, 15-23.
- Wickstrom ML, Khan SA, Haschek WM, Wyman JK, Eriksson JE, Schaeffer DJ, Beasley VR (1995). Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by Microcystin-LR in cultured cells. *Toxicologic Pathology* 23, 326-337.
- Wiedner C, Visser PM, Fastner J, Metcalf JS, Codd GA, Mur LR (2003). Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1475-1481.
- Wiegand C, Pflugmacher S, Oberemm A, Meems N, Beattie KA, Steinberg CEW, Codd GA (1999). Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 14, 89-95.
- Wiegand C, Pflugmacher S (2004). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, 201-218.
- Williams DE, Kent ML, Andersen RJ, Klix H, Holmes CFB (1995). Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin-LR epimers administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection. *Toxicol* 33, 125-131.
- Williams DE, Craig M, Dawe SC, Kent ML, Holmes CFB (1997). Evidence for a covalently bound form of MCLR in salmon liver and dungeness crab larvae. *Chemical Research in Toxicology* 10, 463-469.
- Wirsing B, Flury T, Wiedner C, Neumann U, Weckesser J (1999). Estimation of the microcystin content in cyanobacterial field samples from German lakes using the colorimetric protein phosphatase inhibition assay and RP-HPLC. *Environmental Toxicology* 14, 23-29.
- Wiston GW, DiGiulio RT (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19, 137-161.
- Wu G, Fang Y, Yang S, Lupon J, Turner N (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition* 134, 489-492.
- Xie L, Xie P, Ozawa K, Honma T, Yokoyama A, Park H-D (2004). Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in sub-chronic toxicity experiment. *Environmental Pollution* 127, 431-439.
- Xie L, Xie P, Guo L, Li L, Miyabara Y, Park H (2005). Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic lake Chaohu, China. *Environmental Toxicology* 20, 293-300.

- Xie L, Park H-D (2007a). Determination of Microcystins in fish tissue using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction. *Aquaculture* 271, 530-536.
- Xie L, Yokoyama A, Nakamura K, Park H (2007b). Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail *Sinotaia histrica* and three fishes in a temperate lake, the eutrophic lake Suwa, Japan. *Toxicon* 49, 646-652.
- Xu C, Shu W-Q, Qiu Z-Q, Chen J-A, Zhao Q, Cao J (2007). Protective effects of green tea polyphenols against subacute hepatotoxicity induced by Microcystin-LR in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 24, 140-148.
- Xu L, Zhou B, Lam PKS, Chen J, Zhang Y, Harada K-I (2000). In vivo protein phosphatase 2A inhibition and GSH reduction by Microcystin-LR in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). En: Hallegraeff GM, Blackburn S, Bolch CJ, Lewis R (Ed) Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms, Hobart, Australia 7-11 February, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO p, 399-402.
- Yim HS, Kang SO, Hah YC, Chock PB, Yim MB (1995). Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 28228-28233.
- Yokoyama A, Park HD (2002). Mechanism and prediction for contamination of freshwater bivalves (*Unionidae*) with the cyanobacterial toxin microcystin in hypereutrophic lake Suwa, Japan. *Environmental Toxicology* 17, 424-433.
- Yoshida T, Makita Y, Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Sekijima M, Tamura S, Ueno Y (1997). Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. *Natural Toxins* 5, 91-95.
- Yoshida T, Makita Y, Tsutsumi T, Nagata S, Tashiro F, Yoshida F, Skijima M, Tamura S, Harada T, Maita K, Ueno Y (1998). Immunohistochemical localitation of microcystin-LR in the liver of mice: A study on the pathogenesis of microcystin-LR-induced hepatotoxicity. *Enviromental Toxicologic Pathology* 26, 411-418.
- Yu FY, Liu BH, Chou HN, Chu FS (2002). Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4176-4182.
- Yu SZ (1989) Drinking water and primary liver cancer. En: Tang ZY, Wu MC, Xia SS (Ed.) *Primary Liver Cancer*. China Academic Publishers, Springer, New York p, 30-37.
- Yu SZ (1995). Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 10, 674-682.
- Zambrano F, Canelo E (1996). Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na⁺-K⁺ pump of the gill of carp (*Cyprinus carpio* Linneo). *Toxicon* 34, 451-458.
- Zeck A, Eikenberg A, Weller MG, Niessner R (2001). Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins. *Analytical Chimical Acta* 441, 1-13.
- Zegura B, Sedmak B, Filipic M (2003). Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon* 41, 41-48.
- Zhao M, Xie S, Zhu X, Yang Y, Gan N, Song L (2006). Effect of dietary cyanobacteria on growth and accumulation of microcystins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 261, 960-966.

- Zhou L, Yu H, Chen K (2002). Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences* 15, 166-171.
- Zimba PV, Khoo L, Gaunt P, Carmichael WW, Brittain S (2001). Confirmation of catfish mortality from *Microcystis* toxins. *Journal of Fish Diseases* 24, 41-47.
- Zohary T, Roberts RD (1989). Diurnal mixed layers and the long-term dominance of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research* 11, 25-48.
- Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas EE (2005). Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of Microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health B* 8, 1-37.

ANEXO



Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions

Ángeles Jos^{a,*}, Silvia Pichardo^a, Ana I. Prieto^a, Guillermo Repetto^{a,b},
Carmen M. Vázquez^c, Isabel Moreno^a, Ana M. Cameán^a

^a Area of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Profesor García González no. 2, 41012 Seville, Spain

^b National Institute of Toxicology and Forensic Sciences, Seville, Spain

^c Area of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Profesor García González no. 2, 41012 Seville, Spain

Received 4 October 2004; received in revised form 13 January 2005; accepted 18 January 2005

Abstract

The effects of microcystins from cyanobacterial cells on various oxidative stress biomarkers in liver, kidney and gill tissues in freshwater tilapia fish (*Oreochromis* sp.) were investigated under laboratory conditions. Microcystins are a family of cyclic peptide toxins produced by species of freshwater cyanobacteria (blue-green algae). Fish were exposed to the cyanobacterial cells in two ways: mixed with a commercial fish food or crushed into a commercial fish food so that the toxins were released. Two different exposure times were studied: 14 and 21 days. The oxidative status of fish was evaluated by analyzing the level of lipid peroxidation (LPO), as well as the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). The findings of the present investigation show that microcystins induce oxidative stress in a time-dependent manner and that the type of administration of the cyanobacterial cells influences the extent of these effects. Thus, the crushed cyanobacterial cells (released toxins) induced the antioxidant defences studied and increased the LPO level to a greater extent than the non-crushed cells. The liver was the most affected organ followed by kidney and gills. These results together with reports that fish can accumulate microcystins mean that cyanobacterial blooms are an important health, environmental and economic problem.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cyanobacteria; Microcystin; Tilapia; Fish; Oxidative stress

1. Introduction

Aerobic organisms generate reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\bullet OH$)

* Corresponding author. Tel.: +34 954 556762;
fax: +34 954 233765.

E-mail address: angelesjos@us.es (Á. Jos).

as a result of oxidative metabolism. •OH can initiate lipid peroxidation (LPO) in tissues (Halliwell and Gutteridge, 1984). To minimize the negative effects of ROS, fish, like other vertebrates, possess an antioxidant defence (AD) system, which utilizes enzymatic and non-enzymatic mechanisms. Some of the most important AD enzymes are superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), while the non-enzymatic defenses include Vitamins E, C and A, glutathione, carotenes and ubiquinol₁₀ (Filho, 1996). When the activity of these antioxidant defence systems decreases or ROS production increases, oxidative stress may occur (Packer, 1995).

Mitochondria are the sites where reactive oxygen species are mainly produced, and red muscles are the most important source of mitochondria in endotherms. Therefore, this tissue is considered to be the main contributor to ROS generation in mammals and birds. However, in most fish red muscle makes up only a small proportion of tissues, and other tissues such as liver, kidney and also gills (as the first tissue in contact with the xenobiotics in the water) are more important in this regard (Filho et al., 2000).

Oxidative stress biomarkers are becoming increasingly important in the field of ecotoxicology. The high number of pollutants can disturb the equilibrium between ROS and the AD system. It has been suggested that they could also be used in environmental monitoring programs (Pandey et al., 2003).

Various pesticides (Sayeed et al., 2003), pulp mill effluents (Filho et al., 1997) and metals (Almeida et al., 2002) are some of the pollutants that have been reported to elicit oxidative stress in aquatic organisms but naturally occurring toxicants such as microcystins (MCs) are also capable of doing so (Wiegand et al., 1999; Li et al., 2003). MCs are a family of cyclic peptide toxins produced by species of freshwater cyanobacteria (blue-green algae), primarily *Microcystis aeruginosa* (Dawson, 1998). Anthropogenic activities lead to the eutrophication of the water, which in turn means that these algae can grow in massive quantities. This generates a so called cyanobacterial bloom (Mankiewicz et al., 2001). It seems that every country in the world will have water bodies that support blooms of toxic cyanobacteria at some time or another (Sivonen and Jones, 1999). The intact cells as well as the toxins released after cellular lysis can

be responsible for the toxic effects observed in both animals and humans (Carmichael and Falconer, 1993; Moreno et al., 2004a), and they have been associated with fish kills (Zimba et al., 2001). In response to the increase in health-related problems on a global scale, the World Health Organisation (WHO) has established safe guidelines for drinking water at 1.0 µg MC-LR/L (Falconer et al., 1999). Microcystins are cyclic heptapeptide molecules containing both L- and D-amino acids and an unusual hydrophobic C₂₀ D-amino acid commonly termed ADDA (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid). There are over 70 different MCs, which differ mainly in the two L-amino acids at positions 2 and 4. The most common, and also the most extensively studied, are MC-LR, MC-RR and MC-YR (Fastner et al., 2002).

MCs have proved to be highly potent hepatotoxins in mammals and fish (Fisher and Dietrich, 2000; Towner et al., 2002). It is well recognized that among their toxicogenic mechanisms they are potent inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A that cause increased protein phosphorylation, which is directly related to their cytotoxic effects and tumor-promoting activity (Hooser et al., 1989; Carmichael, 1994; Hooser, 2000). Some evidence suggest that oxidative stress may play a significant role in the pathogenesis of microcystin toxicity in mammals (Hermansky et al., 1991; Ding et al., 1998, 2001; Guzman and Solter, 1999; Towner et al., 2002; Ding and Ong, 2003; Moreno et al., 2003; Bouaïcha and Maatouk, 2004; Zegura et al., 2004), but data of in vivo experiments in fish are still scarce.

Little work has been undertaken on the possible transference of MCs along food chains, and some studies suggest that fish farms should be monitored for the presence of toxic cyanobacterial blooms to minimize the exposure of fish to potent hepatotoxins (Magalhaes et al., 2001; Lawrence and Menard, 2001; Mohamed et al., 2003).

This study aims to investigate the effects of microcystin-LR in cells from toxic cyanobacterial blooms on oxidative stress biomarkers including LPO and several antioxidant enzymatic activities such as CAT, GPx, GR and SOD in liver, kidney and gill tissues from tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Oreochromis* sp. is an important group of fish species in commercial fisheries in South America and it is also being introduced in Europe. Moreover, they are commonly found in brackish water in estuaries around the world and re-

spond promptly to environmental alterations (Almeida et al., 2002). Fish were exposed to the cyanobacterial cells through their diet at different exposure times and the different administrations were compared.

2. Materials and methods

2.1. Experimental setup and acclimation of fish

Studies were conducted using male *Oreochromis* sp. (Nile tilapia, Perciformes: Cichlidae) with mean weight 49.92 ± 9.1 g. They were obtained from a fish hatchery in Córdoba and transferred to the laboratory where they were held in aquariums (8 individuals/aquarium) with 96 L of fresh water. Exposure to chlorine was minimized by filling the tanks at least 3 days before the fish were introduced. The aquariums were also set up with continuous system of water filtration and aeration (Eheim Liberty 150 and Bio-Espumador cartridges (Bio-Espumador)) and the temperature was kept constant (21 ± 2 °C). Dissolved oxygen values were maintained between 6.5 and 7.5 mg/L. Mean values for additional parameters of water quality were: pH 7.6 ± 0.2 , conductivity 292 μ S/cm, Ca^{2+} 0.60 mM/L and Mg^{2+} 0.3 mM/L. Fish were fed with commercial fish food and were acclimatized for 15 days before the beginning of the experiments.

2.2. Collection of *Microcystis* waterbloom and determination of cyanobacterial toxins

MCs from two different *Microcystis* waterblooms from the river Guadiana (Mértola, Portugal) were extracted from dried cell material using the method of Moreno et al. (2004b). The lyophilised cells (50 mg) were extracted three times with 10 mL 0.1 M acetic acid and 20 mL of a mixture of methanol:chloroform (1:1 v/v). The cell suspension was sonicated in an ultrasound bath for 15 min, stirred for 30 min at room temperature, and then centrifuged at $4500 \times g$ for 15 min. The upper aqueous phases were combined and concentrated in a rotary evaporator. The residue was resuspended in 0.5 mL methanol for chromatographic separation.

The LC system used to analyse the toxin contents was a Varian 9012 equipped with a Varian ProStar 330 Diode Array Detector. Chromatographic data were

processed with a Star Chromatography Workstation (Varian Technologies). Chromatographic separation of MCs was performed according to Moreno et al. (2004b) on a 250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μ m, LiChrosphere C18 column purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Microcystin standards were supplied by Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, UK). Standard solutions of microcystins MC-LR, MC-YR and MC-RR were prepared in methanol (500 μ g/mL) and diluted as required with methanol for use as working solutions (0.5–5.0 mg/L of each toxin). Only MC-LR was identified in the cyanobacterial cell extracts analyzed and the peak area of the MC-LR standard solution was applied for quantification. The concentrations of MC-LR obtained from both lyophilised cells were similar, 3230 μ g/g MC-LR and 3340 μ g/g MC-LR.

2.3. Exposure

Tilapia fish were exposed to MC-LR by feeding with cyanobacterial cells under laboratory conditions for two different periods of time (14 and 21 days) and two different types of toxin administration (crushed and non-crushed cyanobacterial cells). Two experiments were designed as follows. A control group of fish ($n = 8$) in both experiments was administered only the commercial fish food for the period that exposed groups received food-containing MC-LR:

- *Experiment 1.* Fish in a test aquarium ($n = 8$) were fed with commercial fish food plus lyophilised cyanobacterial cells, containing 3230 μ g/g MC-LR. *M. aeruginosa* cells were fed to the fish by manually crushing mixture of both components (fish food and toxic cells) in a mortar followed by sonication. This procedure resulted in small sticky pellets and was designed to replicate the type of exposure that may occur when a bloom of cyanobacteria undergoes lysis under field conditions. The pellets were placed in the tank and drifted to the bottom for the fish to take. It was ensured that all the pellets were eaten within an hour. The amount of commercial fish food administered per fish was 0.3 g/day and the quantity of cyanobacterial cells was selected in order to dose approximately 60.0 μ g MC-LR/fish/day (determined from HPLC analysis), for 14 days.
- *Experiment 2.* It was carried out using two test aquaria with eight fish in each. The exposure time

to cyanobacterial cells was 21 days. In accordance with the dose of toxin chosen (approximately 60.0 µg MC-LR/fish/day) and the concentration of microcystin contained in the cyanobacterial cells (3340 µg/g MC-LR), we determined the quantity of lyophilised cells that had to be added to the aquarium. The lyophilised cells were administered in two different ways. In one of the test aquariums, the fish received the toxins in the same way as in Experiment 1 (in pellets containing commercial fish food plus crushed lyophilised cyanobacterial cells). In the second test aquarium, the fish were fed with commercial fish food (0.3 g/fish/day) and lyophilised *Microcystis* cells (non-crushed cells) dusted on the water surface, daily for 21 days. The uptake of lyophilised cells by the fish was completed within 3 h in both treatments.

2.4. Preparation of post-mitochondrial supernatant (PMS)

At the end of the experiments, the fish were anaesthetized in tricaine methane sulphonate (MS-222) before they were killed by transection of the spinal cord. The liver, kidney and gills were removed, weighed, rinsed with ice-cold saline and kept at -85°C until analysis. The gill filaments of both sides were trimmed from the gill arches and the arches were discarded. The tissues were homogenized in chilled TRIS buffer (100 mM, pH 7.8; 1:10 w/v) using an Ultra-Turrax® tissue homogenizer. The homogenates were centrifuged at $10\,500 \times g$ for 20 min at 4°C to obtain the post-mitochondrial supernatant (PMS) for various biochemical analyses.

2.5. Lipid peroxidation

The malondialdehyde (MDA) concentration, an index of lipid peroxidation, was measured following the method described by Esterbauer and Cheeseman (1990) on homogenized tissues. The homogenized tissue (0.5 mL), previously treated with 25 µL of butylhydroxytoluene 1% v/v in glacial acetic, was mixed with 0.2 mL of sodium laurylsulphate (8%), 1 mL of acetic acid (20% v/v) and 1 mL of 0.8% thiobarbituric acid. This mixture was then heated at 95°C for 30 min. The resulting chromogen was extracted with 3 mL of *n*-butyl alcohol and, after centrifugation ($1500 \times g$ for

10 min), the absorbance of the organic phase was determined at 532 nm. 1,1,3,3-Tetramethoxypropan was used as a standard. Values were presented as µmol MDA formed/g tissue.

2.6. Antioxidant enzymes

Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was assayed by the method of Beers and Sizer (1952). The reduction of hydrogen peroxide was followed spectrophotometrically at 240 nm, using 1.0 mL quartz cuvettes with a light path of 1.0 cm. Results are expressed in terms of nmol H_2O_2 consumed/min/mg protein.

Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was measured using the xanthine oxidase–cytochrome *c* method as described by McCord and Fridovich (1969). The reactions between xanthine and xanthine oxidase, and 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT) led to superoxide radicals which reacted to form a red coloured formazan. This was used to determine the SOD activity. In the presence of SOD in the medium, superoxide radicals were removed and the formation of formazan was therefore inhibited. SOD activity was measured spectrophotometrically at 505 nm and calculated as inhibition percent of formazan formation.

Glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) activity was assayed by following the rate of NADPH oxidation at 340 nm by the coupled reaction with glutathione reductase. The specific activity was determined using the extinction coefficient of $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Lawrence and Burk, 1976). Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activity was determined spectrophotometrically by measuring NADPH oxidation at 340 nm (Carlberg and Mannervik, 1975).

2.7. Protein estimation

Protein contents in the samples were estimated by the method of Bradford (1976) using bovine γ -globuline as standard.

2.8. Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm S.E. The differences between the data from the different types of cyanobacterial cell administration for 21 days were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA).

When significance was found, unpaired two-tailed Student's *t*-test was used and differences were considered significant from $p < 0.05$. All other comparisons were performed by the unpaired *t*-test.

3. Results

No fish died during the exposure periods of 14 or 21 days. Visual inspection throughout the experiments revealed that the fish behaved similarly to the control group. Likewise, the behavior of the fish was unchanged in the two different ways of administration. Moreover, no external alterations were observed in any of the experiments.

3.1. Effect of cyanobacterial cells on lipid peroxidation

After 14 days, no changes were observed in MDA in exposed fish when compared to the control group in any of the organs studied (Fig. 1). However, a longer exposure time significantly increased this biomarker in liver ($p < 0.01$), kidney ($p < 0.01$) and gills ($p < 0.05$) in fish subjected to the crushed cyanobacteria (Experiment 2). The liver was the most affected organ. The induction of lipid peroxidation was also evident in kidney of fish exposed to the non-crushed cyanobacteria for 21 days.

3.2. Effect of cyanobacteria cells on antioxidant enzymes

SOD activity did not change significantly in the liver, kidney or gills of fish that had been exposed to crushed cyanobacteria for 14 days (Fig. 2). The longer exposure resulted in a significant increase in the SOD activity in liver ($p < 0.01$, both diets) and in gills ($p < 0.05$, non-crushed food) but induction in kidney was not significant.

No discernible effects were observed in CAT activity of liver or kidney after 14 days of exposure, but activity increased 2.5-fold in liver ($p < 0.01$) and kidney ($p < 0.05$) after 21 days of treatment (Fig. 3). Both diets had similar effects. The basal CAT activity level in gills was much lower than that in the other organs and was not induced in any of the studies performed.

GPx activity was maintained at its basal level after the shorter exposure time (Fig. 4). After the longer ex-

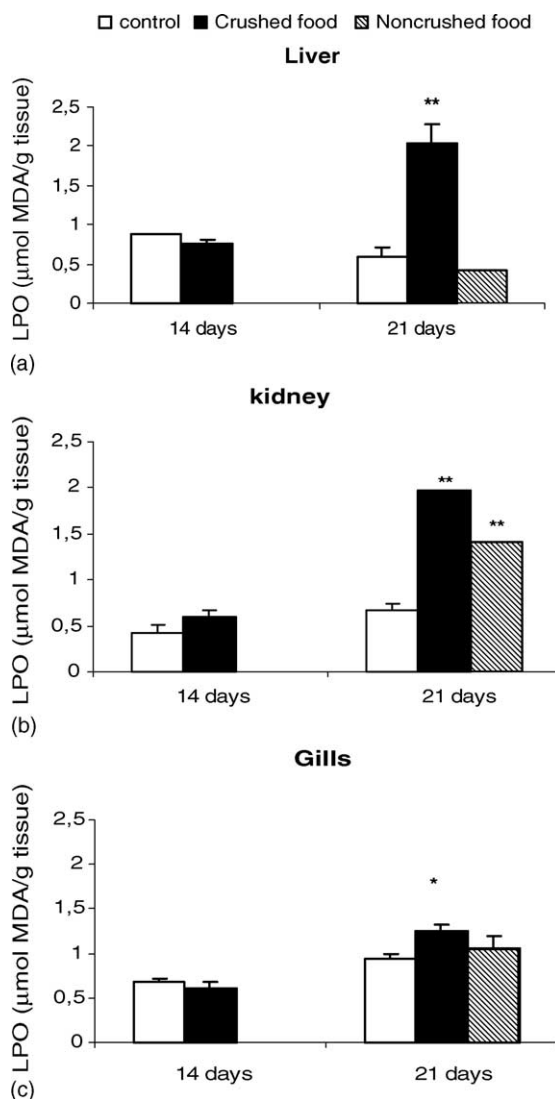


Fig. 1. Lipid peroxidation values in (a) liver, (b) kidney and (c) gills of control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 60.0 μg fish/day) for two different types of administration: crushed and non-crushed food. The values are expressed as mean ± S.E. ($n = 8$). LPO values are expressed as μmol MDA/g tissue. The significance levels observed are * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in comparison to control group values.

posure (21 days) there was a significant induction of GPx activity in liver ($p < 0.01$ crushed diet; $p < 0.05$ non-crushed diet) and kidney ($p < 0.05$ both diets). However, GPx activity showed a significant decrease in gills ($p < 0.01$) with both diets.

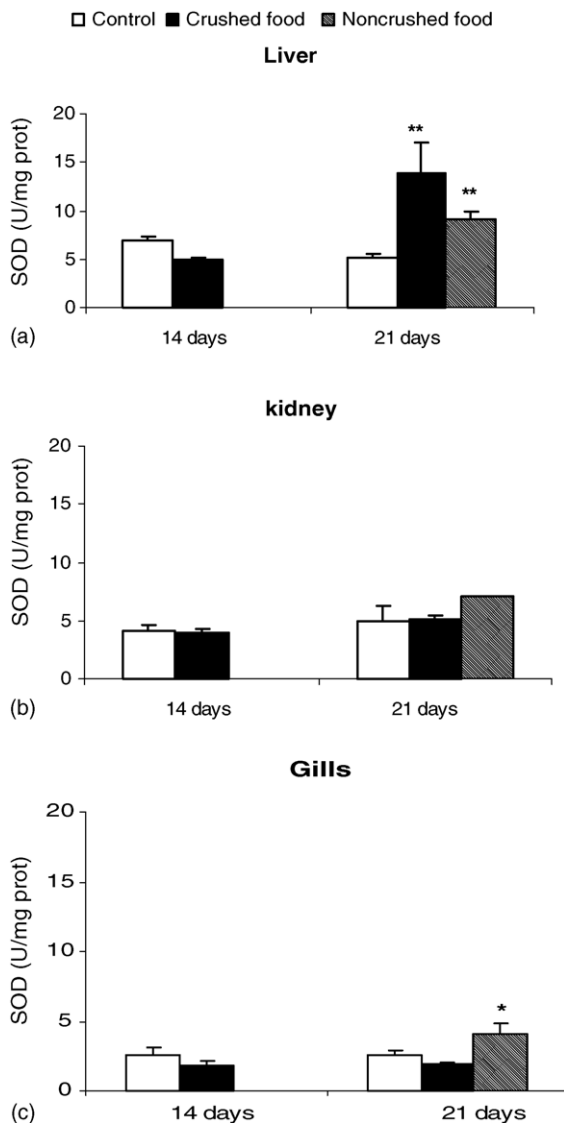


Fig. 2. Superoxide dismutase activity in (a) liver, (b) kidney and (c) gills of control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 60.0 μg fish/day) for two different types of administration: crushed and non-crushed food. The values are expressed as mean \pm S.E. ($n=8$). SOD activity is expressed as U/mg protein. The significance levels observed are * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in comparison to control group values.

After 14 days of exposure GR behaved just like the previous biomarkers, and showed no significant changes (Fig. 5). GR activity was significantly induced after 21 days of exposure in liver ($p < 0.01$ crushed diet; $p < 0.05$ non-crushed diet) and kidney ($p < 0.01$ in both

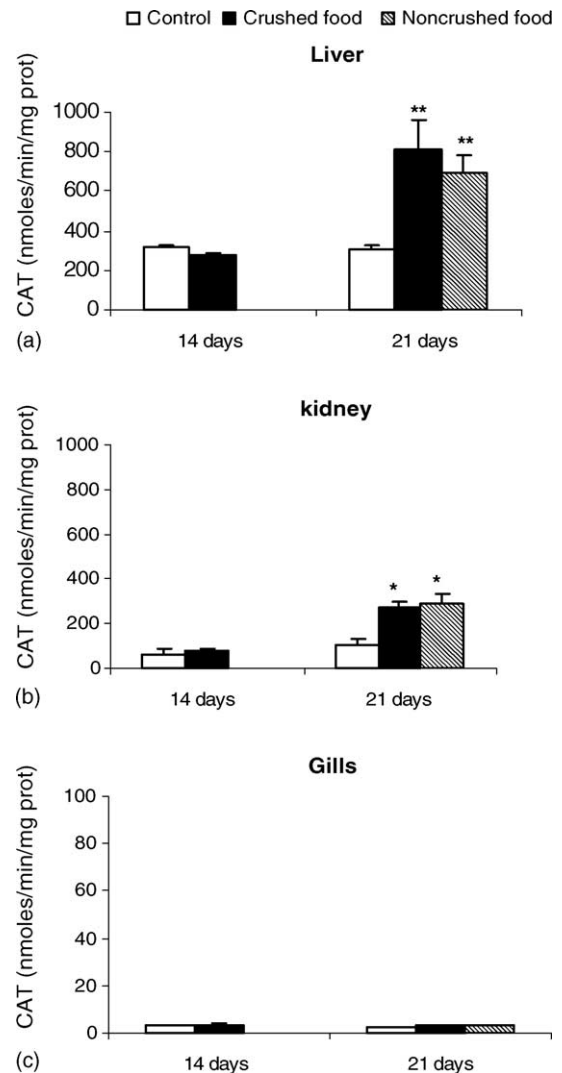


Fig. 3. Catalase activity in (a) liver, (b) kidney and (c) gills of control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 60.0 μg fish/day) for two different types of administration: crushed and non-crushed food. The values are expressed as mean \pm S.E. ($n=8$). CAT activity is expressed as nmol H_2O_2 consumed/min/mg protein. The significance levels observed are * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in comparison to control group values.

diets) and showed no significant changes in gills. In liver, changes in GR and GPx activities were more pronounced when the cyanobacterial cells were crushed with the fish food.

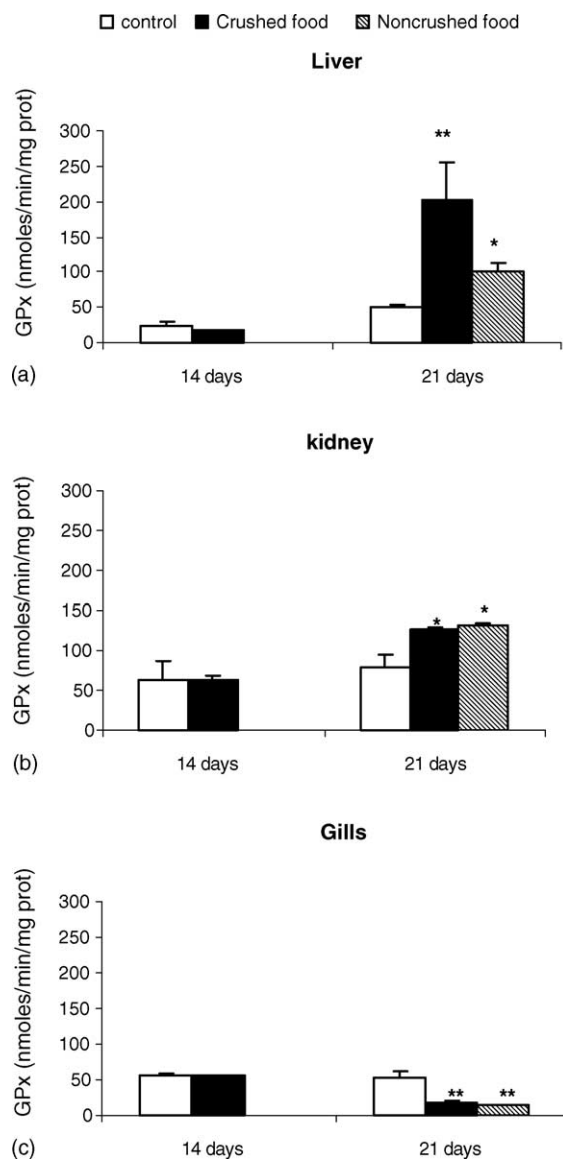


Fig. 4. Glutathione peroxidase activity in (a) liver, (b) kidney and (c) gills of control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 60.0 µg fish/day) for two different types of administration: crushed and non-crushed food (intact cyanobacterial cells). The values are expressed as mean ± S.E. (n = 8). GPx activity is expressed as nmol NADPH oxidized/min/mg protein. The significance levels observed are * p < 0.05 and ** p < 0.01 in comparison to control group values.

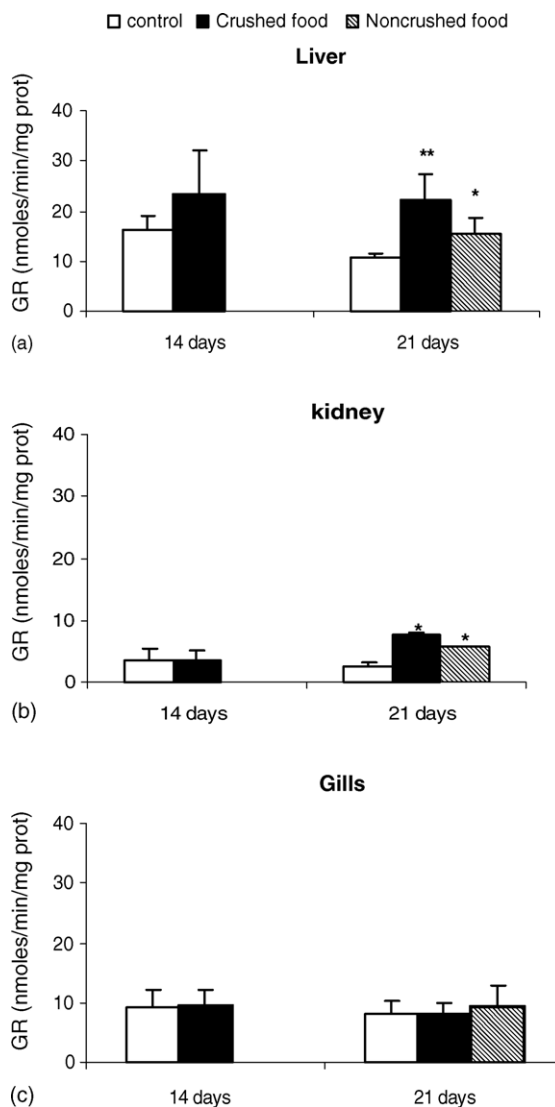


Fig. 5. Glutathione reductase activity in (a) liver, (b) kidney and (c) gills of control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 60.0 µg fish/day) for two different types of administration: crushed and non-crushed food. The values are expressed as mean ± S.E. (n = 8). GR activity is expressed as nmol NADPH oxidized/min/mg protein. The significance levels observed are * p < 0.05 and ** p < 0.01 in comparison to control group values.

4. Discussion

This study revealed that the microcystin-LR contained in cyanobacterial blooms induce oxidative stress in tilapia (*Oreochromis* sp.) that are exposed to re-

peated doses of toxins. The antioxidant status of the fish changed although no observable effects were detected in this species.

Toxic cyanobacterial blooms can be associated with fish mortality (Zimba et al., 2001). Some authors have evaluated the intraperitoneal exposure of such fish species as common carp (Rabergh et al., 1991; Carbis et al., 1997) and rainbow trout (Kotak et al., 1996) to microcystins, with particular emphasis on histopathological aspects. All of these studies showed necrosis and degeneration in liver and kidney, and Carbis et al. (1997) also indicated that MCs may damage the gill epithelium.

Similar changes have been recorded when fish are orally exposed to microcystins. Carps exposed to MCs underwent damage to renal proximal tubular cells and hepatocytes (Fisher and Dietrich, 2000). Carps taken from lake Mokoan (Australia) suffer from liver and gill damage (Carbis et al., 1997). Best et al. (2001) demonstrated cardiac alterations, and Bury et al. (1995) observed ionic imbalance and reduced growth in brown trout after chronic exposure.

Very few studies have been made on the subchronic oral toxicity of MCs in fish under laboratory conditions. Soares et al. (2004) observed the accumulation of MCs in *Tilapia rendalli* and Li et al. (2004) showed growth inhibition and severe damage to hepatocytes in MC-treated carps. Both these studies administered the toxin in a similar way to the present paper. However, neither of them focused on the oxidative stress induced by microcystins.

Cyanobacteria can be a part of the diet of several species of fish (Bowen, 1982) and high numbers of toxic *Microcystis* cells have been recorded in fish guts, which confirms that tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) do graze on toxic cyanobacteria (Mohamed et al., 2003). The way in which the microcystins were administered – whether the cyanobacterial cells were non-crushed or crushed with the commercial fish food – affected diverse oxidative stress biomarkers. The latter produced major significant effects in most of the organs studied. When the cyanobacterial cells are mixed with the commercial food and the mixture thoroughly crushed, the toxins are apparently released and become easily bioavailable.

Moreover, the results show that microcystin-LR contained in cyanobacterial blooms induce oxidative stress in a time-dependent manner. After the 14-day

treatment, none of the biomarkers studied had been induced in either liver, kidney or gills. After 21 days of exposure, on the other hand, oxidative stress was evident by the induction of lipid peroxidation and the increase in antioxidant enzymatic activities.

The extent of LPO was determined by the balance between the production of oxidants, and the removal and scavenging of those oxidants by antioxidants. The MDA level generally increased in the organs studied after 21 days of exposure. Many studies have demonstrated that lipid peroxidation and oxidative stress increases in tissues of different species of aquatic organisms, as a result of being exposed to environmental stressors (Wiston and DiGiulio, 1991), but this is the first study to focus on microcystins. However, it is by no means a general rule that exposure to a pollutant increases the MDA level. Some authors have shown lowered MDA levels in fish sampled in a site contaminated by metal and organic compounds (Rodríguez-Ariza et al., 1993), and others have shown that fish show no response when exposed to azinphosmethyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Oruc and Üner, 2000). The increase in the MDA level observed in the three organs of the tilapia studied agreed with previous investigations carried out with rats that had been intraperitoneally exposed to microcystins (Moreno et al., 2003).

As far as SOD and CAT activities are concerned, a simultaneous induction response is usually observed after exposure to pollutants (Dimitrova et al., 1994). However, in the present study no such relationship was observed in kidney and gills of the organs evaluated. Fish exposed to the crushed diet for 21 days underwent a 2.6-fold increase in CAT activity in liver, very similar to the 2.7-fold increase observed in SOD activity. Li et al. (2003) also reported enhanced SOD and CAT activities in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.), induced by MC-LR. CAT activity increased 2.7 times also in kidney while the induction of SOD activity was not significant and gills showed no statistical change in the activity of CAT, although SOD was significantly increased after 21 days (non-crushed food), but the enzyme activities were very low in the kidney and gills compared to the liver.

The increase in GPx activity observed, predominantly in liver and kidney, is similar to the results reported by Li et al. (2003) who studied the responses of the antioxidant systems in the hepatocytes of common

carp (*Cyprinus carpio* L.) to microcystin-LR. The increase in GPx activity probably reflects an adaptation to the oxidative conditions to which the fish had been exposed (Lenartova et al., 1997). However, GPx activity decreased in gills after the longer exposure time, corroborating the LPO increase in this organ; this may be explained because gills are less efficient than kidney and liver at neutralizing the impact of peroxidative damage (Sayeed et al., 2003; Ahmad et al., 2004).

The GR enzyme has an important role in cellular antioxidant protection because it catalyzes the regeneration of GSH from GSSG. Its induced activity after 21 days of exposure reveals an enhanced production of GSSG predominantly in liver and kidney. In general, Stephensen et al. (2000) demonstrated that fish from polluted sites have high GR activity because of higher peroxidative components in the polluted aquatic site.

The results suggest that microcystins cause oxidative stress and that the antioxidant enzymes are induced as a defence mechanism. However, they fail to prevent lipid peroxidation. The liver was the most affected organ in all cases because microcystins are potent hepatotoxins in mammals and fish (Fisher and Dietrich, 2000; Towner et al., 2002). The kidney was the next most affected organ. This agrees with the results obtained by other authors who reported kidney lesions induced by MC-LR in fish (Rabergh et al., 1991; Kotak et al., 1996; Fisher and Dietrich, 2000). Finally, gills were the least affected organs probably due to the more important role of the oral exposure in this study. Rodger et al. (1994) reported severe gill damage in brown trout after the lysis of a cyanobacterial bloom at Loch Leven, Scotland and there are even studies that consider that gills are the organs that are most sensitive to the LPO induced by xenobiotics, because their antioxidant potential is weaker than that of other organs (Sayeed et al., 2003). However, some laboratory studies have shown that the gill and skin epithelia of freshwater fish form a barrier to microcystin transport (Tencalla et al., 1994; Bury et al., 1995) and, consequently, ingestion may be the most probable route for microcystin uptake in fish (Bury et al., 1998).

Data about the induction of oxidative stress by microcystins in fish are scarce, because most of the studies on microcystins in fish focus on histopathological aspects, as has been stated above. Bury et al. (1996) studied the stress responses of brown trout, *Salmo trutta* L., to *Microcystins aeruginosa* and analyzed plasma cor-

tisol, glucose and ion (Na^+ and Cl^-) levels. They concluded that fish had a classic stress response. Li et al. (2003) studied the responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp to the toxicity of MC-LR. They showed that SOD, CAT and GPx activities increased and concluded that the toxicity mechanisms of MC-LR on fish hepatocytes were similar to those on mouse hepatocytes. Other authors, however, have observed that lesions in the liver and kidney of fish exposed to MC-LR are considerably different than those previously reported for mammals (Kotak et al., 1996).

5. Conclusion

The results of this study showed that when tilapia fish were exposed to cyanobacterial cells under laboratory conditions (60.0 μg MC-LR/fish/day) the endogenous antioxidant defense system were altered in a time-dependent manner. Simultaneously, the lipid peroxidation level increased significantly in the liver, kidney and gills of the fish treated with MC-LR for 21 days, particularly when fish were exposed to crushed cyanobacterial cells. These findings suggest that oxidative stress plays an important role in in vivo MC-LR induced toxicity in tilapia fish.

Acknowledgements

Lyophilised cyanobacteria from blooms were kindly supplied by Dr. Susana Franca and Dr. Paulo Pereira (Lisboa, Portugal). The authors wish to thank the CI-CYT (AGL 2002-02622) for the financial support for this study.

References

- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotox. Environ. Safe.* 57, 290–302.
- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.* 27, 673–679.

- Beers, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133–140.
- Best, J.H., Eddy, F.B., Codd, G.A., 2001. Effects of purified microcystin-LR and cell extracts of *Microcystis* strains PCC 7813 and CYA 43 on cardiac function in brown trout (*Salmo trutta*) alevine. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 171–178.
- Bouaïcha, N., Maatouk, I., 2004. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 148 (1–2), 53–63.
- Bowen, S.H., 1982. Feeding and digestion and growth-qualitative considerations. In: Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H. (Eds.), *The Biology and Culture of Tilapias*. International Center for Living Aquatic Resources Management (ICLARM), Manila, pp. 141–156.
- Bradford, 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, 248–254.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1995. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial toxin microcystin-LR and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout (*Salmo trutta* L.). *J. Fish Biol.* 46, 1042–1054.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1996. Stress responses of brown trout, *Salmo trutta* L., to the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 11 (3), 187–193.
- Bury, N.R., Newlands, A.D., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1998. In vivo and in vitro intestinal transport of H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 42, 139–148.
- Carbis, C.R., Rawlin, G.T., Grant, P., Mitchell, G.F., Anderson, J.W., McCauley, I., 1997. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *J. Fish Dis.* 20, 81–91.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475–5480.
- Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270, 78–86.
- Carmichael, W.W., Falconer, I.R., 1993. Diseases related to freshwater blue green algal toxins, and control measures. In: Falconer, I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, pp. 187–209.
- Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicol.* 36 (7), 953–962.
- Dimitrova, M.S.T., Tsinova, V., Velcheva, V., 1994. Combined effects of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase–catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.: Part C* 108, 43–46.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Shen, Y., Zhu, H.G., Ong, C.N., 1998. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Health Persp.* 106, 409–413.
- Ding, W., Shen, H., Ong, C., 2001. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 64 (6), 507–519.
- Ding, W., Ong, C., 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 220 (1), 1–7.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonetal. *Meth. Enzymol.* 186, 407–421.
- Falconer, I., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M., Codd, G.A., 1999. Safe levels and safe practices. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London, pp. 155–178.
- Fastner, J., Codd, G.A., Metcalf, J.S., Woitke, P., Wiedner, C., Utkilen, H., 2002. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material. *Anal. Biochem. Chem.* 374, 437–444.
- Filho, W., 1996. Fish antioxidant defenses. A comparative approach. *Braz. J. Med. Bio. Res.* 29, 1735–1742.
- Filho, W., Baptista, L., Soares, C., Pedrosa, R., 1997. The effect of pulp mill effluent on two fish species. In: *Proceedings of the Fifth Brazilian Symposium on Chemistry of Lignins and Other Wood Components*, Curitiba, Brazil, 15–17 October, pp. 612–619.
- Filho, W., Torres, M.A., Marcon, J.L., Fraga, C.G., Boveris, A., 2000. Comparative antioxidant defences in vertebrates – emphasis on fish and mammals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 7, 33–45.
- Fisher, W.J., Dietrich, D.R., 2000. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 73–81.
- Guzman, R.E., Solter, P.F., 1999. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. *Toxicol. Pathol.* 5, 582–588.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14.
- Hermansky, S.J., Stohs, S.J., Eldeen, Z.M., Roche, V.F., Mereish, K.A., 1991. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *J. Appl. Toxicol.* 11, 65–73.
- Hooser, S.B., 2000. Fulminant hepatocyte apoptosis in vivo following microcystin-LR administration to rats. *Toxicol. Pathol.* 28, 726–733.
- Hooser, S.B., Beasley, V.R., Lovell, R.A., Carmichael, W.W., Haschek, W.M., 1989. Toxicity of microcystin LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice. *Vet. Pathol.* 26, 246–252.
- Kotak, B.J., Semalulu, S., Friyzt, D.L., Prepas, E.E., Hrudehy, S.E., Coppock, R.W., 1996. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol.* 34, 517–525.
- Lawrence, A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952–958.
- Lawrence, J.F., Menard, C., 2001. Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing

- immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr. A* 922, 111–117.
- Lenartova, V., Holovska, K., Pedrajas, J.R., Martínez-Lara, E., Peinado, J., López-Barea, J., Rosival, I., Kosuth, P., 1997. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers or river pollution. *Biomarkers* 2, 247–252.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicol.* 42, 85–89.
- Li, X., Chung, I., Kim, J., Lee, J., 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol.* 44, 821–827.
- Magalhaes, V.F., Soares, R.M., Azevedo, S.M., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicol.* 39, 1077–1085.
- Mankiewicz, J., Tarczynska, M., Fladmark, K.E., Doskeland, S.O., Walter, Z., Zalewski, M., 2001. Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. *Environ. Toxicol.* 16, 225–233.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Mohamed, Z.A., Carmichael, W.W., Hussein, A.A., 2003. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ. Toxicol.* 18, 137–141.
- Moreno, I., Mate, A., Repetto, G., Vázquez, C.M., Cameán, A.M., 2003. Influence of microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. *J. Physiol. Biochem.* 59 (4), 293–300.
- Moreno, I.M., Maraver, J., Aguete, E.C., Leao, M., Gago-Martínez, A., Cameán, A.M., 2004a. Decomposition of microcystin-LR, microcystin-RR, and microcystin-YR in water samples submitted to in vitro dissolution tests. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5933–5938.
- Moreno, I.M., Pereira, P., Franca, S., Cameán, A., 2004b. Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana river (southwest of Spain). *Biol. Res.* 37, 405–417.
- Oruc, E., Üner, N., 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Phys. C* 127, 291–296.
- Packer, J.E., 1995. Oxidative stress, antioxidants, aging and disease. In: Gutter, R.G., Packer, L.B., Eratum, J., Mori, A. (Eds.), *Oxidative Stress and Aging*. Birkhauser Verlag, Basle, pp. 152–163.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl & Schn.). *Sci. Total Environ.* 309, 105–115.
- Rabergh, C.M.I., Bylund, G., Eriksson, J.E., 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat. Toxicol.* 20, 131–146.
- Rodger, H.D., Turnbull, T., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout (*Salmo trutta* L.) in Loch Leven. Scotland *J. Fish Dis.* 17, 177–181.
- Rodríguez-Ariza, A., Peinado, J., Puedo, C., López-Barea, J., 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 50, 2568–2573.
- Sayeed, I., Parvaez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 56, 295–301.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, M.J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London, pp. 41–111.
- Soares, R.M., Magalhaes, V.F., Azevedo, S., 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 70, 1–10.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., Forlin, L., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48, 431–442.
- Tencalla, F.G., Dietrich, D.R., Schattler, C., 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 30, 215–224.
- Towner, R.A., Sturgeon, S.A., Hore, K.E., 2002. Assessment of in vivo oxidative lipid metabolism following acute microcystin-LR-induced hepatotoxicity in rats. *Free Radic. Res.* 36 (1), 63–71.
- Wiegand, C., Pflumacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, K.A., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A., 1999. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 14, 89–95.
- Wiston, G.W., DiGiulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.
- Zegura, B., Lah, T.T., Filipic, M., 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* 200, 59–68.
- Zimba, P.V., Khoo, L., Gaunt, P., Carmichael, W.W., Brittain, S., 2001. Confirmation of catfish mortality from *Microcystis* toxins. *J. Fish Dis.* 24, 41–47.

Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.)

Ana I. Prieto, Ángeles Jos*, Silvia Pichardo, Isabel Moreno, Ana M. Cameán

Area of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Profesor García González no. 2, 41012 Seville, Spain

Received 21 October 2005; received in revised form 27 December 2005; accepted 27 December 2005

Abstract

Increasing evidence suggests that oxidative stress may play a significant role in causing microcystin (MCs) toxicity not only in mammals, but also in fish. MCs are a family of cyclic peptide toxins produced by some species of freshwater cyanobacteria (blue-green algae). Among the microcystins, MC-LR is the most extensively studied.

In the present study the differential response of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) as well as lipid peroxidation (LPO) as a biomarker of oxygen-mediated toxicity were assessed in liver, kidney and gill tissues of tilapia (*Oreochromis* sp.) exposed to MCs. Fish were injected intraperitoneally (i.p.) with a single dose of 500 µg/kg MC-LR or 500 µg/kg MC-RR and sacrificed after 7 days. The results show that MCs exposure induces adaptive responses such as increase in the antioxidant enzymatic activities, mainly those of SOD and CAT, as well as in LPO values. With regard to LPO values, the liver was the most affected organ by MC-LR. MC-RR, however, did not affect this parameter in the liver of the exposed fish. Oxidative stress biomarkers, therefore, are valuable tools in the assessment of early responses of fish to the increasing occurrence of cyanobacterial blooms worldwide.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cyanobacteria; Microcystin; Tilapia; Fish; Oxidative stress; Intraperitoneal

1. Introduction

Under certain water conditions, algal toxins originating from cyanobacteria (blue-green algae), primarily *Microcystis aeruginosa*, release a group of very potent hepatotoxins called microcystins (MCs). They are cyclic heptapeptide molecules containing both L- and D-amino acids and an unusual hydrophobic C₂₀ D-amino acid commonly termed 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid (ADDA). There are over 80 different MCs, which differ mainly in the two L-amino acids at positions 2 and 4 and demethylation of D-MeAsp and/or Mdha at positions 3 and 7, respectively (Sivonen and Jones, 1999). Their toxicity, based on intraperitoneally (i.p.) injection LD₅₀ values in mice, varies widely from ~50 to >1200 µg/kg (Zurawell et al., 2005). The most common, and also the most extensively studied microcystins are MC-LR (2:Leu, 4:Arg), MC-RR (2:Arg, 4:Arg) and MC-YR (2:Tyr, 4:Arg) (Park and Watanabe, 1995). Replacement of hydrophobic L-Leu in the

first variable position with another hydrophobic L-amino acid (e.g., alanine, phenylalanine or tryptophan) maintains toxicity, but substitution with a hydrophilic amino acid (e.g., arginine) dramatically reduces toxicity. Thus, MCs containing polar substitutions in both variable amino acid positions, such as MC-RR (arginine, arginine) and MC-M(O)R (methionine sulfoxide, arginine), are the least toxic (Zurawell et al., 2005).

MCs have caused mortality in animals and illness in both animals and humans (Carmichael and Falconer, 1993; Moreno et al., 2003), and they have been associated with fish kills (Andersen 1993; Zimba et al., 2001). These threats have led the World Health Organisation (WHO) to establish a provisional guideline value for MC-LR in 1 µg/L of drinking water (WHO, 1998).

The hepatotoxicity of MCs has been studied extensively under both in vivo and in vitro conditions. In fish they have been reported to produce toxic effects not only in the liver (Bury et al., 1997; Tencalla and Dietrich, 1997; Li et al., 2004) but also in the kidney, gills and gastrointestinal tract (Rabergh et al., 1991; Kotak et al., 1996; Carbis et al., 1997; Fisher and Dietrich, 2000; Molina et al., 2005), as well as cardiac (Best et al., 2001; Liu et al., 2002), haematological, biochemical and immunological alterations (Palfková et al., 1998; Koop and Hetesa, 2000),

* Corresponding author. Tel.: +34 954 556762; fax: +34 954 233765.
E-mail address: angelesjos@us.es (Á. Jos).

ionic imbalance and reduced growth (Bury et al., 1995; Wiegand et al., 1999; Jacquet et al., 2004). Moreover, the probable neurotoxicity of MCs is being currently considered (Baganz et al., 2004; Cazenave et al., 2005). Most of these studies however have focused on MC-LR, and other MCs analogs have not been extensively investigated.

One of the well-studied toxic mechanisms of MCs is their ability to inhibit protein phosphatases 1 and 2A, which leads to the increase in protein phosphorylation with two main consequences: the destruction of cytoskeleton directly causing the cytotoxic effects, and deregulation of cell division, leading to the tumor-promoting activity (Carmichael, 1994). At present, there is also evidence suggesting that oxidative damage is involved in the development of the MC toxicity (Bury et al., 1996; Wiegand et al., 1999; Ding et al., 2001; Ding and Ong, 2003; Li et al., 2003, 2005; Moreno et al., 2003; Bouaïcha and Maatouk, 2004; Jos et al., 2005; Pinho et al., 2005; Cazenave et al., 2006).

Cellular oxidative stress is established when the pro-oxidant forces overwhelm the antioxidant defenses. These antioxidant defenses comprise enzymatic and non-enzymatic mechanisms. Some of the most important antioxidant enzymes are superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR); while the non-enzymatic defenses include Vitamins E, C and A, glutathione, carotenes and ubiquinol₁₀ (Wilhelm Filho, 1996). These systems can prevent the formation of oxyradicals or intercept oxidative propagation reactions promoted by the oxyradicals once formed (Bainy et al., 1996). Moreover, they protect cells against DNA strand breaks, protein oxidation and lipid peroxidation (LPO). The latter may result in loss of integrity of lipid membranes and generation of toxic aldehydes (Wiston and DiGiulio, 1991).

Since many environmental contaminants exert toxic effects related to oxidative stress, antioxidant enzymes activities (for instance, SOD, CAT and GR) are being studied as potential biomarkers in environmental risk assessment programs, together with LPO products such as aldehydes (van der Oost et al., 2003).

Mitochondria are the sites where reactive oxygen species (ROS) are mainly produced, and red muscles are the most important source of mitochondria in endotherms. Therefore, this tissue is considered to be the main contributor to ROS generation in mammals and birds. However, in most fish red muscle makes up only a small proportion of tissues, and other tissues such as liver, kidney and also gills (as the first tissue in contact with the xenobiotics or toxins in the water) are more important in this regard (Wilhelm Filho et al., 2000).

Previous studies from our laboratory have shown that MCs from cyanobacterial cells increased LPO values and the enzymatic antioxidant defenses in several tissues of orally exposed tilapia fish under laboratory conditions (Jos et al., 2005). In view of this, this study was undertaken to determine whether MC-LR and MC-RR may induce oxidative stress differently in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). This was done by analyzing the responses of the enzymatic defense system (comprising CAT, SOD, GPx and GR activities). Also, the effects of the potential alterations of the antioxidant status over the lipid peroxidation by means of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) levels were determined.

2. Materials and methods

2.1. Experimental setup and acclimation of fish

Studies were conducted using male *Oreochromis* sp. (Nile tilapia, Perciformes:Cichlidae) with mean weight 54.12 ± 7.1 g. *Oreochromis* sp., indigenous to Africa, is an important group of fish species in commercial fisheries in South America and it is also being introduced in Europe. Moreover, they are commonly found in brackish water in estuaries around the world and respond promptly to environmental alterations (Almeida et al., 2002). Fish were obtained from a fish hatchery in Córdoba and transferred to the laboratory where they were held in aquariums (eight individuals/aquarium) with 96 L of fresh water. Filling the tanks at least 3 days before the fish were introduced minimized exposure to chlorine. The aquariums were also set up with continuous system of water filtration and aeration (Eheim Liberty 150 and Bio-Espumador cartridges (Bio-Espumador) and the temperature was kept constant (21 ± 2 °C). Dissolved oxygen values were maintained between 6.5 and 7.5 mg/L. Mean values for additional parameters of water quality were: pH 7.6 ± 0.2 , conductivity $292 \mu\text{S}/\text{cm}$, Ca^{2+} 0.60 mM/L and Mg^{2+} 0.3 mM/L. Fish were fed with commercial fish food and were acclimatized for 15 days before the beginning of the experiment.

2.2. Cyanobacterial toxins

The cyanobacterial hepatotoxins MC-LR and MC-RR were obtained from Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA, USA) with a purity of 99% for MC-LR and 98% for MC-RR. Standard stock solutions (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and working standard solutions of each toxin were prepared in saline (0.9% NaCl) and the correct dosing concentration was confirmed by high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection, using a Varian model 9012 chromatograph equipped with a Varian ProStar model 330 PDA detector. Chromatographic separation of MCs was performed on a 250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm LiChrosphere C18 column purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Chromatographic determination was performed under isocratic conditions with a mobile phase consisting of 38% MeCN in water with 0.05% TFA (Moreno et al., 2004). The wavelength was set at 240 nm, and the flow rate was 1 mL/min. In these conditions the limits of detection (LODs) were 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for MC-LR and 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for MC-RR.

2.3. Exposure

The experiment was carried out using three aquaria with eight fish in each. Tilapias were exposed intraperitoneally to a single dose of 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR or MC-RR in 0.5 mL of 0.9% (w/v) NaCl solution. The third group of fish received only the vehicle solution (0.5 mL of 0.9%, w/v, NaCl) and was used as control. The dose was selected in accordance with those reported to produce acute toxic effects in fish after i.p. exposure to MCs (Rabergh et al., 1991; Tencalla et al., 1994; Kotak et al., 1996). Fish were observed daily and after 7 days were sacrificed.

2.4. Preparation of postmitochondrial supernatant (PMS)

At the end of the experiment, the fish were anaesthetized by immersion in 50 mg/L tricaine methane sulphonate (MS-222) solution for 5–10 min before they were killed by transection of the spinal cord. Some authors have found hematological disorders in fish due to this narcotic, but at higher concentrations than 250 mg/L (Roubach et al., 2001). In this study, both control and toxin-exposed fish were anaesthetized in the same manner that excludes a specific effect of the product in the stress-related research. The liver, kidney and gills were removed, weighed, rinsed with ice-cold saline and kept at -85°C until analysis. The tissues were homogenized in chilled TRIS buffer (100 mM, pH 7.8; 1:10 w/v) using an Ultra-Turrax[®] tissue homogenizer. The homogenates were centrifuged at 10500 g for 20 min at 4°C to obtain the post-mitochondrial supernatant (PMS) for various biochemical analyses.

2.5. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation products were quantified by the thiobarbituric acid (TBA) method (Esterbauer and Cheeseman, 1990). Malondialdehyde (MDA) is formed as an end lipid peroxidation product. It reacts with TBA reagent under acidic conditions to generate a pink coloured product. Briefly, the homogenized tissue (0.5 mL), previously treated with 25 μL of butylhydroxytoluene 1% (v/v) in glacial acetic acid, was mixed with 0.2 mL of sodium laurylsulphate (8%), 1 mL of acetic acid (20%, v/v) and 1 mL of 0.8% thiobarbituric acid. This mixture was then heated at 95°C for 30 min. The resulting chromogen was extracted with 3 mL of *n*-butyl alcohol, and after centrifugation ($1500 \times g$ for 10 min), the absorbance of the organic phase was determined at 532 nm. 1,1,3,3-Tetramethoxypropane was used as a standard. Values were presented as $\mu\text{mol TBARS/g}$ tissue.

2.6. Antioxidant enzymes

The catalase (CAT; EC 1.11.1.6) assay, consisting of the spectrophotometric measurement of 10 mM H_2O_2 breakdown at 240 nm was assayed following the method of Beers and Sizer (1952).

Total superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was determined by the method of McCord and Fridovich (1969). This assay depends on SOD activity to inhibit cytochrome *c* reduction mediated by the $\text{O}_2^{\bullet-}$ generated from the xanthine oxidase system. SOD activity was monitored spectrophotometrically at 505 nm.

Glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) activity was assayed by following the rate of NADPH oxidation at 340 nm by the coupled reaction with glutathione reductase. The specific activity was determined using the extinction coefficient of 6.22/mM/cm (Lawrence and Burk, 1976). Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activity was determined spectrophotometrically by measuring NADPH oxidation at 340 nm (Carlberg and Mannervik, 1975).

All enzymatic activities are expressed in nkat/mg prot, where 1 kat is the conversion of 1 mol of substrate per second.

2.7. Protein estimation

Protein contents in the samples were estimated by the method of Bradford (1976) using bovine γ -globulin as standard.

2.8. Statistical analysis

All results were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), and represent mean \pm S.E. of eight animals per group. Differences in mean values between groups were assessed by the Tukey's test and were considered statistically different from $p < 0.05$.

3. Results

No fish died during the 7-day experiment.

3.1. Effect of MC-LR and MC-RR on antioxidant enzymes

SOD activity increased significantly in the liver, kidney and gills of fish exposed to 500 $\mu\text{g/kg}$ MC-LR. 500 $\mu\text{g/kg}$ MC-RR induced SOD in kidney but neither liver nor gills showed any significant change (Fig. 1).

An enhanced CAT activity was observed in the liver, kidney and gills of fish subjected to both MC analogs exposure. Kidney and gills showed a basal CAT activity much lower than the liver and were significantly and differentially altered by the MCs variants exposure in the gills (Fig. 2).

No discernible effects were observed in GPx activity in the liver of fish exposed to either MC-LR or MC-RR. In kidney, however, MC-LR significantly increased this enzyme activity while MC-RR did not induce changes, the responses in this organ being statistically different between both MCs. GPx activity in gills did not show significant alterations either (Fig. 3).

GR activity only increased significantly in the liver of fish exposed to MC-LR. Neither kidney nor gills showed significant changes in enzyme activity induced by the MC exposure in comparison to the control group (Fig. 4).

The results showed a different response pattern of both MC analogs in the different organs studied. Thus, MC-LR induced the activity of SOD and CAT in the three organs, GR only in the liver and GP only in the kidney. MC-RR on the other hand, induced CAT activity in all the organs and SOD only in the liver. Moreover, GPx and GR were not influenced by this MC variant.

3.2. Effect of MC-LR and MC-RR on lipid peroxidation

All the organs studied from fish i.p. injected with MC-LR showed a significantly increased level of lipid peroxidation. The liver was the most affected organ. MC-RR also increased LPO values in kidney and gills, while the liver maintained its basal value (Fig. 5). Also a differential response to both MC variants was observed in the liver and kidney of treated fish.

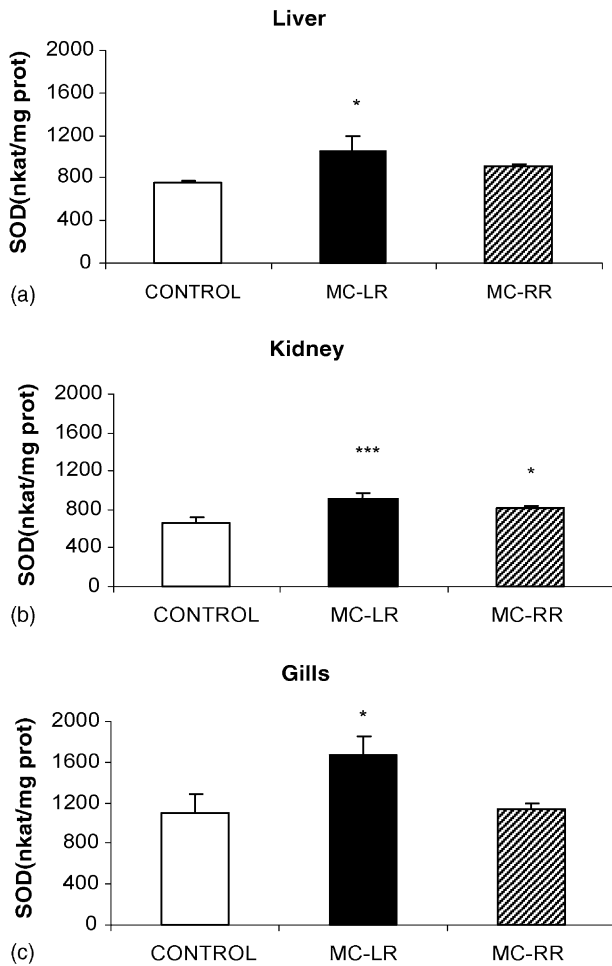


Fig. 1. Superoxide dismutase activity in (a) liver; (b) kidney; and (c) gills of control fish and fish exposed to 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR or 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-RR. The values are expressed as mean \pm S.E. ($n=8$). SOD activity is expressed as nkat/mg protein. The significance levels observed are * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ in comparison to control group values.

4. Discussion

The worldwide occurrence of cyanobacterial blooms makes it necessary to perform environmental risk assessment procedures to monitor the effects of microcystins on fish. Oxidative stress biomarkers are valuable tools in this regard (van der Oost et al., 2003).

The majority of MC-related research has focused on acute toxicity of MCs to laboratory mammals, particularly dealing with MC-LR. Although fish can be exposed to MCs by immersion and oral exposure – actually cyanobacteria are an important dietary component of many tropical cichlids and cyprinids (Bowen, 1982; Spataru and Gophen, 1985) – they are reported to be significantly less sensitive than mammals to MC toxicity. Reported acute LD_{50} values are typically $>500 \mu\text{g}/\text{kg}$ for fish, whereas values for mammals, such as mice, are considerably lower ($\sim 50 \mu\text{g}/\text{kg}$) (Zurawell et al., 2005). The dose of 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR or MC-RR used in this study did not result in any fish death, though Rabergh et al. (1991) found that the LD_{50} of MC-LR in common carp (*Cyprinus carpio* L.) by i.p. injection was between 300 and 550 $\mu\text{g}/\text{kg}$ over 7 days.

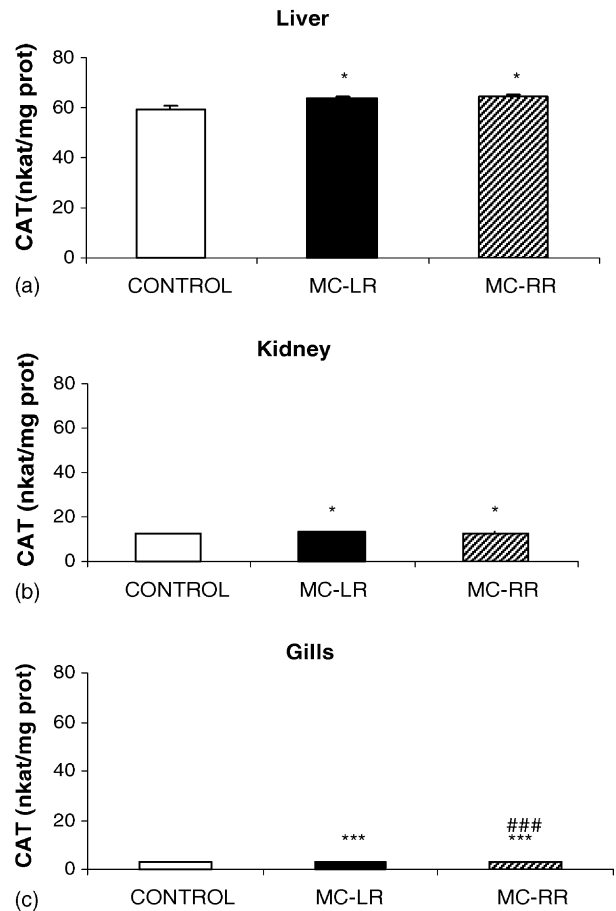


Fig. 2. Catalase activity in (a) liver; (b) kidney; and (c) gills of control fish and fish exposed to 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-LR or 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MC-RR. The values are expressed as mean \pm S.E. ($n=8$). CAT activity is expressed as nkat/mg protein. The significance levels observed are * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ in comparison to control group values and ### $p < 0.001$ compared to MC-LR treated group.

Andersen et al. (1993) also reported a few mortalities in Atlantic salmon (*Salmo salar*) injected i.p. three times with MC-LR at 555 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /injection (spaced 3 days apart) over a 36-day experiment. Kotak et al. (1996) suggested that the LD_{50} of MC-LR in rainbow trout was between 400 and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. It appears, consequently, that there may also be considerable differences in the susceptibility to MC-LR between species of fish (Kotak et al., 1996; Fisher and Dietrich, 2000). Moreover, the nutritional and physiological state of fish can greatly influence the toxicity of MCs (Rabergh et al., 1991). LD_{50} data of MC-RR on fish are, however, scarcer.

Oxidant-mediated effects induced by microcystins have not been widely studied. To the extent of our knowledge this is the first study focused on the differential oxidative stress responses in fish intraperitoneally injected with MC-LR and MC-RR. The results obtained reveal that both MC-LR and MC-RR induce oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*), though non-observable effects were detected in this species.

The increased SOD and CAT activities observed in liver of tilapia after acute exposure to MC-LR are in accordance with previous studies performed with tilapia fish subchronically exposed by oral route to cyanobacterial bloom scum containing

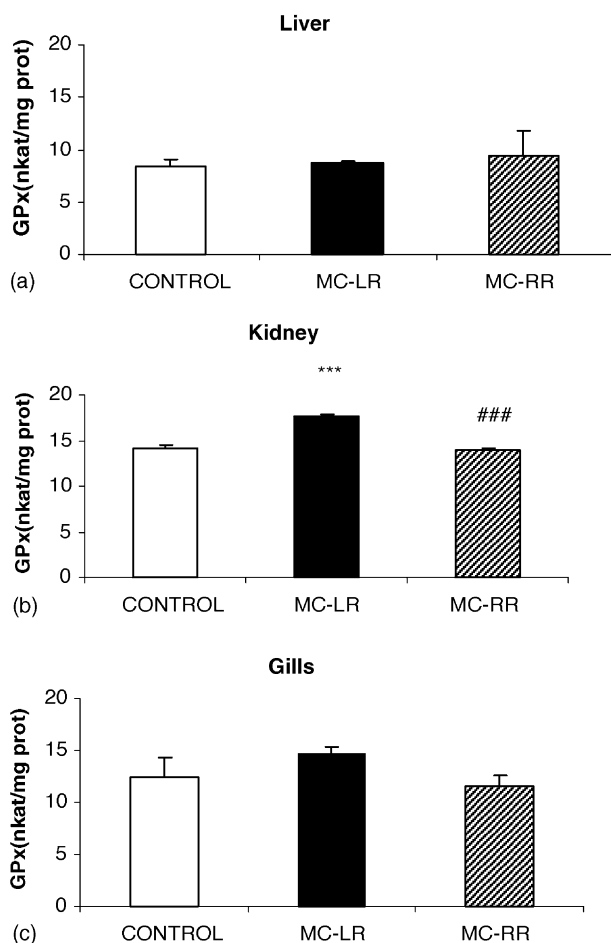


Fig. 3. Glutathione peroxidase activity in (a) liver; (b) kidney; and (c) gills of control fish and fish exposed to 500 µg/kg MC-LR or 500 µg/kg MC-RR. The values are expressed as mean ± S.E. ($n=8$). GPx activity is expressed as nkat/mg protein. The significance levels observed are *** $p < 0.001$ in comparison to control group values and ### $p < 0.001$ compared to MC-LR treated group.

3340 µg/g MC-LR for 21 days (Jos et al., 2005), and with loach (*Misgurnus mizolepis*) subchronically exposed to low doses of MC-RR by oral route (Li et al., 2005). Li et al. (2003) also reported an enhancement of these enzymatic activities by MC-LR in hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.). The liver has been described as the most important organ involved in the regulation of redox metabolism and it is the target organ of MC-LR (Falconer, 1991); therefore, its oxidative status might be affected more extensively by this toxin. In contrast, MC-RR induced both enzymatic activities in the kidney; whereas in liver and gills only an increase in CAT activity was observed, and SOD levels remained unchanged. The observed susceptibility of the kidney to the MC-RR exposure compared to liver and gills, could be related to its higher hydrophilicity than MC-LR, which facilitates its distribution to this organ. Cazenave et al. (2006) have found a dual response of CAT activity in the liver of *Corydoras paleatus* after exposure to dissolved MC-RR, with an increase at low concentrations and a depletion at higher levels.

MC-LR exposure induced a significant increase in GPx activity in kidney, while liver and gills did not show any change. MC-RR did not alter the basal levels of this enzymatic activity

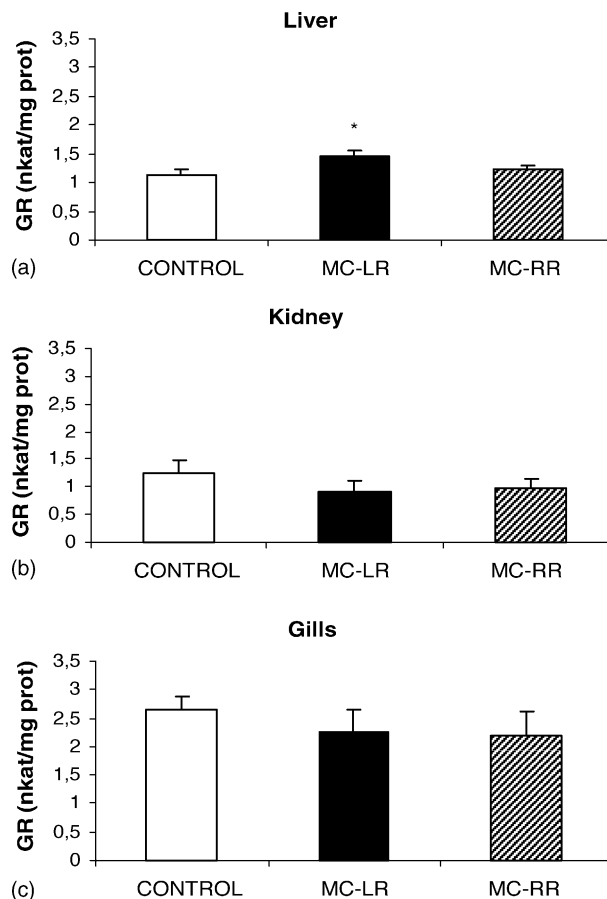


Fig. 4. Glutathione reductase activity in (a) liver; (b) kidney; and (c) gills of control fish and fish exposed to 500 µg/kg MC-LR or 500 µg/kg MC-RR. The values are expressed as mean ± S.E. ($n=8$). GR activity is expressed as nkat/mg protein. The significance level observed is * $p < 0.05$ in comparison to control group values.

in any of the organs studied. Other reports, however, have shown alterations in this enzymatic activity by MC-LR (Jos et al., 2005; Li et al., 2003) and MC-RR (Li et al., 2005; Cazenave et al., 2006). This can be due to the different experimental systems, exposure times, routes and doses employed in these studies.

GR activity was only increased in the liver by MC-LR. No other alterations were detected in any of the experiments performed. In contrast, other authors have reported alterations of this enzymatic activity in the liver, gills and brain of *C. paleatus* exposed to MC-RR by immersion (Cazenave et al., 2006).

The increase in antioxidant enzyme activities indicates the formation of ROS in the target organism (Pinho et al., 2005). In general, SOD and CAT were the enzymes that showed a higher degree of response to the MCs exposure, while GPx and GR barely showed changes. This could be explained due to the important role of SOD in the scavenging of superoxide free radicals, which helps to maintain a balance between oxidants and antioxidants. CAT and GPx act cooperatively as scavengers of hydrogen peroxide (both enzymes) and other hydroperoxides (GPx). In this case CAT activity seems to be enough to control those oxyradicals being GPx activity not extensively induced, and consequently neither was GR activity, that catalyzes the

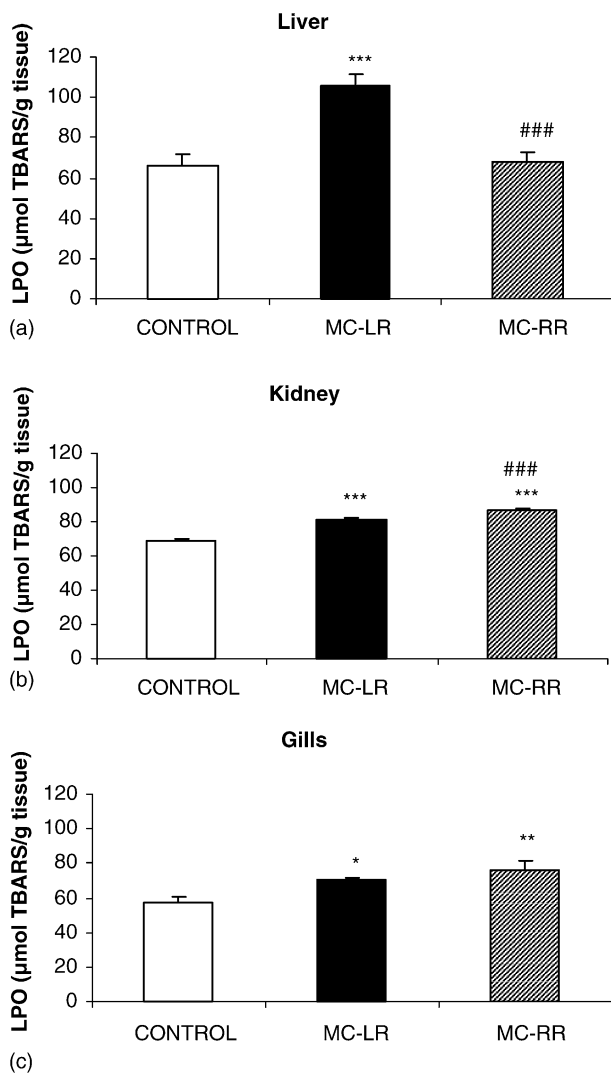


Fig. 5. Lipid peroxidation values in (a) liver; (b) kidney; and (c) gills of control fish and fish exposed to 500 µg/kg MC-LR or 500 µg/kg MC-RR. The values are expressed as mean ± S.E. ($n=8$). LPO values are expressed as µmol TBARS/g tissue. The significance levels observed are * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ in comparison to control group values and ### $p<0.001$ compared to MC-LR treated group.

regeneration of reduced glutathione (GSH) from oxidized glutathione (GSSG) produced by GPx.

One of the main manifestations of oxidative stress is lipid peroxidation, along with protein oxidation and DNA damage. In this study MC-LR induced an increase in TBARS levels in all the organs studied, liver being the most affected one. This is in accordance with the well-known hepatotoxicity of this MC variant. MC-RR also induced lipid peroxidation in kidney and gills. Liver, on the contrary, did not show any change in this biomarker. This can be due to the lower toxicity of MC-RR in comparison to MC-LR and also because the liver is the organ with a higher level of antioxidant enzymes to eliminate ROS and thereby prevent increased lipid peroxidation. This agrees with Li et al. (2005) who reported that loach exposed orally to low doses of MC-RR did not result in increased lipid peroxidation. Other authors however, found a decrease in LPO values in the

liver and gills of MC-RR exposed *C. paleatus* (Cazenave et al., 2006).

The induction of the enzymatic antioxidant defenses after the exposure to MCs could be considered as an adaptive response; that is, a compensatory mechanism that enables the fish to overcome the threat (Di Giulio, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). However, it failed to prevent lipid peroxidation induced by the MCs exposure. MC-LR seems to be a more potent oxidative stressor than MC-RR since it modifies the response of the antioxidant defense system more extensively, and increases lipid peroxidation in all the organs studied.

Apart from the oxidative stress related effects, the i.p. exposure to MCs in fish also produces histopathological alterations, as has been reported in several fish species such as common carp (Rabergh et al., 1991; Carbis et al., 1997) and rainbow trout (Kotak et al., 1996). These studies showed necrosis and degeneration in liver, kidney and gill epithelium. Similar effects have been found in tilapias under subchronic exposure to MCs from cyanobacterial cells (Molina et al., 2005).

The results obtained in the studies dealing with oxidative stress induced by MCs in fish raise questions on the differential antioxidant response found among diverse organs taken into account the route of exposure. Gills are supposed to be prone to suffer from oxidative stress induced by dissolved MCs, which mimics a natural route of exposure. There are also some studies that consider gills the most sensitive organ to the LPO induced by xenobiotics because their antioxidant potential is weaker than that of other organs (Sayeed et al., 2003). In a previous study, induction of LPO in gills was significant in tilapia, which was exposed subchronically to MCs under laboratory conditions (Jos et al., 2005) though the most affected organ was the liver followed by the kidney and finally the gills. In this study, both MC-LR and RR under acute (i.p.) administration increase LPO values, liver being the most sensitive tissue to MC-LR and the kidney to MC-RR. Gills are probably more prone to suffer from lipid peroxidation under exposure via immersion.

The response of the antioxidant defense system to MCs found in this research differs from the results we obtained in previous studies with mammalian models. In contrast to fish, male wistar rats exposed to an i.p. injection of MC-LR showed a decrease in the antioxidant enzymes, specially in the liver, though LPO values were increased (Moreno et al., 2005). Oxidative stress is therefore induced by MCs in both kinds of experimental models though the antioxidant defense system showed a different response. These discrepancies could be due to experimental conditions, doses employed and/or interspecies differences in susceptibility to the acute effects of these toxins.

5. Conclusion

The findings of this study show that the i.p. exposure of tilapia fish to 500 µg/kg MC-LR and 500 µg/kg MC-RR results in the induction of adaptive responses, such as increased activities of antioxidant enzymes, mainly SOD and CAT, and manifestations of oxidant-mediated toxicity such as lipid peroxidation, mostly produced by MC-LR in the liver, and in kidney and gills by both MC-LR and RR. Oxidative stress therefore plays an impor-

tant role in in vivo MC-induced toxicity in tilapia after acute intraperitoneal exposure to these toxins, and different responses were obtained in liver, kidney and gills.

Acknowledgements

The authors wish to thank the CICYT (AGL 2002-02622) for the financial support for this study. Ana I. Prieto is the recipient of a grant from Fundación Farmacéutica Avenzoar.

References

- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.* 27, 673–679.
- Andersen, R.J., Luu, H.A., Chen, D.Z.X., Holmes, C.F.B., Kent, M.L., Le Blanc, M., Taylor, F.J.R., Williams, D.E., 1993. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon netpen liver disease. *Toxicol.* 31, 1315–1323.
- Baganz, D., Staaks, G., Pflugmacher, S., Steinberg, C.E.W., 2004. A comparative study on microcystin-LR induced behavioural changes of two fish species (*Danio rerio* and *Leucaspis delineatus*). *Environ. Toxicol.* 19, 564–570.
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.* 34, 151–162.
- Beers, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133–140.
- Best, J.H., Eddy, F.B., Codd, G.A., 2001. Effects of purified microcystin-LR and cell extracts of *Microcystis* strains PCC 7813 and CYA 43 on cardiac function in brown trout (*Salmo trutta*) alevine. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 171–178.
- Bouaïcha, N., Maatouk, I., 2004. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 148 (1–2), 53–63.
- Bowen, S.H., 1982. Feeding and digestion and growth-qualitative considerations. In: Pullin, R.S.V., Lowe-McConnell, R.H. (Eds.), *The Biology and Culture of Tilapias*. ICLARM Conference Proceedings 7. International Center for Living Aquatic Resource Management, Manila, The Philippines, pp. 141–156.
- Bradford, 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, 248–254.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1995. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial toxin microcystin-LR and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout (*Salmo trutta* L.). *J. Fish Biol.* 46, 1042–1054.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1996. Stress responses of brown trout, *Salmo trutta* L., to the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 11 (3), 187–193.
- Bury, N.R., McGeer, J.C., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1997. Liver damage in brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial heptatoxin Microcystin-LR via the dorsal aorta. *J. Fish Dis.* 20, 209–215.
- Carbis, C.R., Rawlin, G.T., Grant, P., Mitchell, G.F., Anderson, J.W., McCauley, I., 1997. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *J. Fish Dis.* 20, 81–91.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475–5480.
- Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270, 78–86.
- Carmichael, W.W., Falconer, I.R., 1993. Diseases related to freshwater blue green algal toxins, and control measures. In: Falconer, I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, pp. 187–209.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., Amé, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of Microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. *Aquat. Toxicol.* 75, 178–190.
- Cazenave, J., Bistoni, M.A., Pesce, S.F., Wunderlin, D.A., 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* exposed to Microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76, 1–12.
- Di Giulio, R.T., 1991. Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contamination. In: Mayes, M.A., Barron, M.G. (Eds.), *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 15–31.
- Ding, W., Shen, H., Ong, C., 2001. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 64 (6), 507–519.
- Ding, W., Ong, C., 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 220 (1), 1–7.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Method. Enzymol.* 186, 407–421.
- Falconer, I.R., 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6, 177–184.
- Fisher, W.J., Dietrich, D.R., 2000. Pathological and biochemical characterization of Microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 73–81.
- Jacquet, C., Thermes, V., de Luze, A., Puisieux-Dao, S., Bernard, C., Joly, J.-S., Bourrat, F., Edery, M., 2004. Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicol.* 43, 141–147.
- Jos, A., Pichardo, S., Prieto, A.I., Repetto, G., Vázquez, C.M., Moreno, I., Cameán, A.M., 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 72, 261–271.
- Koop, R., Hetesa, J., 2000. Changes of haematological indices of juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) under the influence of natural populations of cyanobacterial water blooms. *Acta Veterinaria Brno* 69, 131–137.
- Kotak, B.J., Semalulu, S., Frytzt, D.L., Prepas, E.E., Hrudey, S.E., Coppock, R.W., 1996. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol.* 34, 517–525.
- Lawrence, A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952–958.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicol.* 42, 85–89.
- Li, X., Chung, I., Kim, J., Lee, J., 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol.* 44, 821–827.
- Li, X., Chung, I., Kim, J., Lee, J., 2005. Oral exposure to *Microcystis* increases activity-augmented antioxidant enzymes in the liver of loach (*Misgurnus mizolepis*) and has no effect on lipid peroxidation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141, 292–296.
- Liu, Y., Song, L., Li, X., Liu, T., 2002. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgurnus mizolepis* Gunther. *Toxicol.* 40, 395–399.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Molina, R., Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Moyano, R., Monterde, J.G., Cameán, A., 2005. Acid and alkaline phosphatases activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicol.* 46, 725–735.

- Moreno, I., Mate, A., Repetto, G., Vázquez, C.M., Cameán, A.M., 2003. Influence of Microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. *J. Physiol. Biochem.* 59 (4), 293–300.
- Moreno, I., Carballal, E., Leao, M., Gago, A., Cameán, A.M., 2004. Decomposition of Microcystins MC-LR, MC-RR and MC-YR of water samples submitted to in vitro dissolution tests. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5933–5938.
- Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Gómez-Amores, L., Mate, A., Vázquez, C.M., Cameán, A.M., 2005. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol.* 45, 395–402.
- Palíková, M., Kovárů, F., Kubala, L., Pesak, S., Vajcová, V., 1998. The effects of pure microcystin LR and biomass of blue-green algae on selected immunological indices of carp (*Cyprinus carpio* L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). *Acta Veterinaria Brno* 67, 265–272.
- Park, H.-D., Watanabe, M.F., 1995. Toxic *Microcystis* in eutrophic lakes. In: Watanabe, M.F., Harada, K., Carmichael, W.W., Fujiki, H. (Eds.), *Toxic Microcystis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 57–77.
- Pinho, G.L.L., Rosa, M.C., Maciel, F.E., Bianchini, A., Yunes, J.S., Proenca, L.A.O., Monserrat, J.M., 2005. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 353–360.
- Rabergh, C.M.I., Bylund, G., Eriksson, J.E., 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat. Toxicol.* 20, 131–146.
- Roubach, R., Gomes, L.C., Val, A.L., 2001. Safest level of tricaine methanesulfonate (MS-222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxa, *Brycon cephalus*. *Acta Amazonica* 31, 159–163.
- Sayed, I., Parvaez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 295–301.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E and FN Spon, London, pp. 41–111.
- Spataru, P., Gophen, M., 1985. Feeding behavior of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* Val. and its impact on the food web of Lake Kinneret, Israel. *Hydrobiologia* 120, 53–61.
- Tencalla, F.G., Dietrich, D.R., Schattler, C., 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 30, 215–224.
- Tencalla, F., Dietrich, D., 1997. Biochemical characterization of Microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol.* 35, 583–595.
- 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.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.
- WHO, 1998. *Guidelines for Drinking-Water Quality, Addendum to vol. 2*. World Health Organisation, Geneva.
- Wiegand, C., Pflumacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, K.A., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A., 1999. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 14, 89–95.
- Wilhelm Filho, D., 1996. Fish antioxidant defenses. A comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1735–1742.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Marcon, J.L., Fraga, C.G., Boveris, A., 2000. Comparative antioxidant defences in vertebrates—emphasis on fish and mammals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 7, 33–45.
- Wiston, G.W., DiGiulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.
- Zimba, P.V., Khoo, L., Gaunt, P., Carmichael, W.W., Brittain, S., 2001. Confirmation of catfish mortality from *Microcystis* toxins. *J. Fish Dis.* 24, 41–47.
- Zurawell, R.W., Chen, H., Burke, J.M., Prepas, E.E., 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J. Toxicol. Environ. Health B* 8, 1–37.

Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions

Ana I. Prieto, Silvia Pichardo, Ángeles Jos*, Isabel Moreno, Ana M. Cameán

Area of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Profesor García González no. 2, 41012 Seville, Spain

Received 7 March 2007; received in revised form 20 June 2007; accepted 22 June 2007

Abstract

Microcystins (MCs) have been reported to induce oxidative stress in aquatic organisms including fish. The effect of acute exposure to toxic cyanobacterial material containing MCs on antioxidant enzymes and lipid peroxidation has been studied in liver, kidney and gills of tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). Fish were orally exposed to a single dose of cyanobacterial cells containing 120 µg/fish MC-LR and sacrificed at 24 and 72 h. The activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes in the studied organs decreased in general 24 and 72 h after the dose application, although elevation of CAT and GR was found in liver at 72 h post exposure in comparison to 24 h values. In contrast, the lipid peroxidation level increased significantly in all the studied organs with the liver (3.6-fold) proving to be the most affected. Protein oxidation was also increased 1.5-fold in the liver. However, recovery in these parameters was observed in liver 72 h after exposure. The results show that an acute dose of MCs does not induce an adaptative response of the antioxidant enzymes, as a sub-chronic exposure to MCs in tilapia fish does, but a general decrease in them with an initial recovery of the oxidative damage after 72 h, expressed as enhancement of CAT and GR activities and a reduction of LPO and protein oxidation in comparison to 24 h values.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cyanobacteria; Microcystin; Tilapia; Fish; Oxidative stress

1. Introduction

Contamination of water with cyanobacteria is a serious health problem around the world, largely due to the toxic effects of microcystins (MCs), which are considered the most common and dangerous group of cyanotoxins (Chorus and Bartram, 1999). MCs can be produced by several genera of cyanobacteria such as *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Nodularia* and mainly *Microcystis*. Aquatic organisms can be naturally exposed to MCs via the consumption of toxic cyanobacteria (Li et al., 2004) or passively when the toxin passes through gills during breathing (Zimba et al., 2001).

Massive fish kills have been occasionally related to severe cyanobacterial blooms (Rodger et al., 1994). Many of these incidents have been attributed to indirect effects, such as oxygen depletion (Peñalosa et al., 1990) or increased ambient ammonia

concentrations (Bury et al., 1995). Nevertheless, accounts exist that implicate cyanobacterial hepatotoxins in fish mortality in bloom-prone lakes and reservoirs (Rodger et al., 1994; Ernst et al., 2001).

Cyanobacteria are an important dietary component of many tropical cyprinids and cichlids (e.g. Tilapia) (Zurawell et al., 2005). Moreover, freshwater fish as well as other aquatic organisms, cannot only be damaged by cyanobacterial toxins but are also able to bioaccumulate them (Magalhaes et al., 2003). The ingestion of contaminated food thus represents a human health risk. Indeed, tilapia fish have been reported to accumulate MCs (Mohamed et al., 2003; Soares et al., 2004).

The toxicity of MCs has been usually associated with irreversible binding and inhibition of protein phosphatases 1 and 2A (MacKintosh et al., 1990). Immunomodulatory activity is another way in which MCs effect their toxicity. For example, it has been reported that MCs decreased mRNA expression of iNOS and some cytokines in mice (Chen et al., 2005).

Moreover, cyanobacterial extracts can also enhance intracellular production of reactive oxygen species (ROS) (Ding et al.,

* Corresponding author. Tel.: +34 954 556762; fax: +34 954 233765.
E-mail address: angelesjos@us.es (Á. Jos).

1998). Furthermore, MCs have been reported to be responsible for oxidative stress induced in many species: mice (Gehring, 2004); rat (Moreno et al., 2003); and aquatic organisms such as crab (Pinho et al., 2005) and fish (Mourente et al., 2002; Li et al., 2005; Jos et al., 2005; Cazenave et al., 2006; Prieto et al., 2006).

As a result of the oxidative stress caused, fish, like many other vertebrates, try to reduce the damage using the antioxidant defence system. This includes radical scavenging enzymes: catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) acting on hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$), respectively, and glutathione peroxidase (GPx), which scavenges H_2O_2 and lipid hydroperoxides. Associated enzymes include glutathione reductase (GR), which acts to maintain levels of reduced glutathione (Halliwell and Gutteridge, 1984). Also, the defence system includes many other antioxidants such as glutathione (GSH), vitamins E, C and A, carotenes and ubiquinol₁₀ (Wilhelm, 1996). MCs have been reported to induce a marked decrease of GSH contents in hepatocytes of common carp (Li et al., 2003).

Tilapias (*Oreochromis niloticus* sp.) have been extensively employed to study the antioxidant response to many toxic substances (metals, herbicides, etc.). In this way, Almeida et al. (2002) used antioxidant enzymes, SOD and GPx, as biomarkers in liver and muscle from tilapia exposed to in vivo cadmium contamination. Further, Basha and Rani (2003) reported increases of SOD, xanthine oxidase (XO), CAT and GPx activities in liver and kidney of tilapia exposed to sublethal concentrations of cadmium chloride. Alteration of CAT activity was reported by Atli et al. (2006) in tilapia liver, kidney, gill, intestine and brain upon metal exposure. Peixoto et al. (2006) exposed tilapia to the herbicide oxyfluorfen showing increased GR and SOD activities in liver. The effect of another herbicide (2,4-dichlorophenoxy acetic acid dimethyl amine salt) and an insecticide (azinphosmethyl) were investigated in hepatic antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in tilapia (Oruç and Üner, 2000).

Previous investigations of our research group have shown that cyanobacterial material containing MCs is able to induce oxidative stress in tilapia fish when they are exposed sub-chronically (14 and 21 days) by oral route to an equivalent of 60.0 μg MC-LR/fish/day (Jos et al., 2005). We have also shown that pure toxins MC-LR and MC-RR induce a differential oxidative stress response in tilapia exposed intraperitoneally (Prieto et al., 2006). Taking these results into account, the aim of the present study was to investigate the response of the activities of the antioxidant enzymes SOD, CAT, GPx, and also the activity of GR, the enzyme reducing oxidized glutathione (GSSG) to its reduced state (GSH), and the lipid peroxidation status in liver, kidney and gills of tilapia fish acutely exposed by oral route to a single dose of cyanobacterial material containing 120.0 μg MC-LR/fish. The fish were sacrificed 24 or 72 h after the exposure. Additionally, the protein oxidation and the MCs content have been determined in the liver of the fish. This investigation allows us to determine how the antioxidant status of tilapia fish varies with time in the experimental conditions used. From the results it is possible to evaluate the recovery from the damage induced.

2. Materials and methods

2.1. Experimental set up and acclimation of fish

Male *O. niloticus* sp. (Nile tilapia, Perciformes: Cichlidae), average weight 50 ± 8 g, were obtained from a fish hatchery in Córdoba. Fish were transferred to the laboratory where they were held in aquaria (eight individuals/aquarium) with 96 L of fresh water. Exposure to chlorine was minimized by filling the tanks at least 3 days before the fish were introduced. The aquaria were also set up with continuous system of water filtration and aeration (Eheim Liberty 150 and Bio-Espumador cartridges (Bio-Espumador)) and the temperature varied between 20 and 24 °C. Dissolved oxygen values were maintained between 6.5 and 7.5 mg/L. Mean values for additional parameters of water quality were: pH 7.6 ± 0.3 , conductivity 287 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Ca^{2+} 0.60 mM and Mg^{2+} 0.3 mM. Fish were fed with commercial fish food and were acclimatized for 15 days before the beginning of the experiments.

2.2. Collection of *Microcystis aeruginosa* strain culture and determination of cyanobacterial toxins

Lyophilized *M. aeruginosa* isolated strain culture was kindly supplied by Dr Susana Franca (Lisboa, Portugal). MCs contained were extracted from dried cell material using the method of Moreno et al. (2004). The lyophilized cells (50 mg) were extracted three times with 10 mL 0.1 M acetic acid and 20 mL of a mixture of methanol:chloroform (1:1 v/v). The cell suspension was sonicated in an ultra-sound bath for 15 min, stirred for 30 min at room temperature, and then centrifuged at $4500 \times g$ for 15 min. The upper aqueous phases were combined and concentrated in a rotary evaporator. The residue was re-suspended in 0.5 mL methanol for chromatographic separation.

The LC system used to analyse the toxin contents was a Varian 9012 equipped with a Varian ProStar 330 Diode Array Detector. Chromatographic data was processed with a Star Chromatography Workstation (Varian Technologies). Chromatographic separation of MCs was performed according to Moreno et al. (2004) on a 250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm , LiChrosphere C18 column purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Microcystin standards were supplied by Cyanobiotec (Germany). Standard solutions of microcystins MC-LR, MC-YR and MC-RR were prepared in methanol (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and diluted as required with methanol for use as working solutions (0.5–5.0 mg/L of each toxin). Only MC-LR was identified in the cyanobacterial cell extracts analysed and the peak area of the MC-LR standard solution was applied for quantification. The concentration of MCs obtained from lyophilised cells was 1350 $\mu\text{g}/\text{g}$ MC-LR.

2.3. Exposure

Tilapia fish in two test aquaria ($n = 8$) were fed with commercial fish food plus lyophilised cyanobacterial cells, containing 1350 $\mu\text{g}/\text{g}$ MC-LR. Cyanobacterial cells were fed to the fish by manually crushing a mixture of both components (fish food and

toxic cells) in a mortar followed by sonication. This procedure resulted in small sticky pellets and was designed to replicate the type of exposure that may occur when a bloom of cyanobacteria undergoes lysis under field conditions releasing its MC contents. The pellets were placed in the tank and drifted to the bottom for the fish to take. It was ensured that all the pellets were eaten within an hour. The amount of commercial fish food administered per fish was 0.3 g/day and the quantity of cyanobacterial cells was selected in order to dose approximately 120.0 µg MC-LR/fish (determined from HPLC analysis). Afterwards, the fish were sacrificed at two different periods of time, 24 and 72 h.

Two control groups of fish ($n=8$) were administered only the commercial fish food during the whole experiment and were sacrificed in two different periods of time, 24 and 72 h, at the same time as exposed fish.

2.4. Extraction and determination of MCs

MCs in the livers of each group of fish were extracted according to Moreno et al. (2005a). Fish tissues were homogenized with 85% methanol twice, the extract once evaporated was re-dissolved in 0.25 mL of 100% methanol. Afterwards this extract was dried by sterilized air and percolated in PBS buffer (1/2 to 1/3) to get a methanol concentration under 15% (v/v). MC content was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Envirogard_R, Strategic Diagnostic Inc., Newark, USA) according to Moreno et al. (2004).

2.5. Preparation of post-mitochondrial supernatant (PMS)

At the end of the experiment, the fish were anaesthetized by immersion in 50 mg/L tricaine methane sulphonate (MS-222) solution for 5–10 min before they were killed by transection of the spinal cord. Both control and toxin-exposed fish were anaesthetized in the same manner, which excludes a specific effect of the product in the stress-related research. The liver, kidney and gills were removed, weighed, rinsed with ice-cold saline and kept at -85°C until analysis. The tissues were homogenized in chilled Tris buffer (100 mM, pH 7.8; 1:10 w/v) using an Ultra-Turrax[®] tissue homogenizer. The homogenates were centrifuged at $10,500 \times g$ for 20 min at 4°C to obtain the post-mitochondrial supernatant (PMS) for various biochemical analysis.

2.6. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation products were quantified by the thiobarbituric acid (TBA) method (Esterbauer and Cheeseman, 1990). End lipid peroxidation products react with TBA reagent under acidic conditions to generate a pink coloured product. Briefly, the homogenized tissue (0.5 mL), previously treated with 25 µL of butylhydroxytoluene 1% mass/vol in glacial acetic, was mixed with 0.2 mL of sodium laurylsulphate (8%), 1 mL of acetic acid (20% vol/vol) and 1 mL of 0.8% thiobarbituric acid. This mixture was then heated at 95°C for 30 min. The resulting chromogen was extracted with 3 mL of *n*-butyl alcohol and, after centrifugation ($1500 \times g$ for 10 min), the

absorbance of the organic phase was determined at 532 nm. 1,1,3,3-Tetramethoxypropan was used as a standard. Values were presented as nmol TBARS/g tissue.

2.7. Protein carbonyl content

We followed the method described by Levine et al. (1990). Briefly, two test tubes of 1.0 mL containing 30 and 60 µL homogenized sample, respectively, (≈ 10 – 20 mg protein) were taken. 0.5 mL of fresh 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) prepared in 2 M HCl was added to the tubes, and the contents were mixed thoroughly and incubated at room temperature for 1 h. The tubes were shaken intermittently every 15 min. Then 0.5 mL of 20% TCA (w/v) was added to both tubes, which were centrifuged at $11,000 \times g$ for 3 min to obtain the protein pellet. The supernatant was carefully aspirated and discarded. Finally, the precipitates were washed three times with 0.5 mL of ethanol:ethyl acetate (1:1, v/v) to remove unreacted DNPH and lipid remnants. The final protein pellet was dissolved in 0.6 mL of 6 M guanidine hydrochloride and incubated overnight at room temperature. The insoluble materials were removed by centrifugation and the absorption of the supernatant was measured spectrophotometrically at 366 nm. Results are expressed as nmol carbonyl/mg protein, using the extinction coefficient $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.8. Antioxidant enzymes

The catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity assay, consisting of the spectrophotometric measurement of H_2O_2 breakdown, measured at 240 nm, was performed following the method of Beers and Sizer (1952). The assay mixture contained 0.3 mL phosphate buffered saline (PBS), 2.07 mL H_2O , 30 µL homogenized tissue and 0.6 mL H_2O_2 (10 mM). The final concentrations in the cuvettes were thus 50 mM potassium phosphate (pH 7), 20 mM H_2O_2 and homogenized tissue (30 µL).

Total superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was determined by the method of McCord and Fridovich (1969). This assay depends on the ability of SOD to inhibit cytochrome *C* reduction mediated by the $\text{O}_2^{\bullet-}$ generated by the xanthine oxidase system. The assay mixture contained 0.51 mL potassium phosphate–EDTA buffer (pH 7.8), 0.1 mL xanthine 50 µM, 0.1 mL cytochrome *C* 500 µM, 50 µL homogenised tissue and H_2O . The reaction was initiated by the addition of 10 µL xanthine oxidase. SOD activity was monitored spectrophotometrically at 505 nm. One unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme that gave 50% inhibition of the control rate of cytochrome *c* reduction.

Glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) activity was assayed following the rate of NADPH oxidation at 340 nm by the coupled reaction with glutathione reductase. The assay mixture contained 600 µL buffer with 50 mM potassium phosphate + 1 mM EDTA + 1 mM NaN_3 , (pH 7.5); 100 µL 0.2 mM reduced glutathione (GSH), 100 µL 0.1 mM NADPH, 8 µL glutathione reductase and homogenized tissue (20 µL). After 5 min of preincubation (20 – 25°C), the reaction was initiated by the addition of 100 µL 0.25 mM H_2O_2 . The specific activity was

determined using the extinction coefficient of $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Lawrence and Burk, 1976).

Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activity was determined spectrophotometrically measuring NADPH oxidation at 340 nm (Carlberg and Mannervik, 1975). The reaction mixture contained 600 μL of the buffer containing 0.1 M potassium phosphate + 0.5 mM EDTA + 0.1 mM KCl (pH 7.5), 100 μL 0.1 mM NADPH, 100 μL H_2O , and 100 μL homogenized tissue. After 5 min of preincubation (37°C), the reaction was initiated by addition of 100 μL 1 mM GSSG. All enzymatic activities are expressed in U or mU/mg protein.

2.9. Protein estimation

Protein contents in the samples were estimated by the method of Bradford (1976) using bovine γ -globulin as standard.

2.10. Statistical analysis

All results were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), and represent means \pm S.E. of eight animals per group. Differences in mean values between groups were assessed by the Tukey's test and were considered statistically significant at $P < 0.05$ level.

3. Results

3.1. Effect of cyanobacterial cells on lipid peroxidation

The liver was the most affected organ, showing a significant 3.6-fold induction of lipid peroxidation in fish exposed to cyanobacterial cells and sacrificed at 24 h. At this time point, kidney and gills maintained basal values for the LPO (Fig. 1). However, after 72 h all the organs studied showed a significant increase of lipid peroxidation in comparison with control groups. Comparing 24 and 72 h LPO results, a significant increase was observed in kidney (1.8-fold) and gills (1.4-fold) but a 1.2-fold decrease in liver.

3.2. Effect of cyanobacterial cells on protein oxidation

The results of protein carbonyl contents (nmol carbonyl/mg protein) on the liver of the exposed fish are shown in Table 1. Liver of fish sacrificed 24 and 72 h post exposure showed a 1.5 and 1.3-fold increase in carbonyl content in comparison to their respective control groups. Moreover, a slight and significant decrease was observed over the time.

3.3. Effect of cyanobacterial cells on antioxidant enzymes

CAT activity decreased in liver (2.1-fold) and kidney (1.5-fold) of fish exposed to cyanobacterial cells and sacrificed 24 h afterwards, with the liver proving to be the most affected organ (Fig. 2). No significant changes were observed in gills in any of the experiments performed. Tilapia fish sacrificed 72 h after exposure showed a significant CAT activity reduction (1.6-fold)

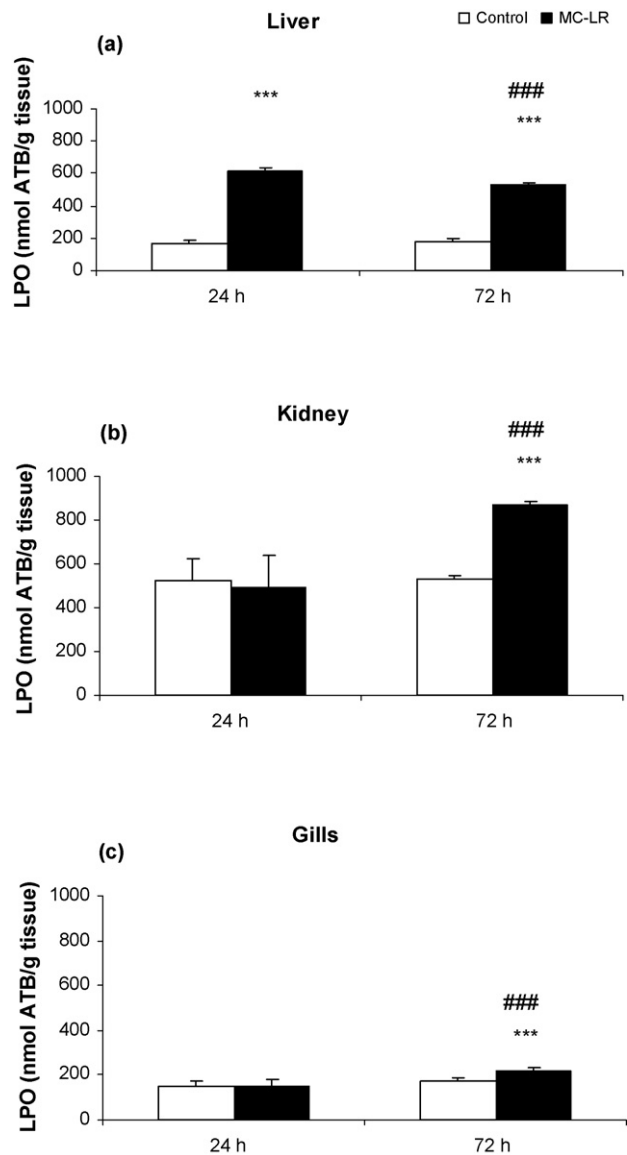


Fig. 1. Lipid peroxidation values in (a) liver (b) kidney and (c) gills of control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = $120.0 \mu\text{g}/\text{fish}$). The values are expressed as mean \pm S.E. ($n = 8$). LPO values are expressed as nmol TBARS/g tissue. The significance levels observed are *** $P < 0.001$ in comparison to control group values and ### $P < 0.001$ compared to 24 h group.

Table 1

Protein oxidation values measured as nmol carbonyl/mg protein, in liver of control fish and fish orally exposed to a single dose of cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = $120.0 \mu\text{g}/\text{fish}$) and sacrificed at 24 and 72 h after the dose application

Time after dose application (h)	Experimental group	nmol carbonyl/mg protein
24	Control	61.8 ± 0.1
	MC-treated	$95.4 \pm 4^{***}$
72	Control	63 ± 0.2
	MC-treated	$85.6 \pm 1.6^{***(\#)}$

The values are expressed as mean \pm S.E. ($n = 8$). The significance levels observed are *** $P < 0.001$ in comparison to control group values and # $P < 0.05$ compared to 24 h group.

in kidney, while gills maintained the basal values. In liver, significant 1.2-fold reduction of CAT activity was observed after 72 h compared to the control group, whereas in comparison to the 24 h group CAT activity showed a very significant increase in 72 h.

SOD activity showed a significant decrease in liver and kidney of fish exposed to cyanobacterial cells and sacrificed after 24 and 72 h. Kidney showed the biggest difference (Fig. 3) with a 1.4-fold reduction. No discernible effects were observed in SOD activity in gills in any of the experimental groups. There were no significant differences between the 24 and 72 h samples in any of the organs studied.

A reduction in GPx activity was observed in kidney (1.3-fold decrease) (Fig. 4). However, no noticeable changes were distinguished in liver and gills of fish exposed to cyanobacterial cells.

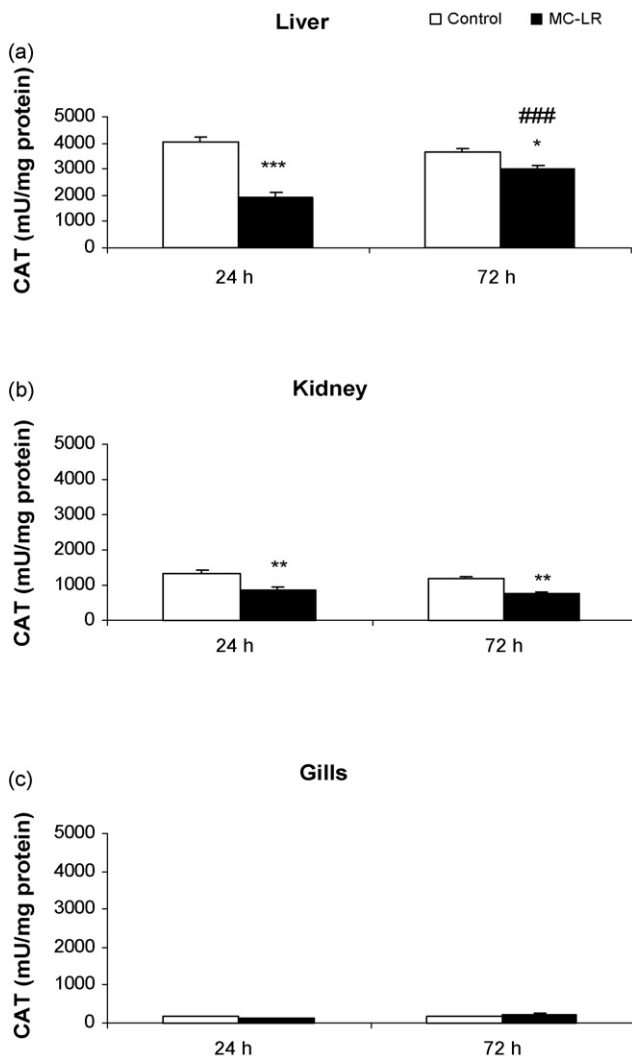


Fig. 2. Catalase activity in (a) liver (b) kidney and (c) gills of control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 120.0 μ g/fish). The values are expressed as mean \pm S.E. ($n=8$). CAT activity is expressed as mU/mg protein. The significance levels observed are * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ in comparison to control group values and ### $P<0.001$ compared to 24 h group.

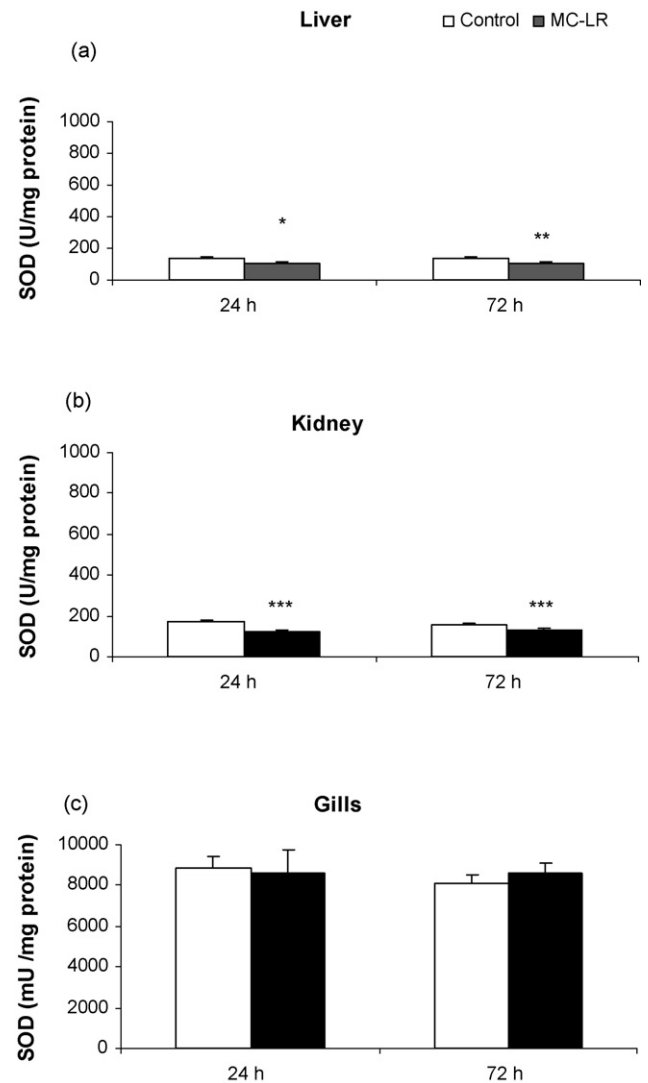


Fig. 3. Superoxide dismutase activity in (a) liver (b) kidney and (c) gills of control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 120.0 μ g/fish). The values are expressed as mean \pm S.E. ($n=8$). SOD activity is expressed as mU or U/mg protein. The significance levels observed are * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ in comparison to control group values.

GR activity only decreased significantly (1.9-fold) in the kidney of fish exposed to cyanobacterial material (Fig. 5). In liver, a significant elevation (1.3-fold) was observed in fish sacrificed 72 h after exposure. MC exposure did not result in appreciable changes in the enzyme activity in the gills in comparison to the control group.

Moreover, we have estimated the concentration of MCs over time in the liver of fish by ELISA. The MC concentration in the liver of fish sacrificed 24 h post exposure ranged between 0.065 and 0.10 ng MC-LR equiv./g liver while no detectable level of MCs was found in this organ in fish sacrificed 72 h after the dose application.

4. Discussion

MCs have been reported to cause toxic effects, including oxidative stress, in fish when the toxins are applied by oral route

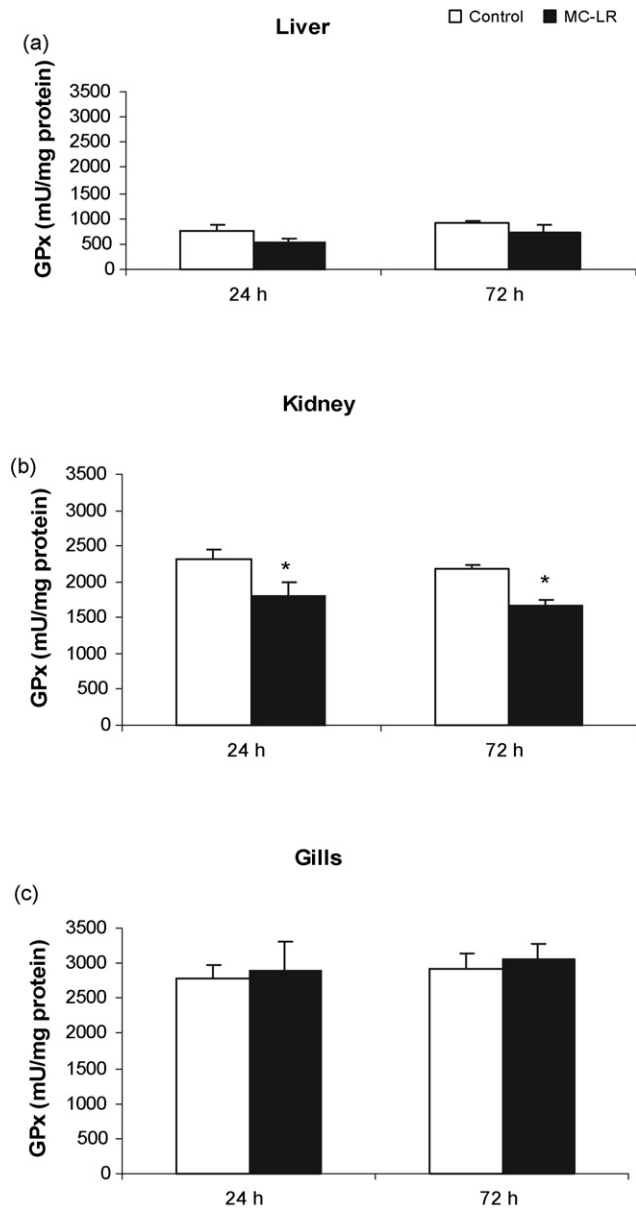


Fig. 4. Glutathione peroxidase activity in (a) liver (b) kidney and (c) gills of control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 120.0 $\mu\text{g}/\text{fish}$). The values are expressed as mean \pm S.E. ($n = 8$). GPx activity is expressed as mU/mg protein. The significance levels observed are * $P < 0.05$ in comparison to control group values.

(Jos et al., 2005; Li et al., 2005), by immersion (Cazenave et al., 2006), or intraperitoneally (Prieto et al., 2006). Regarding the oral route, Jos et al. (2005) showed higher toxic effects when fish were fed with crushed cyanobacterial cells (released toxins) than when the fish were exposed to non crushed cells. In view of these results, this kind of administration was chosen in the present work in order to guarantee as large effects as possible.

Many experimental studies have been conducted to document that cyanobacterial exposure through the gastrointestinal system can cause toxic effects on many fish species such as common carp (Fischer and Dietrich, 2000), silver carp (Xie et al., 2007), loach (Li et al., 2005), rainbow trout (Tencalla and Dietrich, 1996), tilapia (Mohamed et al., 2003; Mohamed and Hussein,

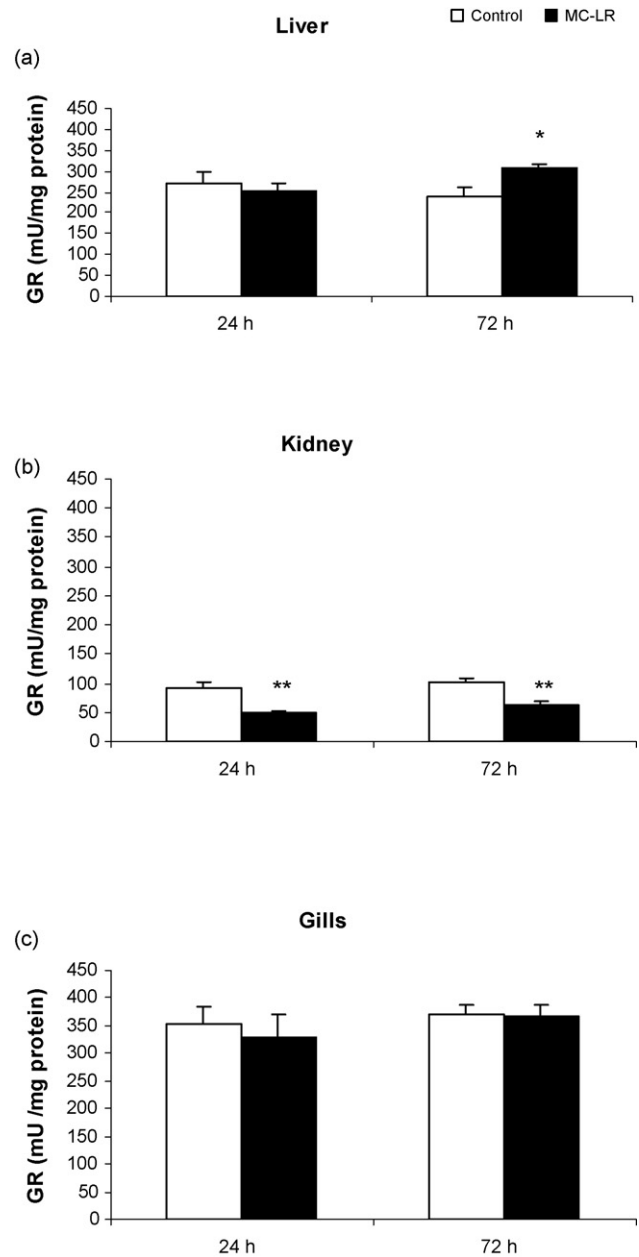


Fig. 5. Glutathione reductase activity in (a) liver (b) kidney and (c) gills of control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 120.0 $\mu\text{g}/\text{fish}$). The values are expressed as mean \pm S.E. ($n = 8$). GR activity is expressed as mU/mg protein. The significance levels observed are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ in comparison to control group values.

2006). However, studies focussing on acute oral effects, particularly on oxidative stress, in the first days after exposure are still very scarce, although Ernst et al. (2006) studied the oral toxicity of *Planktothrix rubescens* in European whitefish, showing toxic effects from 24 h after exposure.

The current study revealed that the most affected organ with regard to the antioxidant enzyme status was the kidney, whereas the liver was the most affected organ with regard to the lipid peroxidation. No significant changes were observed in gills apart from an increase in lipid peroxidation of fish sacrificed 72 h after exposure. The alterations observed in the liver can be explained

with the affinity of MCs to this organ. Fischer et al. (2005) explained hepatotoxicity of MCs by their transport mediated by members of the organic anion transporting polypeptide, a superfamily of membrane transporters that are expressed in hepatocytes and in the blood–brain barrier. This can explain why LPO was altered in liver already at 24 h, whereas in kidney and gills the effect was significant only after 72 h.

In addition to the liver damage, MCs can also affect other organs in fish such as kidney (rainbow trout, Kotak et al., 1996; tilapias, Molina et al., 2005), gills (common carp, Rabergh et al., 1991), intestine (tilapia, Molina et al., 2005), heart (brown trout, Best et al., 2001; loach, Liu et al., 2002), and brain (Cazenave et al., 2006). The most affected organs in fish are liver and kidney, with hepatocyte dissociation and degeneration in liver and dilation of Bowman's capsule in kidney (Zurawell et al., 2005). Indeed, similar findings were observed in histopathological studies performed in our laboratory in liver and kidney of tilapia exposed sub-chronically to toxic cyanobacterial blooms, where only slight histopathological changes were detected in gills (Molina et al., 2005). All these reports agree with the present results, which show larger alterations in the enzyme activities and lipid peroxidation of liver and kidney than of gills. Moreover, no gill pathology was observed in the oral toxicity study of the MC-containing cyanobacterium *P. rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*) (Ernst et al., 2006). In contrast with these results, Cazenave et al. (2006) demonstrated alterations of antioxidant enzyme activities (GR and GPx) in gills of fish (*Corydoras paleatus*) exposed to MC-RR by immersion. Thus, the exposure route influences the location of the major toxic effects induced by MCs.

The alterations in antioxidant enzyme activities detected were also observed in previous studies performed in our laboratory in which tilapia were orally exposed to cyanobacterial cells during 14 and 21 days (Jos et al., 2005), and intraperitoneally to an acute dose of pure MCs (Prieto et al., 2006). The largest changes in the present work were observed in general for CAT and SOD activities in the liver and the kidney, as in previous studies performed. Li et al. (2005) also reported a greater variation of SOD and CAT activities in comparison to GPx in the liver when loaches were orally exposed to a *Microcystis* bloom for 28 days. However, no effect was found on lipid peroxidation. Nevertheless, although Jos et al. (2005) showed an increase in the antioxidant enzymes studied, in the present work a decrease as compared to controls is observed. This might be due to the different exposure periods and MC doses used in the experiments: in the experiments of Jos et al. (2005) fish were exposed to 60.0 µg MC-LR/fish/day for 21 days, whereas in the present study a single dose of 120.0 µg MC-LR/fish was given and fish sacrificed 24 or 72 h after the exposure. The higher MC dose may damage the enzyme proteins while lower dose, given for a longer period of time, may induce a defensive response. In fact, rats exposed intraperitoneally to an acute dose of pure MC-LR showed a significant decrease in the antioxidant enzymes (CAT, SOD, GR and GPx) (Moreno et al., 2005b).

Lipid peroxidation is particularly important for aquatic animals since they normally contain greater amounts of highly unsaturated fatty acids (HUFA) than other species (Huang et

al., 2003). It must be pointed out that lipid and protein oxidation in liver are higher after 24 h and diminish significantly after 72 h, indicating that the tilapia defence system was initially overwhelmed. Pinho et al. (2005) also reported an increase of both parameters in the hepatopancreas of crabs orally exposed to MCs. The recovery of the damage could be explained, in part, by the increased activities of CAT and GR observed in the liver of fishes sacrificed after 72 h compared to those sacrificed after 24 h. However, the activities of antioxidant enzymes studied in the kidney and gills as well as SOD and GPx activities in liver do not show a clear functional recovery, possibly because a longer time is required for the de novo synthesis of proteins. In this sense, Sun et al. (2006) reported that antioxidant enzymes such as CAT, SOD and glutathione-S-transferase (GST) in fish exposed to 0.05 mg/L phenanthrene, needed 14 days to recover their activity after an initial reduction.

The decrease of the effects observed in LPO between the 24 and 72 h samples can be also explained taking into account the MC depuration in fish. There is evidence that some aquatic organisms, such as macrophytes, mollusks, crustacea, and fish, can accumulate and detoxify MCs in their tissues via the Phase II detoxication pathway (Pflugmacher and Wiegand, 2001). These studies showed the conversion of MCs in animal liver to a more polar compound in correlation with a depletion of the glutathione pool of the cell by forming a MC-LR glutathione conjugate enzymatically via soluble glutathione S-transferase (Pflugmacher et al., 1998).

The level of MCs detected in the liver of the exposed fish in this study, higher at 24 h and none detected at 72 h post exposure agrees with the results obtained in the biochemical determinations, LPO and enzyme activities. There are also several studies on accumulation and depuration of MCs in fish and other aquatic organisms that showed a decrease in MCs content in several organs (liver and muscle) in a time-dependent manner (Williams et al., 1997; Smith and Haney, 2006). Mohamed and Hussein (2006) reported that tilapia fish can depurate and excrete MCs into the bile and surrounding water as a way to avoid toxicity from these hepatotoxins. Soares et al. (2004) found higher and earlier MCs accumulation in liver compared to muscle, in which the highest accumulation occurred in the depuration period in experiments performed in *Tilapia rendalli*. These findings could be explained on the basis of two facts: first, liver is the main organ of detoxification for fish and, second, since MCs mostly accumulate in fish liver (Chen et al., 2006; Zhao et al., 2006), their detoxification starts there. In fact, accumulation studies of MCs in Nile tilapia in liver, muscle, gall bladder and spleen, demonstrated that about 90% of MCs were accumulated in the liver (Zhao et al., 2006).

Histopathological changes have also been reported to be related with time, so that lesions caused by MCs can be recovered in fish. Thus, recovery of toxic histopathological effects caused by MCs has been reported by Ernst et al. (2006) to occur at 24–48 h in European whitefish (*C. lavaretus*). Li et al. (2005) observed recovery of hepatocytes in bighead carp 48 h post-injection. Malbrouck et al. (2004) found recovery of the liver structure and regeneration of hepatocytes 96 h post-injection in goldfish *Carasius auratus* as well as reconstruction of the tis-

sue structure 21 days post-injection (of 125 mg/kg body weight of MC-LR). In addition, time-dependent differences have been reported in the antioxidant response to oxidative stress induced by several chemicals in tilapia (Basha and Rani, 2003; Peixoto et al., 2006). Particularly MCs have been reported to produce a biphasic response in GSH levels in mice and crabs (Pinho et al., 2005; Ding et al., 2000). Therefore, the initial recuperation observed in the fish exposed to cyanobacterial cells after 72 h, mainly in LPO and protein oxidation in the liver, could also be appreciable in the rest of the organs afterwards, because a longer time may be required for the de novo synthesis of proteins, once MCs have been depurated. However, more studies are required to illustrate the relation between the toxic effects of MCs and the toxin concentration in fish tissues.

Acknowledgements

Lyophilized *M. aeruginosa* isolated strain culture was kindly supplied by Dr. Susana Franca and Dr. Paulo Pereira (Lisboa, Portugal). The authors wish to thank the CICYT (AGL2006-06523/ALI) for the financial support for this study.

References

- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.* 27, 673–679.
- Atli, G., Alptekin, O., Tükel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 218–224.
- Basha, P.S., Rani, A.U., 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 218–221.
- Beers, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133–140.
- Best, J.H., Eddy, F.B., Codd, G.A., 2001. Effects of purified microcystin-LR and cell extracts of *Microcystis* strains PCC 7813 and CYA 43 on cardiac function in brown trout (*Salmo trutta*) alevins. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 171–178.
- Bradford, 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, 248–254.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1995. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial toxin microcystin-LR and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout (*Salmo trutta* L.). *J. Fish Biol.* 46, 1042–1054.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475–5480.
- Cazenave, J., Bistoni, M.A., Pesce, S.F., Wunderlin, D.A., 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76, 1–12.
- Chen, T., Shen, P., Zhang, J., Hua, Z., 2005. Effects of microcystin-LR on patterns of iNOS and cytokine mRNA expression in macrophages *in vitro*. *Environ. Toxicol.* 20, 85–91.
- Chen, J., Xie, P., Zhang, D., Ke, Z., Yang, H., 2006. In situ studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxic *Microcystis* blooms. *Aquaculture* 261, 1026–1038.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. World Health Organization, E&FN Spon, London/Routledge, p. 416.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Shen, Y., Zhu, H.G., Ong, C.N., 1998. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Health Persp.* 106, 409–413.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, C.N., 2000. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. *Environ. Health Persp.* 108, 605–609.
- Ernst, B., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R., 2001. Presence of *Planktothrix* sp. and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee Germany and their impact on whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Environ. Toxicol.* 16, 483–488.
- Ernst, B., Hoeger, S.J., O'Brien, E., Dietrich, D.R., 2006. Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquat. Toxicol.* 79, 31–40.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonanal. *Methods Enzymol.* 186, 407–421.
- Fischer, W.J., Dietrich, D.R., 2000. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 73–81.
- Fischer, W.J., Altheimera, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 257–263.
- Gehring, M.M., 2004. Microcystin-LR and okadaic acid cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett.* 557, 1–8.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14.
- Huang, C.H., Chang, R.J., Huang, S.L., Chen, W., 2003. Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia. *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 134, 265–270.
- Jos, A., Pichardo, S., Prieto, A.I., Repetto, G., Vázquez, C.M., Moreno, I.M., Cameán, A.M., 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 72, 261–271.
- Kotak, B.G., Semalulu, S., Fritz, D.L., Prepas, E.E., Hrudey, S.E., Coppock, R.W., 1996. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol.* 34, 517–525.
- Lawrence, A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952–958.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shatiel, S., Stadman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicol.* 42, 85–89.
- Li, X., Chung, I., Kim, J., Lee, J., 2004. Sub-chronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol.* 44, 821–827.
- Li, L., Xie, P., Chen, J., 2005. In vivo studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.-injected with extracted microcystins. *Toxicol.* 46, 533–545.
- Liu, Y., Song, L., Li, X., Liu, T., 2002. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgurnus mizolepis* Gunther. *Toxicol.* 40, 395–399.
- MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A., 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264, 187–192.
- Magalhaes, V.F., Marinho, M.M., Domingos, P., Oliveira, A.C., Costa, S.M., Azevedo, L.O., Azevedo, S.M.F.O., 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicol.* 42, 289–295.

- Malbrouck, C., Trausch, G., Devos, P., Kestemont, P., 2004. Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity in fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Toxicol.* 43, 295–301.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocypre). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Mohamed, Z.A., Hussein, A.A., 2006. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: a laboratory study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63 (3), 424–429.
- Mohamed, Z.A., Carmichael, W.W., Hussein, A.A., 2003. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ. Toxicol.* 18, 137–141.
- Molina, R., Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Moyano, R., Monterde, J.G., Cameán, A., 2005. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed sub-chronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicol.* 46, 725–735.
- Moreno, I., Mate, A., Repetto, G., Vázquez, C.M., Cameán, A.M., 2003. Influence of Microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. *J. Physiol. Biochem.* 59 (4), 293–300.
- Moreno, I.M., Pereira, P., Franca, S., Cameán, A., 2004. Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana river (Southwest of Spain). *Biol. Res.* 37, 405–417.
- Moreno, I.M., Molina, R., Jos, A., Picó, Y., Cameán, A., 2005a. Determination of microcystins in fish by solvent extraction and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1080, 199–203.
- Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Gómez-Amores, L., Mate, A., Vázquez, C.M., Cameán, A.M., 2005b. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol.* 45, 395–402.
- Mourente, G., Díaz-Salvago, E., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture* 214, 343–361.
- Oruç, E., Üner, N., 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 127, 291–296.
- Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D., Fontainhas-Fernandes, A., 2006. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pest. Biochem. Physiol.* 85, 91–96.
- Peñaloza, R., Rojas, M., Vila, I., Zambrano, F., 1990. Toxicity of a soluble peptide from *Microcystis aeruginosa* to zooplankton and fish. *Freshwat. Biol.* 24, 133–240.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2001. Metabolism of microcystin-LR in aquatic organisms. In: Chorus, I. (Ed.), *Cyanotoxins*. Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Berlin, Germany, pp. 276–280.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527–533.
- Pinho, G.L.L., Rosa, M.C., Maciel, F.E., Bianchini, A., Yunes, J.S., Proenca, L.A.O., Monserrat, J.M., 2005. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotox. Environ. Saf.* 61, 353–360.
- Prieto, A.I., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I.M., Cameán, A.M., 2006. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquat. Toxicol.* 77, 314–321.
- Rabergh, C.M.I., Bylund, G., Eriksson, J.E., 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat. Toxicol.* 20, 131–146.
- Rodger, H.D., Turnbull, T., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout (*Salmo trutta* L.) in Loch Leven, Scotland. *J. Fish Dis.* 17, 177–181.
- Smith, J.L., Haney, J.F., 2006. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicol.* 48, 580–589.
- Soares, R.M., Magalhaes, V.F., Azevedo, S., 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 70, 1–10.
- Sun, Y., Yu, H., Zhang, J., Yin, Y., Shi, H., Wang, X., 2006. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere* 63, 1319–1327.
- Tencalla, F., Dietrich, D., 1996. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol.* 35, 583–595.
- Wilhelm, D., 1996. Fish antioxidant defenses. A comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1735–1742.
- Williams, D.E., Daw, S.C., Kent, M.L., Anderson, R.J., Craig, M., Holmes, C.F.B., 1997. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicol.* 35, 1617–1675.
- Xie, L., Yokoyama, A., Nakamura, K., Park, H., 2007. Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail *Sinotaia histrica* and three fishes in a temperate lake, the eutrophic Lake Suwa, Japan. *Toxicol.* 49, 646–652.
- Zhao, M., Xie, S., Zhu, X., Yang, Y., Gan, N., Song, L., 2006. Effect of dietary cyanobacteria on growth and accumulation of microcystins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 261, 960–966.
- Zimba, P.V., Khoo, L., Gaunt, P., Carmichael, W.W., Brittain, S., 2001. Confirmation of catfish mortality from microcystin toxins. *J. Fish Dis.* 24, 41–47.
- Zurawell, R.W., Chen, H., Burke, J.M., Prepas, E.E., 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of Microcystins in freshwater environments. *J. Toxicol. Environ. Health B* 8, 1–37.

1 Running head: Vitamin E protects MC-intoxicated fish

2

3 Corresponding Author:

4 Angeles Jos

5 Area of Toxicology. Faculty of Pharmacy. University of Seville

6 Profesor García González 2, 41004 Seville

7 Tel. +34 954556762

8 Fax +34 954 233765

9 e-mail: angelesjos@us.es

10

11 Total number of words: 6385

1

2

3 Title: Protective role of vitamin E on the microcystin induced oxidative
4 stress in Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*)

5

6 Ana I. Prieto[†], Ángeles Jos[†], Silvia Pichardo[†], Isabel Moreno[†], Ana
7 M. Cameán[†]

8

9 [†] Area of Toxicology. Faculty of Pharmacy. University of Seville.

10 Spain.

11

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

1

2

3 angelesjos@us.es

1 **Abstract**

2 Microcystins (MCs) induce oxidative stress in fish. This study
3 investigated the effect of vitamin E pre-treatment on MCs oxidative damage
4 in liver, kidney and gills of tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). Groups of fish
5 were fed vitamin E supplements (200 or 700 mg/kg diet) for seven days, or
6 received only commercial fish food, and then were exposed to a single oral
7 dose of cyanobacterial cells (120 µg/fish MC-LR) and were sacrificed in
8 24h. The potential benefits of vitamin E were evaluated based on lipid
9 peroxidation, protein oxidation, catalase (CAT), superoxide dismutase
10 (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and
11 GSH/GSSG levels. MCs induced a 1.6-fold increase in LPO values in liver,
12 whereas vitamin E pre-treated fish did not show any alteration on this
13 biomarker. Enzyme activities levels were also ameliorated by the
14 chemoprotectant whereas protein oxidation and GSH/GSSG did not show
15 any significant change. The highest vitamin E dose used showed to have
16 the greater protective effects, particularly on the biomarkers LPO and CAT
17 activity. The results show that vit E could have a potential utility as
18 preventive or therapeutic measure in MC-exposed fish.

19

20 **Keywords:** cyanobacteria, microcystin, tilapia fish, oxidative stress, vitamin

21 E

1

2 INTRODUCTION

3 Cyanobacteria comprise an assemblage of prokaryotic plantlike
4 organisms that often dominate phytoplankton communities in warm,
5 nutrient-enriched hard waters becoming their distribution ubiquitous [1]. A
6 potentially hazardous consequence of cyanobacterial blooms is the
7 production of different kind of toxins. Among cyanobacterial toxins, the
8 hepatotoxins and specially microcystins (MCs) are among the most
9 frequently observed and have been well studied [2].

10

11 Although MCs are known hepatotoxic compounds, in fish they have
12 been also reported to affect the kidney, gills, intestine, heart, etc. [3, 4].
13 These toxins are inhibitors of serine/threonin phosphatases, affecting
14 intracellular signalling, cell growth, and differentiation processes [5, 6]. In
15 the pathogenesis of MCs toxicity, oxidative stress play also a significant
16 role as many authors have already shown in different experimental models
17 [7, 8, 9] including fish [10, 11, 12, 13].

18

19 Cellular oxidative stress is established when the pro-oxidant forces
20 overwhelm the antioxidant defences. Physiological antioxidant protection
21 involves a variety of chemical systems, of endogenous and exogenous
22 origins, both water and fat-soluble. The endogenous components include
23 compounds such as NADH/NADPH, glutathione (GSH), protein sulphhydryl
24 (-SH) groups, uric acid and free radical scavenging enzymes such as

1 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase
2 (GPx) [14]. Exogenous dietary micronutrients such as vitamins E and C as
3 well as carotenoids also play important roles in the antioxidant defence
4 system. Additionally, more enzymes are needed for the good working of
5 this biochemical machinery such as glutathione reductase (GR), the
6 enzyme reducing oxidized glutathione (GSSG) to its reduced state (GSH),
7 or glucose-6-P-dehydrogenase that provides NADPH, etc.

8 These systems can prevent the formation of oxyradicals or intercept
9 oxidative propagation reactions promoted by the oxyradicals once formed.
10 Moreover, they protect cells against DNA strand breaks, protein oxidation
11 and lipid peroxidation (LPO). The latter may result in loss of integrity of lipid
12 membranes and generation of toxic aldehydes [14].

13

14 Vitamin E (vit E) is a generic descriptor for all molecules that
15 possesses the biological activity of α -tocopherol. Natural forms of vitamin E
16 are all d-stereoisomers and consist of a substituted aromatic ring and a long
17 isoprenoid side chain. There are eight naturally occurring compounds with
18 vit E activity, being α -tocopherol the one with the highest biopotency. This
19 is a lipid-soluble antioxidant that can reduce lipid peroxides, thereby
20 protecting biological membranes from damage induced by free radicals
21 [15]. Tocher et al. [16] studied the effects of dietary vit E on antioxidant
22 defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut
23 (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.), and
24 observed that a decreased dietary vit E led to a generally higher activities

1 of the liver antioxidant enzymes and higher levels of lipid peroxides. Also
2 Tocher et al. [17] in these fish species found that vit E reduced the liver
3 antioxidant defence enzyme activities previously increased by feeding
4 peroxidised oil. Similar results were found by Huang and Huang [18] on
5 juvenile hybrid tilapia fish subjected to the same oxidative insult, with a
6 decrease in the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)
7 and an increase of the tissue vitamin E and liver glutathione level when
8 dietary vit E increased.

9

10 To the extent of our knowledge, the protective role of vitamin E
11 against the oxidative stress induced by MC in fish has not been previously
12 investigated. In mice, different authors have approached this issue [19, 20,
13 21, 22]. In aquatic organisms, in contrast, only Pinho et al. [23] found that
14 the pre-treatment with vitamin E modulated the antioxidant responses after
15 MCs exposure in gills of an estuarine crab species, *Chasmagnathus*
16 *granulatus*.

17

18 In view of these reports, this study was undertaken to determine the
19 effects of a pre-treatment with two different doses of Trolox, a commercial
20 name for a water soluble vitamin E analog, on the oxidative stress induced
21 by MCs by oral route in tilapia fish. This was done by analysing the
22 responses of different enzymatic activities such as CAT, SOD, GPx and GR
23 as well as lipid peroxidation in liver, kidney and gills. Moreover, GSH/GSSG

1 ratio and protein oxidation by means of protein carbonyl content were
2 determined in liver.

3

4

5 **MATERIALS AND METHODS**

6 *Chemicals*

7 Vitamine E, as Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic
8 acid, was obtained from Aldrich. Microcystin standards were supplied by
9 Cyanobiotec (Germany) with a purity of 95-99%. Other chemicals used
10 were purchased in Merck and Sigma.

11

12 *Experimental setup and acclimation of fish*

13 48 male *Oreochromis niloticus* sp. (Nile tilapia, Perciformes:
14 *Cichlidae*), average weight 50 ± 8 g, were obtained from a fish hatchery in
15 Córdoba. Tilapia is one of the major farmed fish species on the global scale
16 [18] and also has been extensively employed to study the antioxidant
17 response to many toxic substances. Fish were transferred to the laboratory
18 where they were held in six aquaria (8 individuals/aquarium) with 96 L of
19 fresh water. Exposure to chlorine was minimized by filling the tanks at least
20 3 days before the fish were introduced. The aquariums were also set up
21 with continuous system of water filtration and aeration (Eheim Liberty 150
22 and Bio-Espumador cartridges (Bio-Espumador) and the temperature
23 varied between 19 and 23°C. Dissolved oxygen values were maintained
24 between 6.5 and 7.5 mg/L. Mean values for additional parameters of water

1 quality were: pH 7.6 ± 0.3 , conductivity $287 \mu\text{S}/\text{cm}$, Ca^{2+} 0.60 mM and Mg^{2+}
2 0.3 mM . Fish were fed with commercial fish food and were acclimatized for
3 15 days before the beginning of the experiments.

4

5 *Collection of Microcystis aeruginosa strain culture and determination of*
6 *cyanobacterial toxins*

7 Lyophilized *M. aeruginosa* isolated strain culture was kindly supplied
8 by Dra Susana Franca (Lisboa, Portugal). MCs contained were extracted
9 from dried cell material using the method of Moreno et al. [24]. The
10 lyophilized cells (50 mg) were extracted three times with 10 mL 0.1 M
11 acetic acid and 20 mL of a mixture of methanol:chloroform (1:1 v/v). The
12 cell suspension was sonicated in an ultra-sound bath for 15 minutes, stirred
13 for 30 minutes at room temperature, and then centrifuged at 4500 g for 15
14 minutes. The upper aqueous phases were combined and concentrated in a
15 rotary evaporator. The residue was resuspended in 0.5 mL methanol for
16 chromatographic separation.

17 The LC system used to analyse the toxin contents was a Varian
18 9012 equipped with a Varian ProStar 330 Diode Array Detector.
19 Chromatographic data were processed with a Star Chromatography
20 Workstation (Varian Technologies). Chromatographic separation of MCs
21 was performed according to Moreno et al. [24] on a 250 mm x 4.6 mm i.d.,
22 5 μm , LiChrosphere C18 column purchased from Merck (Darmstadt,
23 Germany).

1 Standard solutions of microcystins MC-LR, MC-YR and MC-RR
2 were prepared in methanol (500 µg/mL) and diluted as required with
3 methanol for use as working solutions (0.5-5.0 mg/L of each toxin). Only
4 MC-LR was identified in the cyanobacterial cell extracts analysed and the
5 peak area of the MC-LR standard solution was applied for quantification.
6 The concentrations of MCs obtained from lyophilised cells were 1350 µg/g
7 MC-LR.

8

9 *Exposure*

10 Fish in aquaria 1 and 2 (n=8) were fed daily with commercial fish
11 food for 7 days (Table 1). Fish from aquarium 1 were not exposed to MCs
12 and were used as controls. The 7th day, fish in aquarium 2 received a single
13 dose of cyanobacterial cells dosing approximately 120 µg MC-LR/fish
14 (determined from HPLC analysis) in the diet, with the commercial fish food.
15 After the toxin administration both groups of fish were sacrificed in 24 h.

16

17 Tilapia fish in aquaria 3 and 4 (n=8) were fed daily with commercial
18 fish food plus 200 mg vit E/kg diet, equivalent to 0.06 mg vit E/fish/day for 7
19 days. The last day, fish in aquarium 4 were also exposed to the same dose
20 of cyanobacterial cells (120 µg MC-LR/fish) in the diet, whereas fish in
21 aquarium 3 did not receive the toxin and were used as controls. 24 hours
22 after the toxin application fish were sacrificed.

1 Fish in aquaria 5 and 6 (n=8) were subjected to the same treatment
2 as previously described, but using a higher dose of vit E, 700 mg vit E/kg
3 diet, equivalent to 0.21 mg vit E/fish/day.

4 Both doses of vit E were selected in based to a report by Huang et
5 al. [25], who studied how a dietary supplementation of 0. 50, 100, 200, 450
6 and 700 mg vit E/kg diet for 14 weeks, affected ascorbate induced iron-
7 catalyzed tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia. They observed that in
8 liver, TBARS values appeared to decrease with increasing vit E up to 200
9 mg/kg diet. Moreover, no toxic effects due to the vit E supplementation
10 were observed.

11

12 Fish were fed by manually crushing mixture of the different
13 components (fish food, toxic cyanobacterial cells, and vit E, depending on
14 the treatment) in a mortar followed by sonication. This procedure resulted in
15 small sticky pellets and was designed to replicate the type of exposure that
16 may occur when a bloom of cyanobacteria undergoes lysis under field
17 conditions releasing its MCs contents. The pellets were placed in the tank
18 and drifted to the bottom for the fish to take. It was ensured that all the
19 pellets were eaten within an hour. The amount of commercial fish food
20 administered per fish was 0.3 g/day.

21

22 *Preparation of postmitochondrial supernatant (PMS)*

23 At the end of the experiment, the fish were anaesthetized by
24 immersion in 50 mg/L tricaine methane sulphonate (MS-222) solution for 5-

1 10 min before they were killed by transection of the spinal cord. All
2 experimental groups of fish were anaesthetized in the same manner what
3 excludes a specific effect of the product in the stress-related research. The
4 liver, kidney and gills were removed, weighed, rinsed with ice-cold saline
5 and kept at -85°C until analysis. The tissues were homogenized in chilled
6 TRIS buffer (100 mM, pH 7.8; 1:10 w/v) using an Ultra-Turrax® tissue
7 homogenizer. The homogenates were centrifuged at 10500 g for 20 min at
8 4°C to obtain the post-mitochondrial supernatant (P MS) for various
9 biochemical analyses.

10

11 *Lipid peroxidation*

12 Lipid peroxidation products were quantified by the thiobarbituric acid
13 (TBA) method [26]. End lipid peroxidation products react with TBA reagent
14 under acidic conditions to generate a pink coloured product. Briefly, the
15 homogenized tissue (0.5 mL), previously treated with 25 µL of
16 butylhydroxytoluene 1% mass/vol in glacial acetic, was mixed with 0.2 mL
17 of sodium laurylsulphate (8%), 1 mL of acetic acid (20% vol/vol) and 1 mL
18 of 0.8% thiobarbituric acid. This mixture was then heated at 95°C for 30
19 min. The resulting chromogen was extracted with 3 mL of n-butyl alcohol
20 and, after centrifugation (1500g for 10 min), the absorbance of the organic
21 phase was determined at 532 nm. 1,1,3,3-tetramethoxypropan was used as
22 a standard. Values were presented as nmol TBARS /g tissue.

23

24 *Protein carbonyl content*

1 We followed the method described by Levine et al. [27]. Briefly, two
2 test tubes of 1.0 mL containing 30 and 60 μ L homogenized sample
3 respectively (\approx 10-20 mg protein) were taken. 0.5 mL of fresh 10 mM 2,4-
4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) prepared in 2 M HCl was added to the
5 tubes, and the contents were mixed thoroughly and incubated at room
6 temperature for 1 hour. The tubes were shaken intermittently every 15
7 minutes. Then 0.5 mL of 20% TCA (w/v) was added to both tubes that were
8 centrifuged at 11,000g for 3 min to obtain the protein pellet. The
9 supernatant was carefully aspirated and discarded. Finally the precipitates
10 were washed three times with 0.5 mL of ethanol: ethyl acetate (1:1, v/v) to
11 remove unreacted DNPH and lipid remnants. The final protein pellet was
12 dissolved in 0.6 mL of 6 M guanidine hydrochloride and incubated overnight
13 at room temperature. The insoluble materials were removed by
14 centrifugation and the supernatant were measured spectrophotometrically
15 at 366 nm. Results are expressed as nmol carbonyl/mg protein, using the
16 extinction coefficient $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

17

18 *Antioxidant enzymes*

19 The catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity assay, consisting in the
20 spectrophotometric measurement of H_2O_2 breakdown at 240 nm was
21 assayed following the method of Beers and Sizer [28]. The assay mixture
22 contained 0.3 mL phosphate buffer saline (PBS), 2.07 mL H_2O , 30 μ L
23 homogenized tissue and 0.6 mL H_2O_2 10 mM. The final concentrations in

1 the cuvettes were 50 mM potassium phosphate (pH 7), 20 mM H₂O₂ and
2 homogenized tissue (30 μL).

3

4 Total superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was
5 determined by the method of McCord and Fridovich [29]. This assay
6 depends on SOD activity to inhibit cytochrome *c* reduction mediated by the
7 O₂^{•-} generated from the xanthine oxidase system. The assay mixture
8 contained 0.51 mL potassium phosphate-EDTA buffer (pH 7.8), 0.1 mL
9 xanthine 50 μM, 0.1 mL cytochrome C 500 μM, 50 μL homogenised tissue
10 and H₂O. The reaction was initiated by the addition of 10 μL xanthine
11 oxidase. SOD activity was monitored spectrophotometrically at 505 nm.
12 One unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme that gave 50%
13 inhibition of the control rate of cytochrome *c* reduction.

14

15 Glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) activity was assayed by
16 following the rate of NADPH oxidation at 340 nm by the coupled reaction
17 with glutathione reductase. The assay mixture contained 600 μL buffer with
18 50 mM potassium phosphate + 1 mM EDTA + 1 mM NaN₃, (pH 7.5); 100μL
19 0.2 mM reduced glutathione (GSH), 100μL 0.1 mM NADPH, 8μL
20 glutathione reductase and homogenized tissue (20 μL). After 5 min
21 preincubation (20–25 °C), the reaction was initiated by the addition of 100
22 μL 0.25 mM H₂O₂. The specific activity was determined using the extinction
23 coefficient of 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹ [30].

24

1 Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activity was determined
2 spectrophotometrically by measuring NADPH oxidation at 340 nm [31]. The
3 reaction mixture contained 600 μ L buffer 0.1 M potassium phosphate + 0.5
4 mM EDTA + 0.1 mM KCl (pH 7.5), 100 μ L 0.1 mM NADPH, 100 μ L H₂O,
5 and 100 μ L homogenized tissue. After 5 min of preincubation (37°C), the
6 reaction was initiated by addition of 100 μ L 1 mM GSSG. All enzymatic
7 activities are expressed in U or mU/mg prot.,

8

9 *GSH/GSSG levels*

10 GSH/GSSG ratio was determined using a commercial kit (Bioxytech
11 GSH/GSSH-412, Oxis Research).

12

13 *Protein estimation*

14 Protein contents in the samples were estimated by the method of
15 Bradford [32] using bovine γ -globuline as standard.

16

17 *Statistical analysis*

18 All results were subjected to one-way analysis of variance
19 (ANOVA), and represent means \pm SE of eight animals per group.
20 Differences in mean values between groups were assessed by the Tukey's
21 test and were considered statistically significant at P<0.05 level.

22

23

24 **RESULTS**

1 *Effects on lipid peroxidation*

2 The liver was the most affected organ, showing a significant 1.6-fold
3 induction of lipid peroxidation in fish exposed to cyanobacterial cells and
4 sacrificed in 24h. Both vit E treatments resulted in an effective protection as
5 results show no significant increase in TBARS levels induced by MCs on vit
6 E pre-treated fish (Fig. 1) in comparison to their respective controls, with
7 values significantly lower in fish pre-treated with 200 mg vit E/kg diet (group
8 4) in comparison to not vit E pre-treated fish (group 2). A similar pattern
9 was observed in the kidney, with a reduction of TBARS levels in a vit E
10 dose dependent manner and in comparison to not pre-treated fish. Gills did
11 not show any significant change in comparison to controls, although LPO
12 values significantly decreased in fish pre-treated with the lowest vit E dose
13 used.

14

15 *Effects on protein oxidation*

16 The results of protein carbonyl contents (nmol carbonyl/mg protein)
17 in the liver of the exposed fish are shown in Table 2. There was a
18 significant reduction on the protein oxidation level of fish intoxicated and
19 pre-treated with 700 mg vit E /kg diet (group 6) in comparison to fish pre-
20 treated with 200 mg/kg (group 4) and fish that did not received the
21 chemoprotectant (group 2).

22

23 *Effects on antioxidant enzymes*

1 CAT activity (Fig. 2) increased in liver of fish exposed only to MCs
2 (1.5-fold) and in a lesser extent in fish pre-treated with 200 mg vit E/kg diet
3 (1.4-fold), whereas fish pre-treated with 700 mg/kg did not show significant
4 results in comparison to their respective controls. Kidney showed a
5 significant decrease in CAT activity in fish exposed only to MCs (1.2-fold), a
6 significant increase in fish pre-treated with the lowest vit E dose (1.9-fold)
7 and no change in fish treated with the highest vit E dose in comparison to
8 respective controls. A significant increase in CAT activity levels was
9 observed in MC-intoxicated fish pre-treated with 200 mg vit E/kg diet in
10 comparison to fish not pre-treated, as well as in comparison to fish pre-
11 treated with 700 mg vit E/kg diet (1.8-fold in both cases). CAT activity in
12 gills only increased respect to controls in fish that did not receive the
13 chemoprotectant. These values decreased with the vit E pre-treatment with
14 the highest vit E dose used (group 6) resulting in a significant reduction
15 respect to not pre-treated fish (group 2).

16

17 SOD activity experienced a significant 2.1-fold increase in fish not
18 pre-treated with the chemoprotectant and showed no significant changes
19 when exposed to both doses of vit E. A similar protective trend was
20 observed in the kidney, but a significant decrease (1.2-fold) in the enzyme
21 activity is observed (group 2). A reduction in the enzyme activity was
22 experienced also in gills of fish only exposed to MCs, and no change in fish
23 pre-treated with vit E. The administration of the chemoprotectant (groups 4

1 and 6) resulted in increased SOD values in comparison to fish that did not
2 receive it (group 2) (Fig. 3).

3

4 GPx activity in liver augmented respect to controls in all cases,
5 being these results only significant (1.5-fold increase) in fish not pre-treated
6 with the vitamin. Kidney experienced a significant reduction in this
7 enzymatic activity in all treatments. And gills showed a decrease in fish not
8 pre-treated with the chemoprotectant and an increase in those pre-treated
9 with both vit E doses used (Fig. 4).

10

11 GR activity showed no alterations in liver and gills in any of the
12 treatments. However, kidney experienced a significant 2-fold decrease in
13 fish exposed only to MCs, and no changes in fish pre-treated with the
14 vitamin, resulting in a significant difference (1.5-fold) in GR activity levels
15 between pre-treated (groups 4 and 6) and not pretreated fish (group 2) (Fig.
16 5).

17

18 *Effects on GSH/GSSG levels*

19 No significant changes were observed on the GSH/GSSG ratio in
20 the liver of fish subjected to any of the treatments (Table 2).

21

22

23 **DISCUSSION**

24 Oxidative stress is one of the mechanisms implicated in MCs pathogenicity
25 in fish [10, 11, 12, 13, 33]. Li et al. [10] showed that MCs increase the

1 reactive oxidative species (ROS) generation and produce subsequent
2 changes in the enzymatic and not enzymatic antioxidant defence in
3 hepatocytes of common carp *Cyprinus carpio*. Moreover, ROS induce loss
4 of mitochondrial membrane potential, mitochondria permeability, transition
5 and activation of calpain, and Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase
6 all of which are step towards apoptosis [7, 34]. Formation of superoxide
7 radical was followed first by altered cytoskeleton structures, then by LDH
8 leakage. Lysosomes are particularly prone to damage by hydrogen
9 peroxide and this damage has to be considered an early trigger for the
10 degeneration of cells upon exposure to MCYST-LR [35].

11
12 Fish response to this oxidative insult varies from depletion of the
13 enzyme proteins to an increase in their activity, depending on the MCs
14 dose, exposure route, fish species, etc. In this sense, Jos et al. [11] showed
15 that the daily oral exposure to cyanobacterial material containing 60g MC-
16 LR/fish/day for 14 and 21 days resulted in an adaptative response in tilapia
17 fish, with increased activities of the antioxidant enzymes and higher LPO
18 levels. However, the oral administration of a single dose equivalent to 120g
19 MC-LR/fish produces a decrease in the enzymatic activities in tilapia fish
20 sacrificed 24h post exposure [33], as well as increased LPO values. In the
21 present study, the same dose of toxin has produced similar effects on LPO,
22 a general decrease in the activity of the enzymes studied in kidney and
23 gills, but an increase has been observed in liver. These results may be
24 explained because the liver contains the largest defence system what
25 prevents this organ from suffering more intense damages.

1
2 Vitamin E is an important antioxidant involved in the protection of
3 membranes from oxidative damage. Dietary vit E requirement of tilapia is
4 dependent on several factors such as the dietary lipid level, degree of
5 unsaturation of dietary lipid source, the oxidative status of the dietary lipid,
6 the presence of other antioxidants, etc. [25, 36]. Both doses of vit E have
7 shown to have a protective effect on LPO values in all the organs studied.
8 Vit E stops the chain reaction mechanism of lipid peroxidation, presumably
9 via its ability to quench free radicals. Its anti-oxidant activity is based on the
10 ease with which the hydrogen on the hydroxyl group of the chroman ring
11 can be donated to neutralize a lipid peroxy radical (LOO[·]), creating a more
12 stable tocopheroxyl radical [37]. This can be reduced (restored) to
13 tocopherol directly by ubiquinol or vitamin C, and then by glutathione or
14 lipoic acid (via vitamin C). The positive influence of vit E on this biomarker
15 has also been reported by Gehringer et al. [20], who observed reduced
16 LPO values in mice intraperitoneally exposed to MC-LR extracts when they
17 were fed vit E supplements.

18
19 The protective role of vit E on protein oxidation in liver has been not
20 so clear. Reports about the influence of this chemoprotectant on this
21 parameter in fish are scarce. Passi et al. [38], suggest that in freshwater
22 and marine fish, lipid peroxidation and accumulation of oxidized proteins
23 during aging are likely linked with an age-dependent decline of vitamin C
24 and lipophilic antioxidants (such as vit E) contents in muscle tissue. In

1 mammalian models, however, the benefits of vit E supplementation on this
2 parameter are better known [39], although no studies have been performed
3 considering a MC exposure.

4

5 Vit E ameliorate CAT activity levels in all the organs studied
6 showing a dose-dependent influence mainly in the liver and the kidney.
7 With the lower dose there is not enzyme destruction but a defensive
8 response in the kidney, whereas in the liver this enzyme activity increased
9 in a lesser extent. These results agree with Pinho et al., [23] who have also
10 reported that the pre-treatment of the estuarine crab (*Chasmagnathus*
11 *granulatus*) with 600 mg/kg vit E, was effective in reducing catalase activity
12 in posterior gills.

13

14 Vit E has also shown to protect SOD activity, mainly in the liver,
15 GPx and GR activities. The beneficial effects of this chemoprotectant on
16 CAT, SOD, and GPx activities could be explained due to its role as free
17 radical scavenger. Venkasteswara et al. [40] observed that nickel and
18 chromium treatment to mice resulted in a significant decline of SOD activity.
19 In contrast, a supplementation with 2 mg/kg vit E with $\text{NiCl}_2 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
20 exerted no significant alterations in the liver antioxidant systems as
21 compared to control, thus indicating its ameliorative role.

22

23 Regarding to the influence of vit E pre-treatment on the GSH/GSSG
24 ratio, Pinho et al. [23] found an increase of nonproteic sulfhydryls (NP-SH)

1 concentration in gills of crabs preexposed to vit E and not exposed to MC in
2 comparison to crabs from the control group not pretreated with the vitamin
3 and sacrificed two days after the exposure. However, in fish sacrificed after
4 7 days no changes were observed. In the present study, the lack of
5 changes on the GSH/GSSG levels agrees with the results obtained in the
6 GR activity in liver, where no alterations were observed. GR is an important
7 enzyme that maintains the GSH/GSSG homeostasis under stress
8 conditions [14] regenerating GSH through the reduction of GSSG into GSH.
9 Moreover, the levels of GSH could be related with GPx activity, because
10 this enzyme catalyzes the reduction of hydrogen peroxide into water or
11 organic peroxides to their corresponding stable alcohols by oxidizing the
12 GSH into its oxidized form GSSG. The protective effect of both doses of vit
13 E on GPx activity could explain the lack of significant changes found in
14 GSH/GSSG levels.

15

16 Other authors have shown the influence of a vit E pre-treatment on
17 a MC induced oxidative damage on different biomarkers. Pinho et al. [23]
18 found increased GST activity in crabs exposed to MCs, values that were
19 reduced with vit E pre-treatment. However, Gehringer et al. [20] observed
20 decreased GST levels in MC intoxicated mice, and a significant reduction of
21 this toxin-induced decrease when mice received vit E supplementation.
22 Additionally, they reported a protection of the liver damage, reflected in a
23 significant reduction in the levels of serum alanine transaminase, found
24 also by Al-Jassabi and Khalil [21], as well as an increase in the time to

1 death. This agrees with the results of Hermansky et al. [19], who found that
2 vit E produced a significant protection from lethality in MC exposed mice.
3 Moreover, Weng et al. [22] have shown that vit E significantly reduces the
4 generation of ROS and effectively inhibits the MC-LR-induced hepatocyte
5 apoptosis and liver injury in mice. MC induced oxidative stress not only
6 affects proteins and lipids but also produces DNA damage. Vit E has shown
7 to inhibit the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG), a
8 biomarker relevant to carcinogenesis, in a concentration-dependent
9 manner in liver of MC exposed mice [21]. As far as we know this is the first
10 study that investigates the effects of a supplementation of vit E on oxidative
11 biomarkers such as SOD, GPx, GR activities and protein oxidation after MC
12 exposure.

13

14 The scientific literature shows that most of the studies dealing with
15 the protective effects of vit E on MC induced toxicity are performed in
16 mammalian models. However, fish and other aquatic organisms are
17 naturally exposed to MC, in their own environments or in aquaculture
18 facilities, and it would be of big importance to further investigate in this area
19 to establish the potential utility of chemoprotectants such as vit E as
20 preventive or therapeutic measures in case of fish that live or are cultivated
21 in waters chronically contaminated with MC.

22

23 In conclusion, vit E pre-treatment ameliorates the levels of oxidative
24 stress biomarkers altered by the oral exposure to cyanobacterial cells in

1 Tilapia fish. The highest protective effects are produced with 700 mg vit
2 E/kg diet as results in LPO levels and CAT activity show. This study
3 advances new insights on the influence of vit E in some biochemical
4 parameters in MC exposed tilapia. A practical application of the present
5 data could be the possible preventive or therapeutic use of vit E against
6 MC-induced toxicity in fish.

7

8

9 **Acknowledgements**

10 Lyophilized *M. aeruginosa* isolated strain culture was kindly supplied
11 by Dr. Susana Franca and Dr. Paulo Pereira (Lisboa, Portugal). The
12 authors wish to thank the CICYT (AGL2006-06523/ALI) for the financial
13 support for this study.

1

2 **References**

3 1. Chorus I, Bartram J. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to
4 their Public Health Consequences, Monitoring and Management, World
5 Health Organization, London. E&FN Spon, Routledge, pp. 416.

6

7 2. Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas EE. 2005. Hepatotoxic
8 cyanobacteria: a review of the biological importance of Microcystins in
9 freshwater environments. *J Toxicol Environ Health B* 8:1-37.

10

11 3. Molina R, Moreno I, Pichardo S, Jos A, Moyano R, Monterde JG,
12 Cameán A. 2005. Acid and alkaline phosphatases activities and
13 pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed
14 subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under
15 laboratory conditions. *Toxicon* 46:725-735.

16

17 4. Malbrouck C, Kestemont P. 2006. Effects of microcystins on fish. *Environ*
18 *Toxicol Chem* 25:72-86.

19

20 5. Runnegar M, Berndt N, Kong S, Lee EYC, Zhang L. 1995. In vivo and in
21 vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem*
22 *Biophys Res Commun* 216:162-169.

23

- 1 6. Toivola DM, Eriksson JE. 1999. Toxins affecting cell signalling and
2 alteration of cytoskeletal structure. *Toxicol In Vitro* 13:521-530.
3
- 4 7. Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Ohng CN. 1998. Studies on oxidative
5 damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat
6 hepatocytes. *Environ Res* 78:12-18.
7
- 8 8. Moreno I, Pichardo S, Jos A, Gómez-Amores L, Mate A, Vazquez CM,
9 Cameán AM. 2005. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in
10 liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered
11 intraperitoneally. *Toxicon* 45:395-402.
12
- 13 9. Wiegand C, Pflugmacher S. 2005. Ecotoxicological effects of selected
14 cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl*
15 *Pharmacol* 203:201-218.
16
- 17 10. Li X, Liu Y, Song L, Liu J, 2003. Responses of antioxidant systems in
18 the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of
19 microcystin -LR. *Toxicon* 42:85-89.
20
- 21 11. Jos A, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vázquez CM, Moreno IM,
22 Cameán AM. 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins
23 induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under
24 laboratory conditions. *Aquat Toxicol* 72:261-271.

- 1
- 2 12. Cazenave J, Bistoni MA, Pesce SF, Wunderlin DA. 2006. Differential
3 detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras*
4 *paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat Toxicol* 76:1-
5 12.
- 6
- 7 13. Prieto AI, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Cameán A M. 2006.
8 Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in
9 intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquat Toxicol*
10 77:314-321.
- 11
- 12 14. Winston GW, Di Giulio RT. 1991. Prooxidant and antioxidant
13 mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 19:137-161.
- 14
- 15 15. Hung S, Tu C, Wang W. 2007. In vitro effects of singular or combined
16 anti-oxidative vitamins and/or minerals on tilapia (*Oreochromis hybrids*)
17 peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-
18 derived macrophages. *Fish Shellfish Immun* 23:1-15.
- 19
- 20 16. Tocher, D.R., Mourente, G., Van der Eecken, A., Evjemo, J.O., Díaz,
21 E., Bell, J.G., Geurden, I., Lavens, P., Olsen, Y., 2002. Effects of dietary
22 vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot
23 (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and
24 sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult Nutr* 8:195-207.

- 1
- 2 17. Tocher DR, Mourente G, Van der Eecken A, Evjemo JO, Díaz E, Wille
3 M, Bell JG, Olsen Y. 2003. Comparative study of antioxidant defence
4 mechanisms in marine fish fed variable levels of oxidised oil and vitamin
5 E. *Aquacult Int* 11:195-216.
- 6
- 7 18. Huang C, Huang S. 2004. Effect of dietary vitamin E on growth, tissue
8 lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia,
9 *Oreochromis niloticus* x *O. aureaus*, fed oxidized oil. *Aquaculture*
10 237:381-389.
- 11
- 12 19. Hermansky S J, Stohs S J, Eldeen Z M, Roche V F, Mereish K A. 1991.
13 Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR
14 hepatotoxicity in mice. *J Appl Toxicol* 11:65-73.
- 15
- 16 20. Gehringer MM, Govender S, Shah M, Downing TG. 2003. An
17 investigation of the role of vitamin E in the protection of mice against
18 microcystin toxicity. *Environ Toxicol* 18:142-148.
- 19
- 20 21. Al-Jassabi S, Khalil AM. 2006. Microcystin-induced 8-
21 hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by melatonin, vitamin
22 C and vitamin E in mice. *Biochemistry* 71:1115-1119.
- 23

- 1 22. Weng D, Yinna-Wei YL, Liu Y, Shen P. 2007. The role of ROS in
2 microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice.
3 *Toxicology*, 232:15-23.
4
- 5 23. Pinho GLL, Moura da Rosa C, Maciel FE, Bianchini A, Yunes JS,
6 Proença LAO, Monserrat JM. 2005. Antioxidant responses after
7 microcystin exposure in gills of an estuarine crab species pre-treated
8 with vitamin E. *Ecotox Environ Safety* 61:361-365.
9
- 10 24. Moreno IM, Pereira P, Franca S, Cameán A. 2004. Toxic cyanobacteria
11 strains isolated from blooms in the Guadiana river (Southwest of Spain).
12 *Biol Res* 37:405-417.
13
- 14 25. Huang CH, Chang RJ, Huang SL, Chen W. 2003. Dietary vitamin E
15 supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia,
16 *Oreochromis niloticus x O. aureus*. *Comp Biochem Physiol B* 134: 265-
17 270.
18
- 19 26. Esterbauer H, Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid
20 peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonetal. *Method*
21 *Enzymol* 186: 407-421.
22

- 1 27. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn
2 BW, Shatiel S, Stadman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content
3 in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478.
4
- 5 28. Beers RF, Sizer IW. 1952. A spectrophotometric method for measuring
6 the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J Biol Chem* 195:133-
7 140.
8
- 9 29. McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic
10 function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055.
11
- 12 30. Lawrence, A., Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in
13 selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 71, 952-
14 958.
15
- 16 31. Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the
17 flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250:5475-
18 5480.
19
- 20 32. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of
21 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye
22 binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
23

- 1 33. Prieto AI, Pichardo S, Jos A, Moreno IM, Cameán AM. 2007. Time-
2 dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic
3 cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis*
4 *niloticus*) under laboratory conditions, *Aquat Toxicol* 84:337-345.
5
- 6 34. Ding WX, Shen HM, Ohng CN. 2002. Calpain activation after
7 mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in
8 rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291:321-331.
9
- 10 35. Boaru A, Dragos N, Schirmer K. 2006. Microcystin-LR induced cellular
11 effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines:
12 A comparative study. *Toxicology* 218:134-148.
13
- 14 36. Shiau S, Lin Y. 2006. Vitamin requirements of tilapia. A review. In:
15 Cruz, L.E., Ricque, D., Tapia, M., Nieto, M.G., Villareal, D., Puello, A.,
16 García, A. (Eds.), *Avances en nutrición acuícola VIII*. VIII Simposium
17 internacional de nutrición acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad
18 Autónoma de Nuevo León. Monterrey. México. pp 129-138.
19
- 20 37. Kelly SA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo K H, Levin ED. 1998.
21 Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging
22 piscine model systems. *Environ Health Perspec.* 106:375-384.
23

- 1 38. Passi S, Ricci R, Cataudella S, Ferrante I, De Simone F, Rastrelli L.
2 2004. Fatty Acid Pattern, Oxidation Product Development, and
3 Antioxidant Loss in Muscle Tissue of Rainbow Trout and *Dicentrarchus*
4 *labrax* during Growth. *J Agric Food Chem* 52:2587-2592.
5
- 6 39. Gulec M, Gurel A, Armutcu F. 2006. Vitamin E protects against
7 oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of
8 rats. *Mol Cell Biochem* 290:61-67.
9
- 10 40. Venkasteswara M, Sudhir S, Lalchand S. 2006. Vitamin-E
11 supplementation ameliorates chromium-and/or nickel induced oxidative
12 stress in vivo. *J Health Sci* 52:142-147.

1 **Figure captions**

2 Fig 1. Lipid peroxidation values in (a) liver (b) kidney and (c) gills of control
3 fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 120.0
4 µg/fish) and two different levels of vit E supplementation (200 and 700 mg
5 vit E/kg diet) or without it. The values are expressed as mean ± SE (n=8).
6 LPO values are expressed as nmol TBARS/g tissue. The significance
7 levels observed are **P<0.01 in comparison to respective control group
8 values and ## P< 0.01 compared to fish from group 2.

9

10 Fig 2. Catalase activity in (a) liver (b) kidney and (c) gills of control fish and
11 fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 120.0 µg/fish)
12 and two different levels of vit E supplementation (200 and 700 mg vit E/kg
13 diet) or without it. The values are expressed as mean ± SE (n=8). CAT
14 activity is expressed as mU/mg protein. The significance levels observed
15 are ** P<0.01, *** P<0.001 in comparison to respective control group
16 values; # P<0.05 and ### P< 0.001 compared to fish from group 2; and ++
17 P< 0.01, +++ P< 0.001 when fish from groups 4 and 6 are compared.

18

19 Fig 3. Superoxide dismutase activity in (a) liver (b) kidney and (c) gills of
20 control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish
21 = 120.0 µg/fish) and two different levels of vit E supplementation (200 and
22 700 mg vit E/kg diet) or without it. The values are expressed as mean ± SE
23 (n=8). SOD activity is expressed as U/mg protein. The significance levels

1 observed are *** $P < 0.001$ in comparison to respective control group
2 values; and ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ compared to fish from group 2.

3

4 Fig 4. Glutathione peroxidase activity in (a) liver (b) kidney and (c) gills of
5 control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish
6 = 120.0 $\mu\text{g}/\text{fish}$) and two different levels of vit E supplementation (200 and
7 700 mg vit E/kg diet) or without it. The values are expressed as mean \pm SE
8 (n=8). GPx activity is expressed as mU/mg protein. The significance levels
9 observed are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ in comparison to
10 respective control group values; ### $P < 0.001$ compared to fish from group
11 2; and +++ $P < 0.001$ when fish from groups 4 and 6 are compared.

12

13 Fig 5. Glutathione reductase activity in (a) liver (b) kidney and (c) gills of
14 control fish and fish exposed to cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish
15 = 120.0 $\mu\text{g}/\text{fish}$) and two different levels of vit E supplementation (200 and
16 700 mg vit E/kg diet) or without it. The values are expressed as mean \pm SE
17 (n=8). GR activity is expressed as mU/mg protein. The significance levels
18 observed are *** $P < 0.001$ in comparison to respective control group
19 values; and ### $P < 0.001$ compared to fish from group 2.

20

21

1 **Table captions**

2

3 Table 1. Groups of fish receiving different level of toxin and vitamin E
4 supplementation.

5

6 Table 2. Protein oxidation values measured as nmol carbonyl/ mg protein,
7 in liver of control fish and fish orally exposed to a single dose of
8 cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 120.0 µg/fish) and two
9 different levels of vit E supplementation (200 and 700 mg vit E/kg diet) or
10 without it. The values are expressed as mean ± SE (n=8). The significance
11 levels observed are #### P<0.001 in comparison to fish from group 2 and
12 +++ P< 0.001 when fish from groups 4 and 6 are compared.

13

14 Table 3. GSH/GSSG ratio in liver of control fish and fish orally exposed to a
15 single dose of cyanobacterial cells (MC-LR offered to fish = 120.0 µg/fish)
16 and two different levels of vit E supplementation (200 and 700 mg vit E/kg
17 diet) or without it. The values are expressed as mean ± SE (n=8).