

## CAPÍTULO 3

# Cianotoxinas. Farmacología y efectos de las principales toxinas presentes en Argentina. Microcystinas, Saxitoxinas, Anatoxinas, Cylindrospermopsinas, Lipopolisacáridos

Darío Andrinolo y Daniela Sedan

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

## Resumen

Las cianotoxinas son un grupo química y toxicológicamente diverso de toxinas naturales. A pesar de su origen acuático, la mayor parte de las cianotoxinas que se han identificado hasta la fecha parecen ser más peligrosas para los mamíferos terrestres que para la biota acuática. Las Cianobacterias sintetizan una gran variedad de metabolitos inusuales cuya función natural es variada y muchas veces no determinada. La investigación se ha centrado fundamentalmente en los compuestos que afectan a seres humanos y animales domésticos y en aquellos de interés farmacológico y biotecnológico. Otras gamas de productos no tóxicos también se han encontrando en cianobacteria y las características bioquímicas y farmacológicas de éstos son totalmente desconocidas.

Los mecanismos de toxicidad cianobacterial descritos y entendidos actualmente son muy diversos y se extienden desde efectos hepatotóxicos, neurotóxico y dermatotóxicos a la inhibición general de la síntesis de proteínas. Para determinar los peligros específicos de toxinas cianobacteriales es necesario entender sus características químicas y físicas, su ocurrencia en las aguas utilizadas por la población, la regulación de su producción y su desarrollo en el ambiente (1).

**Palabras clave:** Microcystinas, Saxitoxinas, Anatoxinas, Cylindrospermopsinas, lipopolisacáridos.

## 1. Cianotoxinas

Tradicionalmente se ha dividido a las Cianotoxinas según su estructura química: en péptidos, alcaloides y lipopolisacáridos cíclicos (LPS). O bien según sus efectos tóxicos: en hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas (Tabla 1).

**Tabla 1:** Metabolitos tóxicos que se han identificado hasta la fecha sintetizados por diversos géneros de cianobacteria, junto con sus órganos blanco primarios en seres humanos. Modificado de Chorus and Bartram, 1999 (2).

Grupo de toxinas y toxinas	Principal órgano blanco en mamíferos	Géneros de cianobacteria productoras de toxinas
<b>Péptidos cíclicos</b>		
Microcystinas	Hígado	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> ( <i>Oscillatoria</i> ), <i>Nostoc</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Anabaenopsis</i>
Nodularina	Hígado	<i>Nodularia</i>
<b>Alcaloides</b>		
Anatoxina-a	Sinapsis colinérgicas	<i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> ( <i>Oscillatoria</i> ), <i>Aphanizomenon</i>
Anatoxina-a(S)	Sinapsis colinérgicas	<i>Anabaena</i>
Aplysiatoxins	Piel	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Planktothrix</i> ( <i>Oscillatoria</i> )
Cylindrospermopsinas	Hígado	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , ( <i>Umezakia</i> )
Lyngbyatoxin-a,	Piel, tracto gastrointestinal	<i>Lyngbya</i>
Saxitoxinas	Axones neuronales, inhibe la conducción del impulso nervioso	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i>
Lipopolisacáridos (LPS)	Potencial irritante, afecta cualquier tejido expuesto	Todas

## 1.1. Mezclas complejas

Las toxinas ocurren generalmente como mezclas de análogos estructurales del mismo de tipo toxina, por ejemplo, hay cerca de ochenta Microcystinas (MCs) conocidas y varias decenas de análogos de saxitoxinas (STXs). Estos grupos de análogos se conocen bajo el plural de la toxina tipo, así bajo la denominación de STXs se agrupan todas sus variantes y lo mismo ocurre con las MCs. Cada cepa de algas o florecimiento no expresa todas las variantes posibles sino unas pocas de ellas.

Además existen cepas y/o florecimientos en los que coexisten grupos de toxinas diferentes por ejemplo, MCs y STXs. En este sentido es probable la existencia de sinergismo en los efectos tóxicos de estas mezclas complejas (3).

Otro aspecto del problema toxicológico en el ambiente son las "toxinas conocidas" y "toxinas no conocidas". De hecho es usual que las evaluaciones de toxicidad de extractos crudos de células indiquen mayor toxicidad en ensayos biológicos como el ensayo ratón u otros con organismos acuáticos como peces o crustáceos, que aquella que puede ser atribuida a las toxinas identificables dentro de la mezcla con métodos químicos, bioquímicos o inmunológicos.

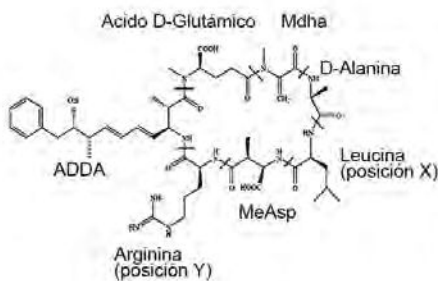
Por lo tanto, las evaluaciones de una o varias toxinas pueden no ser suficientes para caracterizar el riesgo ocasionado por la mezcla de cianotoxinas en un florecimiento. Esta problemática indica que los bioensayos no puedan descartarse completamente y deban utilizarse en forma complementarias con técnicas que, aunque más sofisticadas, pueden llevar a falsos negativos.

## 2. Péptidos Hepatotóxicos: Microcystinas

Las Microcystinas (MCs). Estas toxinas de naturaleza peptídica e hidrosoluble, son unas de las principales responsables de los eventos de intoxicación donde se encuentran involucradas cianobacterias, y es donde radica la peligrosidad y el principal riesgo para la salud humana y animal que conllevan los florecimientos cianobacterianos.

Las microcystinas son heptapéptidos cíclicos y comparten un aminoácido característico de estas moléculas denominado ADDA (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico) de carácter hidrofóbico y responsable en gran medida de las características tóxicas de la molécula.

Existen una gran cantidad de congéneres de MCs, que se diferencian en partes variables de la molécula como son ciertos aminoácidos ubicados en determinadas posiciones; mientras que mantienen constante otras regiones de la misma (4).



La isoforma de estas toxinas más estudiada es la Microcystina LR (MC-LR) que se diferencia de las demás por tener Leucina (L) en la posición X y Arginina (R) en la posición Y, siendo X e Y las posiciones variables de la molécula (5) (Fig. 1).

Los principales productores de estas toxinas, son cianobacterias presentes en cuerpos de agua dulce, de los géneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Nostoc* y *Snowella*.

**Fig.1:** Molécula de MC-LR. Con líneas azules se delimitan los 7 aminoácidos que conforman la molécula, siendo ADDA (ácido 3-amino,9-metoxi,10-fenil,2,6,3-trimetil-deca-4(E),6(E)-dienoico), MdhA (Metil dehidroalanina), MeAsp (ácido metil aspártico), el aminoácido característico de las cianobacterias.

El principal órgano blanco de las MCs es el hígado, por lo tanto, es considerada como una hepatotoxina, aunque puede tener efectos sobre otros órganos; como riñón, pulmón e intestino.

Por ser la más estudiada hasta el momento, se tomará de aquí en adelante a la MC-LR como prototipo de este grupo de toxinas.

## 2.1. Vías de exposición

Debido a que estas toxinas están presentes en el agua, cualquier contacto con cuerpos de agua contaminados o con productos derivados de éstos pueden generar intoxicaciones tanto agudas como crónicas, con los consecuentes daños en la salud. Por ello las principales rutas de exposición a las cianobacterias y/o sus toxinas son por contacto directo (piel, mucosas, ojos, oídos), por ingesta de agua, peces de lagos, lagunas o ríos, suplementos dietarios a base de cianobacterias no tóxicas contaminadas con cianotoxinas y por vía inhalatoria principalmente durante la realización de deportes náuticos en los cuales se generan gran cantidad de aerosoles (6).

Por supuesto la frecuencia, el grado y la vía de exposición determinarán el tipo de intoxicación que se sufra y por lo tanto el daño, principalmente hepático, que se producirá.

De todas las posibles vías de exposición aquella reconocida mundialmente como la más común es la ingesta de aguas contaminadas.

## 2.2. Farmacocinética

La absorción de la toxina ocurre principalmente a nivel de las vellosidades del intestino delgado a través de un sistema de transportadores multiespecíficos de iones orgánicos. MC-LR es absorbida a nivel intestinal (78-88%) y directamente transportada en circulación hasta el hígado donde ingresa al hepatocito a través del sistema de transportadores de ácidos biliares (7). Es precisamente esta farmacocinética la que le da el carácter de hepatotoxina, ya que los transportadores de sales biliares son muy efectivos en remover las MCs de circulación y por tanto de acumularlas dentro del hígado.

Se han realizado numerosos estudios en animales con toxina radio-marcada que han permitido demostrar que la mayoría de la toxina se localiza en el hígado, repartiéndose entre formas libres y unidas a proteínas. La toxina acumulada en hígado se mantiene en un nivel estable durante aproximadamente 6 días luego del tratamiento con la toxina (8).

Estas toxinas son metabolizadas en el hígado mayormente mediante reacciones de conjugación y luego eliminadas como conjugados con glutatión, cisteína o como ADDA dienos por orina y en menor proporción en heces. Estos metabolitos conjugados de la toxina tendrían menor toxicidad que la toxina libre (9).

## 2.3. Mecanismo de acción

Muchos trabajos de investigación se han realizado tanto in vitro como in vivo para estudiar el mecanismo de acción de las MCs y su relación con los daños observados en los eventos de intoxicación reportados en todo el mundo. Pese a esto, aún no se ha dilucidado completamente los mecanismos y procesos que cursan luego de la exposición a MCs.

Estas toxinas son potentes inhibidores de serina/treonina proteínas fosfatas (PPs) 1 y 2A (PP1 y PP2A), las cuales constituyen un punto muy importante sobre el cual pivotan la mayoría de los mecanismos que intervienen en el mantenimiento y la regeneración celular, con importantes consecuencias a corto y largo plazo para la célula y el organismo (10).

Como consecuencias principales de esta inhibición de fosfatasa generada por la unión covalente de las MCs, podemos citar un estado de hiperfosforilación de muchas proteínas. Como es conocido la mayoría de los procesos celulares se regulan a través de equilibrios de fosforilación/desfosforilación de muchas proteínas; estos dos estados de una misma proteína reguladora indicarán a su vez un equilibrio activación/desactivación que impactará sobre el proceso que esa proteína esta regulando.

Debido a la inhibición de fosfatasa encontraremos una "activación" de kinasas; por ejemplo las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cuales a su vez fosforilarán y activarán otras proteínas.

Como resultado de la alteración de este equilibrio fosforilación/desfosforilación se encontrarán alteraciones a varios niveles como es el caso del citoesqueleto en el cual se encuentran alteradas sus tres estructuras componentes (microtúbulos, filamentos intermedios, microfilamentos), o del ciclo celular donde se producen desajustes que pueden derivar en apoptosis o en proliferación celular descontrolada dependiendo del caso (11).

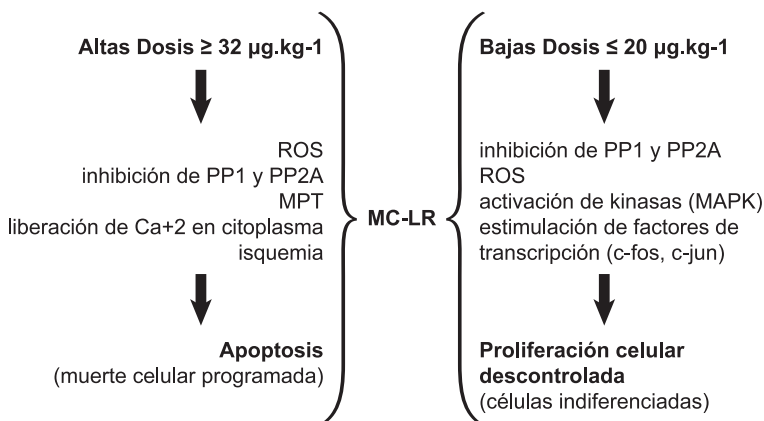
Por otro lado, la exposición a MCs genera un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), con la consecuente alteración del estado redox celular, principalmente en hígado y riñón. Este aumento de ROS afecta profundamente a los componentes esenciales de la célula, ya que al ser especies muy reactivas reaccionarán rápidamente con moléculas como lípidos, ADN y proteínas generando importantes consecuencias funcionales, como aumento de la peroxidación lipídica (LPO), alteraciones mitocondriales que llevan a un estado de "transición de permeabilidad mitocondrial" (MPT) el cual a su vez favorece la salida de  $Ca^{+2}$  y citocromo c al citoplasma, y deriva en activaciones de calpaínas, CaMKII, fosfolipasa-A2; así mismo estimula la actividad MAPK y altera profundamente las actividades de todas las enzimas intervinientes en la homeostasis redox celular (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidada, glutatión transferasa, óxido nítrico sintasa) y los niveles de los componentes no enzimáticos de este sistema (glutatión, tocoferoles)(12, 13).

Aunque no está del todo aclarado como es el incrementan los ROS ante una exposición a MCs, es un mecanismo importante de patogenia que junto con las alteraciones descritas anteriormente generan los efectos en la salud que se observan ante un caso de intoxicación con MCs.

Dependiendo de los niveles de toxina a los que se encuentra expuesto el organismo se podrían generar dos tipos de daño diferente, es por ello que actualmente se propone un patrón de efecto dual. (11).

Así, a altas dosis ( $\geq 32 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) las MCs inducen apoptosis principalmente en hígado, mientras que a bajas dosis ( $\leq 20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) se promueve una descontrolada proliferación celular de hepatocitos (Fig 2).

Si bien *in vitro* se ha relacionado el desarrollo de apoptosis con la generación de ROS, MPT, liberación de  $Ca^{+2}$  en el citoplasma e inhibición de PP1 y PP2A, *in vivo* se ha encontrado que debido a la presencia



de apoptosis en la periferia de zonas necróticas, ésta podría estar relacionada con procesos de isquemia resultantes de la obstrucción del flujo sanguíneo hepático que puede ocurrir en estos casos.

**Fig. 2.** Principales mecanismos de acción involucrados en la respuesta dual frente a altas y bajas concentraciones de MC-LR. Modificado de Gheringer y cols.2004 (11).

Por otro lado se cree que la promoción de la división celular que se observa a bajas dosis de MCs está relacionada con la alteración de las kinasas (MAPK), resultante de la inhibición de PPs, que estimulan la activación de ciertos factores de transcripción (c-fos, c-jun), todo lo cual deriva en un aumento en el número de células indiferenciadas que pueden ser responsables de las lesiones cancerosas en hígado y colon reportados en la literatura.

## 2.4. Intoxicaciones con MCs

Los tipos de intoxicación que se produzcan con MCs dependerán de varios factores como dosis, vía de exposición y prolongación de la misma. De esta forma encontramos intoxicaciones principalmente de dos tipos: aguda y crónica; existiendo entre ellos algunas variantes como subaguda o subcrónica.

Estos dos tipos generales de intoxicación se diferencian principalmente en el tiempo de exposición a la toxina y en la dosis, siendo usualmente los casos agudos aquellos donde el paciente está expuesto en un período muy corto de tiempo y a dosis altas generalmente, mientras que los casos crónicos se producen por contactos frecuentes del paciente con la toxina durante un tiempo prolongado y en general a dosis bajas.

Debido a estas características diferentes en cuanto a la forma de exposición en uno y otro caso, también encontramos que los sistemas y tiempos de recuperación con los que cuenta el organismo para manejar esta intoxicación son diferentes en estas dos condiciones, y es por ello que los cuadros que se presentan en una intoxicación aguda y en una crónica son diferentes.

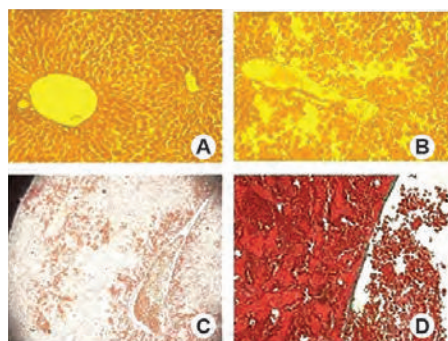
Otro aspecto importante a tener en cuenta al momento de definir cuán tóxica puede ser una sustancia es conocer su dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>), la cual indica la dosis que es capaz de matar al 50% de la población estudiada. La LD<sub>50</sub> de MC-LR es de 50 µg.kg<sup>-1</sup> por vía intraperitoneal, mientras que para las otras MCs varía entre 50 y 600 µg.kg<sup>-1</sup> dependiendo de la toxina de la que se trate (14).

Asimismo, la LD<sub>50</sub> depende de la vía por la que se administre. En este caso debido a la naturaleza peptídica de la toxina, la LD<sub>50</sub> oral es unas 10 veces superior a la intraperitoneal, debido a que gran parte de la toxina se degrada con los ácidos estomacales y peptidasas intestinales.

### 2.4.1. Intoxicación aguda con MCs

Este tipo de intoxicación está caracterizada principalmente por un importante daño hepático debido a las alteraciones en el citoesqueleto, apoptosis y necrosis causadas por MC-LR en los hepatocitos (15). En estudios realizados en ratones inyectados con dosis letales de MC-LR se observaron importantes alteraciones características de la intoxicación aguda. Estos animales mueren aproximadamente 40 minutos luego de la administración intraperitoneal de la toxina y presentan alteraciones en su comportamiento y hepatomegalia

(16). A nivel histológico presentan importante disrupción del parénquima hepático con pérdida de hepatocitos y alteraciones en la pared vascular. A través de técnicas de tinción específicas como la Tricrómica de Gomori se pudo evidenciar la ruptura de vasos y la consecuente hemorragia intrahepática. (Fig. 3)



**Fig. 3.** Cortes histológicas de hígados de ratón Técnica Hematoxilina-Eosina: (A) (20X) Control. (B) (20X) Inyectado con extracto acuoso de *Microcystis sp.* obtenida de un florecimiento natural de río de la Plata, tracto portal con importante vasodilatación, disrupción de la interfase del parénquima y pérdida de parénquima hepático. (C) (10X) Inyectado con 100 µg.kg<sup>-1</sup> de MC-LR, obsérvese la importante

hemorragia intrahepática. (D) (40 X) idem (C) técnica Tricrómico de Gomori, nótese la disrupción del vaso y la salida al parénquima de los elementos figurados de la sangre.

#### 2.4.2. Intoxicación crónica con MCs

De manera similar a lo que ocurre en la intoxicación aguda, es posible que muchos casos de intoxicación crónica pasen desapercibidos debido a lo inespecífico de los síntomas que pueden presentar los pacientes víctimas de tales afecciones, siendo estos casos tanto o más importantes que aquellos. La población podría estar expuesta principalmente de forma intermitente y periódica a las cianobacterias y sus toxinas por vía oral ya sea en el agua de bebida, durante actividades recreacionales, por la ingesta de productos contaminados como peces o incluso suplementos dietarios a base de cianobacterias no tóxicas como *Spirulina* spp que pueden estar contaminadas con otras cianobacterias productoras de toxinas.

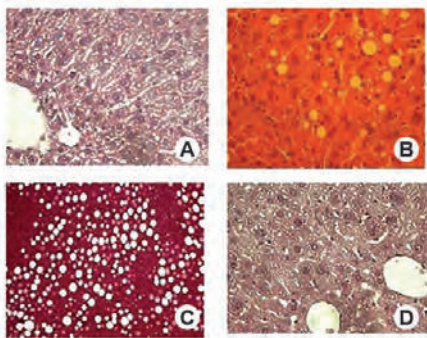
Esto ha impulsado una serie de estudios de intoxicaciones crónicas y/o sub-crónicas con extractos de cianobacterias toxígenas y con MC-LR purificada, ya sea *in vivo* o *in vitro*, tendientes a investigar cuáles son los daños producidos por estas toxinas en este tipo de intoxicaciones, qué mecanismos celulares se ven afectados por las toxinas y cuáles pone en juego la célula para responder a dicho daño.

Asimismo, se han analizado casos de poblaciones expuestas a estas toxinas y su posible relación con altos índices de cáncer hepático.

En relación con esto se han encontrado importantes resultados en estudios crónicos realizados en ratones negros expuestos en un primer momento a un iniciador y luego crónicamente a *Microcystis* sp en el agua de bebida durante 50 días (las dosis estimadas eran entre 0 y 4.2 mg.Kg<sup>-1</sup> de peso por día). Estos animales presentaron alteraciones dosis dependientes, entre las que destacaron pérdida importante de peso, aumento de los niveles plasmáticos de las enzimas marcadoras de daño hepático y el desarrollo de tumores adenomas duodenales, adenocarcinomas, tumores linfoides en hígado, timo y bazo (17).

De los estudios crónicos y sub-crónicos realizados en animales ha resultado que los daños generados en los tejidos principalmente atacados por MCs (hígado, riñón, intestino) son diferentes a los observados en casos agudos.

En ensayos de intoxicación sub-crónica por inyección intraperitoneal de 25 µg.Kg<sup>-1</sup> peso de MC-LR cada 48 hs. durante un mes, histológicamente se encuentra una importante alteración de la arquitectura hepática con una dilatación notoria de sinusoides, macrovacuolas lipídicas intracitoplasmáticas, binucleación acompañada de discariocis nuclear, mientras que no se observaron fibrosis, congestión vascular (ectasia) ni hemorragia intahepática (16). Además si bien se observaron alteraciones en el tejido conectivo que forma la trama extracelular de los hepatocitos, este tejido no se evidenció debilitado en las estructuras que rodean y forman la pared de los vasos, lo cual se correlaciona con la ausencia de hemorragia intrahepática (Fig. 4).



**Fig. 4.** Histología de hígados de ratón control (40X)(A), tratado durante un mes con 25 µg.kg<sup>-1</sup> de MC-LR (40X) (B) y (C) Se aprecia importante vacuolización lipídica intracitoplasmática, binucleación, discariocis nuclear, sinusoides dilatados. Luego de dos meses de

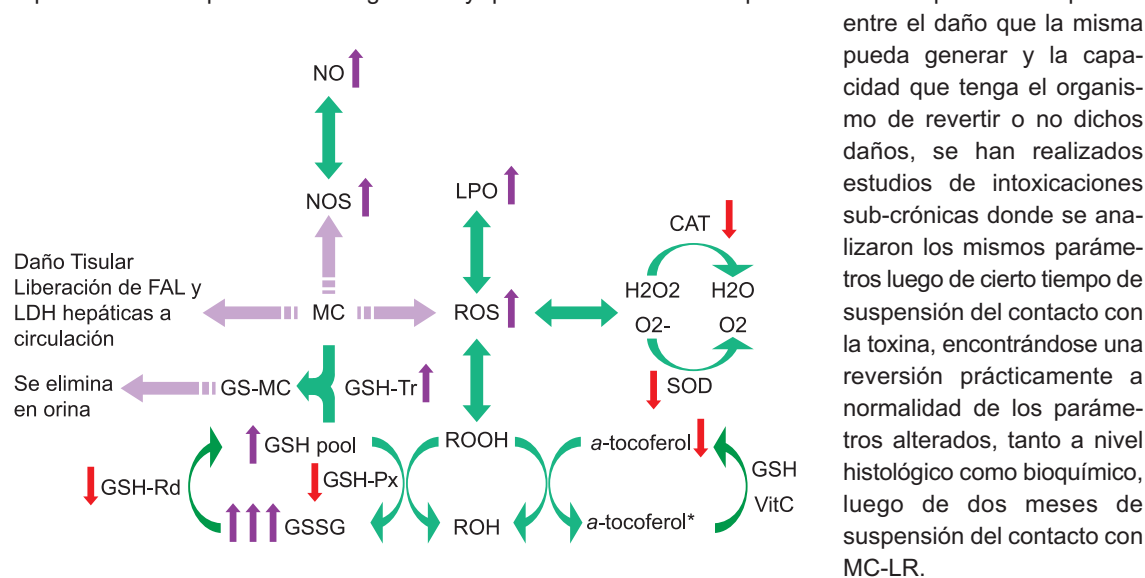
recuperación sin exposición a la toxina se observa una importante reversión de los daños causados (40X) (D). En los cortes de las figuras (A), (B) y (D) se realizó la técnica hematoxilina-eosina, y en el corte (C) la técnica PAS, la cual indica que esas vacuolas no son de naturaleza glucídica.

Los parámetros bioquímicos plasmáticos indicadores de daño hepático también se presentaron alterados: fosfatasa alcalina y transaminasas (ALT y AST) aumentadas; mientras que la histología y los parámetros marcadores de afección renal se encontraron dentro de niveles normales.

Los marcadores de estrés oxidativo también se observaron alterados en estos modelos animales. Importantes aumentos en peróxidos lipídicos en hígado, riñón y plasma resultan del aumento de especies reactivas de oxígeno producido durante la intoxicación con MC-LR. El perfil lipídico y los componentes enzimáticos y no enzimáticos del sistema antioxidante celular hepático y renal también se encontraron alterados significativamente (18) (Fig. 5).

A pesar de presentar este gran número de parámetros alterados no se observaron síntomas en los animales que indicaran alguna diferencia respecto del grupo control.

Teniendo en cuenta que el hígado, principal órgano blanco de esta toxina, es uno de los órganos con mayor capacidad de recuperación del organismo y que la toxicidad de cualquier sustancia depende del equilibrio



**Fig. 5.** Diagrama de efectos de la intoxicación sub-crónica con MC-LR sobre enzimas y componentes no enzimáticos del sistema de protección antioxidante celular. Modificado de Gehringer et al., 2004 (11).

### 3. Alcaloides Neurotóxicos: Saxitoxinas y Anatoxinas

Ocurrencias masivas de cianobacterias neurotóxicas se han registrado en América del Norte, Europa y Australia, donde han causado intoxicaciones en animales y humanos. Se agrupan dentro del término Neurotoxinas a tres familias químicamente distintas:

- anatoxina-a y homoanatoxina-a, que imitan el efecto de la acetilcolina.
- anatoxina-a (S), que es un anticolinesterásico y
- saxitoxinas, también conocido como veneno paralizante de mariscos (VPM) en la literatura de toxinas marinas, que bloquean los canales de sodio de células nerviosas.

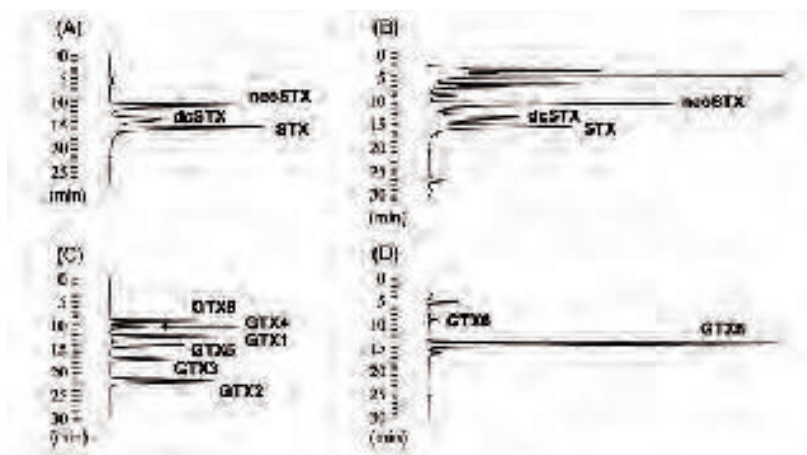
### 3.1. Saxitoxinas (STXs)

En aguas dulce, han sido descritas varias especies de cianobacterias entre las destacan: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei* y *Cylindrospermopsis raciborskii* (19, 20) que sintetizan toxinas paralizantes y que son un potencial riesgo para la salud humana y animal como ha sido descrito en Australia, Portugal y Brazil (21).

Se puede generalizar que en los ambientes marinos las especies de microalgas productoras de STXs son Dinoflagelados (algas eucariotas marinas) y que la exposición humana surge a partir del consumo de moluscos filtradores como almejas y cholgas que bioacumulan las toxinas, siendo los eventos de intoxicaciones muy frecuentes en zonas afectadas, especialmente las costas patagónicas. En ambientes de agua dulce varias especies de Cianobacterias han sido descritas como productoras de estas toxinas y la exposición humana es principalmente por ingestión directa de agua cruda o tratada (22).

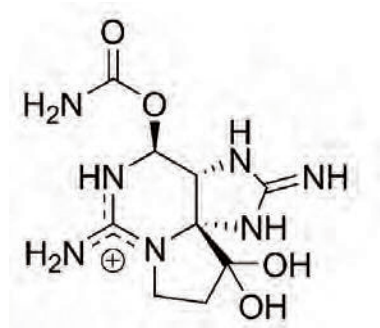
El veneno paralizante de moluscos (VPM) es uno de los venenos no proteicos más tóxicos descritos. Se compone de decenas de toxinas diferentes, que comparten un esqueleto común denominado 3,4,6,-trialquil tetrahidropurina y se dividen en tres grandes grupos según la carga neta que presentan a pH neutro. El grupo de las

STXs con carga neta +2, el grupo de las gonyaulatoxinas (GTXs) con carga neta +1 y el grupo de sulfocarbamoil saxitoxinas (dcSTXs) con carga neta 0 (Fig. 7) La Saxitoxina, es la más conocida de estas toxinas, cuya dosis letal cincuenta (LD<sub>50</sub>) intraperitoneal es en ratones de 10 µg.kg<sup>-1</sup> y se estima similar para todos los mamíferos (23).



**Fig. 6:** Corrida de cromatografía Líquida (HPLC-FLD Fluorescencia detector) correspondientes a estándares analíticos de STX and GTX (a y c) y corrida de extractos de *Anabaena flos aquae* (b y d) recolectada en Cararú, Brasil (20).

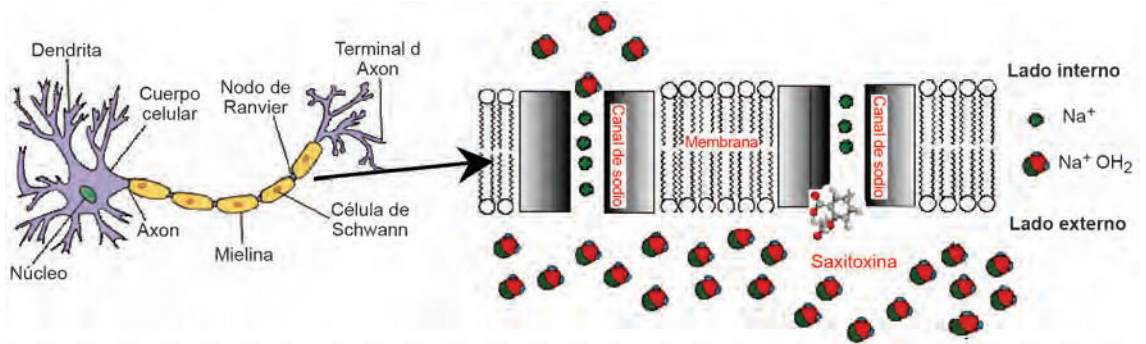
**Fig. 7:** Estructura molecular de saxitoxina, la molécula prototípica y más estudiada de la familia de saxitoxinas.



#### 3.1.1. Las toxinas paralizantes inhiben la transmisión de los impulsos nerviosos

Las STXs, bloquean selectiva y reversiblemente los canales de sodio sensibles a voltaje presentes en la membrana de células excitables, inhibiendo la corriente de iones Na<sup>+</sup> asociada al potencial de acción y por ende bloqueando la transmisión del impulso nervioso. Cada una de las toxinas del VPM presentan diferentes afinidades por su receptor en el canal de sodio y por lo tanto diferentes toxicidades específicas (24).





**Fig. 8:** Los canales de Sodio dependiente de voltaje se ubican fundamentalmente en los nodos de Ranvier a lo largo de los axones. Durante la propagación del impulso nervioso, los canales de sodio se abren y los iones de sodio fluyen hacia afuera siguiendo su gradiente electroquímico, despolarizando la membrana. Esto a su vez activa los canales de sodio del siguiente nodo dando así continuidad al impulso a lo largo del axón. En presencia de cantidades nanomolares de STX la probabilidad de apertura de los canales de Sodio disminuye, impidiéndose el flujo de iones de sodio y por tanto inhibiendo la transmisión del impulso.

### 3.1.2. Absorción intestinal de las saxitoxinas

Saxitoxina tiene una rápida incorporación desde el lumen intestinal (no tiene absorción a nivel estomacal) a la circulación sistémica. En condiciones experimentales donde la toxina se aplica directamente en el estómago la absorción es completa antes de las 3 horas de producida la ingestión. Existen importantes diferencias en la capacidad de absorber estas toxinas entre diferentes especies de mamíferos, así aun cuando la DL<sub>50</sub> no varía significativamente entre especies, la dosis letal oral puede ser significativamente diferente. En ratones y ratas que cuentan con eficientes sistemas de detoxificación de fármacos a nivel intestinal la DL<sub>50</sub> oral se sitúa por arriba de los 300 µg.kg<sup>-1</sup> mientras que en gatos es de 50 µg.kg<sup>-1</sup> (25). Es difícil estimar la DL<sub>50</sub> oral en humanos, pero las estimaciones indican que sería cercana a 35 µg.kg<sup>-1</sup>.

### 3.1.3. Efectos de STX sobre el sistema cardiovascular

Administrada por vía intravenosa (i.v.), STX produce una drástica caída de la presión arterial, debido fundamentalmente a vasodilatación periférica.

La acción de STX tiene dos componentes: un efecto relajante directo sobre la musculatura lisa de la red vascular y un efecto supresor del tono vasomotor, este último debido al bloqueo de los nervios vasoconstrictores. Sin embargo, la marcada vasodilatación periférica que ocurre como consecuencia de la administración de STX, puede ser contrarrestado con la inyección intravenosa de adrenalina y también de noradrenalina ambos conocidos estimuladores α-adrenérgicos. Esto sugiere que, STX no actúa directamente sobre el músculo liso, sino sobre el tono vasomotor controlado neuronalmente (26).

Cuando las toxinas son ingeridas la presión arterial es el parámetro fisiológico más sensible a la presencia de toxina en el plasma. Saxitoxina genera una rápida respuesta hipotensora. Además STX produce bradiarritmias, bloqueos de 2° grado y paro cardíaco en una forma dosis dependiente.

### 3.1.4. Efectos de STX sobre el sistema respiratorio

La saxitoxina en gatos produce enlentecimiento de las oscilaciones en neurogramas del nervio frénico (vía motora de acción sobre el diafragma) interrumpiendo la actividad diafragmática (paro respiratorio) sin afectar los potenciales de acción evocados por estimulación del centro inspiratorio en la médula oblongata (27).

Aunque los efectos provocados por saxitoxina pueden ser explicados completamente entendiendo su acción a nivel de los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje ubicados en la periferia, también existen hechos que sugieren una acción directa de la toxina en el Sistema Nervioso Central (SNC).

**Tabla 2:** *Parámetros toxicocinéticos derivados de la administración oral de GTX 2/3. El aclaramiento total y el*

Parámetros farmacocinéticos	Promedio ± E. Est., N= 4
Constante de absorción (Ka)	$\pm 0.11 \text{ h}^{-1}$
Cmax	$63 \pm 18 \text{ (ng.ml}^{-1}\text{)}$
Tmax	$230 \pm 10 \text{ (min)}$
Aclaramiento Total	$3.84 \pm 1.29 \text{ (ml.min}^{-1}\text{.kg}^{-1}\text{)}$
Aclaramiento Renal	$4.6 \pm 0.17 \text{ (ml.min}^{-1}\text{.kg}^{-1}\text{)}$
Volumen de distribución aparente	$1.23 \pm 0.25 \text{ (L.kg}^{-1}\text{)}$

*Volumen de Distribución Aparente fueron determinados según un modelo no-compartimental (PK static's model). La constante de absorción (Ka), la concentración máxima de toxina en el plasma (Cmax), el tiempo al cual se alcanza Cmax (Tmax) y el aclaramiento renal fueron determinados directamente de datos experimentales tomado de (26).*

### 3.1.5. Excreción y Metabolización de GTX 2/3

Las STXs se excretan por vía renal fundamentalmente en forma libre, es eliminada del plasma por libre filtración glomerular y no es secretada ni absorbida por los túbulos renales (Tabla 2)

### 3.1.6. Interpretación de los datos dentro de un modelo monocompartmental

A partir de los datos farmacocinéticos (los principales se presentan en la Tabla 1) podemos asumir un modelo monocompartmental de absorción, distribución, excreción y efectos tóxicos de GTX 2/3.

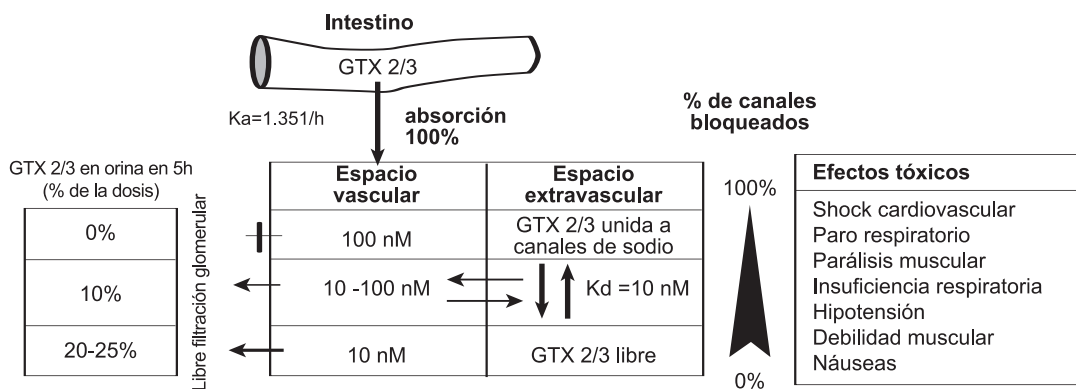
Una vez en el intestino delgado las toxinas son rápidamente absorbidas hacia el espacio vascular y se distribuyen libremente en el organismo. El volumen de distribución de 1.23 litros.kg<sup>-1</sup> indica que la toxina está siendo secuestrada en algún tejido o compartimiento. Este compartimiento serían los canales de sodio dependientes de voltaje, ya que dada la alta afinidad de las toxinas por su sitio de unión a los canales de sodio dependientes de voltaje, estos serían los responsables del secuestro de la toxina en un proceso dinámico y reversible entre la toxina libre y la toxina unida a los canales que se encuentran distribuidos ampliamente en todo el organismo. Este compartimiento incluye a los canales de sodio ubicados en el Sistema Nervioso Central (SNC) ya que como se determinó en un trabajo previo éstas toxinas atraviesan la barrera hematoencefálica, siendo posible detectarlas en el SNC a concentraciones superiores que en el plasma (27, 28).

De acuerdo con el modelo propuesto, cuando se alcanzan niveles plasmáticos menores de 10 nM son mínimos los efectos tóxicos ya que una pequeña fracción de los canales de sodio se encuentran bloqueados y por tanto los síntomas son mínimos. Así mismo el mínimo descenso en la presión arterial no afectaría la filtración glomerular.

En el caso en que los niveles plasmáticos alcancen niveles superiores a 10 nM los efectos tóxicos son mayores en correspondencia con el mayor número de canales bloqueados. Se ha descrito que diferentes vías nerviosas poseen canales de sodio con afinidades diferentes por saxitoxina, esto podría explicar por qué las dificultades respiratorias son uno de los primeros síntomas ya que el nervio frénico (responsable de la actividad diafragmática) posee mayor afinidad que, por ejemplo el nervio vago (28).

Otro sensible efecto de las toxinas es la hipotensión vascular, que provoca la caída de presión arterial. El descenso de la presión arterial afecta directamente la presión de filtración glomerular y por tanto la velocidad de filtración glomerular. Así, concentraciones plasmáticas superiores a 10 nM se correlacionan con un descenso en la capacidad de excreción de las toxinas.

Es posible pensar que a valores de 100 nM de STXs en plasma, el número de canales de sodio que se encuentran bloqueados en todo el organismo es sumamente alto y por tanto los efectos tóxicos son máximos, es decir paro respiratorio, anuria y shock cardiovascular, siendo el desenlace fatal inevitable.



**Fig. 9.** Modelo mono-compartamental de absorción, excreción y efectos tóxicos de GTX 2/3. Modificado de Andrinolo y cols. 2002 (28).

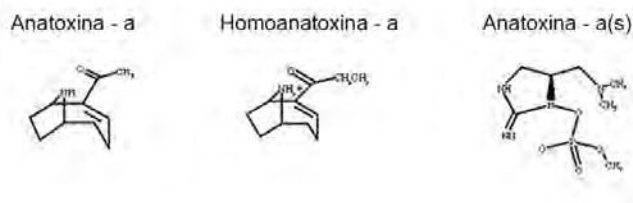
### 3.1.7. Tratamiento de pacientes intoxicados con Saxitoxinas

- Lavado estomacal con sonda y carbón activado, realizado por personal especializado.
- Administración de suero con el fin de aumentar el volumen circulatorio y evitar anuria. Diuréticos solo en pacientes estabilizados hemodinámicamente.
- Conectar a un respirador mecánico o en su defecto “ambusear”.
- En caso de alteraciones cardiovasculares utilizar dobutamina.
- Si el paciente no responde Dializar.

Los pacientes diabéticos, los pacientes cardiovasculares y los niños son más vulnerables.

## 4. Anatoxinas

Las anatoxinas son un grupo de alcaloides neurotóxicos producidos por varios géneros de cianobacterias como *Anabaena*, *Oscillatoria* y *Aphanizomenon* (29). La toxicidad de estos compuestos (DL50) varía de 20 µg. kg<sup>-1</sup> (en peso, IP ratón) para la anatoxina-a (S) a 200-250 µg.kg<sup>-1</sup> para la anatoxina-a y homoanatoxina-a, haciéndolos más tóxicos que las MCs (DL50 ≈ 100 µg.kg<sup>-1</sup>) (30,31).

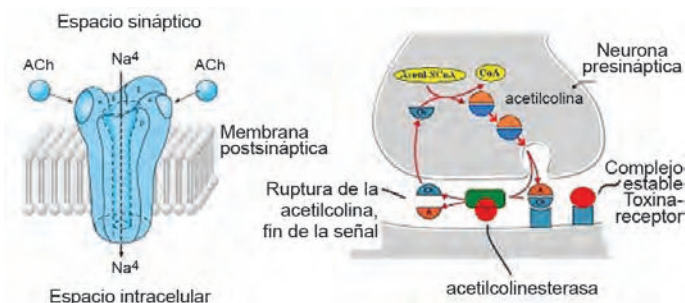


**Fig. 10.** Estructura molecular de las anatoxinas.

## 4.1 Anatoxinas-a y anatoxinas-a (s)

Anatoxina-a y su estructural análogo, homoanatoxina-a (methylene-anatoxin-a) (Fig. 10), son alcaloides que imitan la acción de la acetilcolina, por lo que actúa en las sinapsis colinérgicas activando los receptores nicotínicos de la célula pos-sináptica. La célula pos-sináptica puede ser otra neurona que responderá con la iniciación de un impulso nervioso, o una célula efectora muscular o una glandular las que responderán a la presencia de las anatoxinas-a induciendo a la contracción o secreción según el caso. A diferencia de la acetilcolina, las anatoxinas-a no serán desactivadas por la acetilcolinesterasa, por lo que la señal de activación seguirá “encendida”. En concordancia con su acción a nivel sináptico, las intoxicaciones en mamíferos se caracterizan por intensas contracciones musculares y salivación profusa. Las células musculares continúan siendo estimuladas, provocando contracciones musculares, fatiga y parálisis. La estimulación de los músculos respiratorios puede resultar en paro respiratorio y muerte, como se observa en los estudios de letalidad aguda en animales (30).

Anatoxina-a (s), el segundo tipo de anatoxinas, sólo se produce en la especie *Anabaena flos-aquae*, una de las cepas más tóxicas de cianobacterias. Se trata de un inhibidor de la acetilcolinesterasa. La anatoxina-a (s) se une a la enzima y no permite su interacción con la acetilcolina. Dado que la acetilcolina no se desactiva queda por un tiempo más prolongado en el espacio sináptico accionando sobre los receptores nicotínicos, el resultado final es similar al descrito para anatoxina-a. Anatoxina-a (s) es similar en su acción a plaguicidas organofosforados como el paratión y el malatión.



**Fig. 11.** Diagrama esquemático del receptor nicotínico. El receptor está compuesto de cinco subunidades, es a la vez un canal de  $\text{Na}^+$  que aumenta su probabilidad de encontrarse abierto cuando se le une una molécula de acetilcolina. Cuando el canal se abre los iones  $\text{Na}^+$  causan la despolarización de la membrana postsináptica comenzando un evento excitatorio. Esto puede conducir a un potencial de acción y la propagación

de la señal. Los receptores nicotínicos N1 abundan tanto en ganglios simpáticos como en parasimpáticos autonómicos y en medula suprarrenal, mientras que los N2 actúan en una manera similar, pero son encontrados en la unión neuromuscular de músculo esquelético.

## 4.2. Efectos clínicos de las anatoxinas

El principal efecto tóxico de anatoxina-a es la neurotoxicidad aguda, manifestada como signos progresivos clínicos que incluyen la pérdida de coordinación, fasciculaciones musculares, salivación profusa, convulsiones y muerte por la parálisis respiratoria. Todos estos signos pueden explicarse por su acción mimética con acetilcolina, ya sea en la juntura neuromuscular o neuroglandular, sobre los receptores nicotínicos (31).

## 4.3. Toxicidad en animales de anatoxinas

Anatoxina-a actúa como un agonista nicotínico colinérgico en los receptores en el sistema cardiovascular de las ratas, lo que resulta en una mayor presión arterial y frecuencia cardíaca, así como en la rata y las neuronas del cerebro humano. Anatoxina-a es un potente agonista de la respuesta secretora de las células cromafines adrenales en especies bovinas, presumiblemente a través de neuronas con receptores nicotínicos (32).

Anatoxina-a es capaz de provocar la liberación de neurotransmisores de la célula presináptica en terminales neuromusculares y cerebro. Anatoxina-a estimula la liberación de dopamina en sinaptosomas de músculo estriado en ratas en una forma dosis-dependiente. Estos hallazgos indican que la anatoxina-a puede unirse a los receptores nicotínicos presinápticos para desencadenar la liberación de neurotransmisores. El aumento de la liberación de neurotransmisores podría contribuir a una mayor estimulación de los receptores postsinápticos (32).

La neurotoxicidad aguda “*in vivo*” de la anatoxina-a en los animales está bien documentada y se caracteriza por temblores, alteración de la marcha, convulsiones y muerte por parálisis respiratoria. Hay poca información disponible sobre la neurotoxicidad “*in vivo*” a dosis subletales. Los estudios experimentales de anatoxina-a “*in vitro*”, referentes a su modo de acción neurotóxica, han establecido que es un agonista del receptor nicotínico de la acetilcolina con efectos periféricos y centrales en el sistema nervioso. Los estudios “*in vitro*” también indican que anatoxina-a puede afectar a las células no neuronales, provocando efectos que incluyen la apoptosis a través de la producción de especies reactivas del oxígeno y la activación de caspasas en timocitos de rata y células de riñón de mono, así como la citotoxicidad sin apoptosis en linfocitos de ratón (33).

Los estudios de toxicidad sobre el desarrollo embrionario en ratones, con una dosis única de 2.5 mg.kg<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, mostraron que los fetos carecían de tejido interno suave (34). Sin embargo, no se observaron efectos maternos tales como, necropsia en algún tejido o disminución de peso corporal ni signo clínico alguno, ni efectos sobre el desarrollo como número de implantaciones y fetos, peso corporal fetal y proporción de sexos o malformaciones externas. Por otro lado, el desarrollo de toxicidad según un estudio con inyección de anatoxina-a en hámsters por vía intraperitoneal no encontró alteraciones esqueléticas en los fetos a dosis suficientemente altas como para provocar una disminución del peso fetal (34). Además, no hubo efectos sobre la maduración del desarrollo neurológico posterior al parto. La falta de efectos sobre el peso fetal y otros criterios de valoración indica que 2.5 mg.kg<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> es un NOAEL independiente para la toxicidad materna y para el desarrollo fetal en la exposición oral.

#### 4.4. Farmacodinamia

Estudios de toxicidad oral aguda en animales indican que la anatoxina-a es rápidamente absorbida desde el tracto gastrointestinal, como lo demuestran los signos clínicos de neurotoxicidad y la muerte en unos minutos de exposición.

La única información sobre la toxicidad de la anatoxina-a en el ser humano se compone de dos informes que implican a la ingestión de agua de lagos o estanques que contienen *Anabaena spp.* en varios casos de intoxicaciones gastrointestinales no letales y en una muerte (*ver capítulo 4*). Anatoxina-a también ha sido implicada en casos de neurotoxicidad de animales domésticos y salvajes y la muerte tras el consumo de agua con floraciones de *A. flos-aquae*. Sin embargo, los detalles relativos a la mayoría de estas exposiciones de animales y humanos no fueron reportados debidamente y las dosis no fueron estimadas (34).

#### 5. Cylindrospermopsina

Cylindrospermopsina (Cyl) es una toxina natural producida por cepas de los géneros *Cylindrospermopsis*, *Umezakia*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* y *Raphidiopsis* (35). Cyl tiene una fórmula molecular de C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S y un peso molecular de 415.43 daltons; es altamente soluble en agua (35), en dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol (Sigma, 2006). Químicamente, Cyl es estable en la luz del sol, a altas temperaturas y en una amplia gama de valores de pH.



**Fig 12.** Estructura química: Cyl es un zwitterión (un ión dipolar con cargas localizadas positivas y negativas). DeoxyCyl y 7-epiCyl, son las variantes conocidas.

El perfil toxicológico de Cyl presenta gran similitud con lo observado en los seres humanos durante el episodio de Palm Island, ocurrido en 1979 en Australia y que afectó a 148 personas de los cuales 138 eran niños entre 2 y 16 años. Las personas afectadas mostraron anorexia, hepatomegalia, siendo hospitalizadas 138 (ver capítulo 4 y (37).

En cultivos primarios de hepatocitos, los efectos sobre la síntesis proteica son un indicador temprano de la exposición a Cyl (0.5 a 5 mM) (38). La inhibición sería irreversible ya que no se observa recuperación después de la eliminación de la toxina del medio de cultivo.

Los ratones expuestos a Cyl presentan daños hepáticos y renales, dosis dependiente.

### 5.1. Toxicidad hepática

El hígado es ampliamente considerado como el principal órgano blanco de la toxicidad Cyl, ocasionando necrosis centrolubulillar. El mecanismo específico de la toxicidad en el hígado no está completamente dilucidado. En ratones tratados con una única dosis de 0.2 mg.kg<sup>-1</sup> ip de Cyl purificada se observa el desprendimiento de los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso, algo similar a lo que ocurre con cicloheximida, lo que sugiere que la inhibición de la síntesis de proteínas juega un papel en la hepatotoxicidad de Cyl "in vivo" (39).

Cylindrospermopsina también causa disminución de los niveles de glutatión, así como disminución de la síntesis de glutatión y proteínas, en hepatocitos de rata en cultivo (40). La inhibición de la síntesis de glutatión fue el mecanismo predominante para la reducción de glutatión. Aunque este mecanismo de toxicidad no parece ser el más importante.

### 5.2. El daño renal

El riñón fue el órgano más sensible en ratones expuestos a Cyl durante 11 semanas (41). Los efectos renales en los ratones incluían el aumento de peso del riñón con respecto al control, disminución de proteínas en orina y lesiones proximales tubulares. Los autores plantearon la hipótesis que la disminución de proteínas en orina es consistente con la menor disponibilidad de proteínas y que el aumento de peso del riñón puede reflejar una hiperplasia compensatoria, de modo que el riñón, como órgano de síntesis de proteínas, crece en un intento de mantener homeostasis en respuesta a una disminución de la síntesis de proteínas hepáticas.

### 5.3. Citotoxina

Las primeras investigaciones toxicológicas demostraron que Cyl es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas, al describir la inhibición de la síntesis de globina en reticulocitos de conejo (38). Además se relacionó la toxicidad de Cyl "in vivo", con la disociación de los ribosomas del retículo endoplásmico en el hígado.

En un estudio de corto plazo (14 días) por vía oral en ratones se han determinado el NOAEL y LOAEL utilizando toxina purificada. Así, Shaw y cols. (42) determinan un NOAEL de 0.05 mg Cyl Kg<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> y un LOAEL de 0.15 mg Cyl Kg<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> considerando la infiltración lipídica en el hígado de ratones.

Los estudios de largo plazo, sin embargo, muestran que aún con dosis de  $240 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$  no se presentan grandes alteraciones observando marcadores de daño hepático y realizando estudios anatomopatológicos. Tampoco se observa una disminución de la albúmina plasmática consistente con la acción sobre la síntesis proteica.

En estos casos de exposición prolongada a Cyl se desarrolla una hiperplasia renal y una disminución de las proteínas plasmáticas, lo que ha sido considerado como un mecanismo compensatorio renal al daño hepático (41).

Estos estudios han definido en base a los daños renales un NOAEL y LOAEL de 30 y  $60 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ , respectivamente.

#### 5.4. Toxicidad sobre plantas

Cylindrospermopsina inhibe también el crecimiento de las plántulas de mostaza (43) y la germinación en plantas de tabaco (44) sugiriendo que los efectos podrían ser atribuidos a que la toxina actúa a nivel de la traducción proteica. Estos resultados obtenidos en plantas y células de mamíferos contrastan con la escasa toxicidad cerca de 1.000 veces menor en procariotas como *E. coli* (45).

#### 6. $\beta$ -methylaminoalanina (BMAA)

Nuestra comprensión de la toxicidad de los aminoácidos  $\beta$ -metilamino-L-alanina (BMAA) está íntimamente ligada a los estudios sobre la etiología de una enfermedad neurodegenerativa progresiva en los Chamorros, pueblo local de la isla estadounidense de Guam en el Pacífico occidental.

Casi al final de la Segunda Guerra Mundial, los médicos del Ejército de EE.UU asignados a Guam, encuentran que los Chamorros sufren una enfermedad neurodegenerativa progresiva que se describe como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) o una forma poco frecuente Parkinson. La incidencia de la esclerosis lateral amiotrófica - Parkinson (ALS-P) se estimó en 50 a 100 veces mayor que en otras partes del mundo (46).

Epidemiólogos vincularon la dieta tradicional de los Chamorros a la ocurrencia de las enfermedades neurológicas degenerativas. El pueblo Chamorro cosecha las semillas de palmeras (cícadas) con la que preparan una harina utilizada como alimento en forma de tortillas. A su vez los Chamorros también incluyen en su dieta a una especie de murciélago que también se alimenta de los frutos de la cícadas. La harina y las semillas de cícadas son directa e indirectamente vinculados a las enfermedades epidémicas en Guam.

Las raíces de las cícadas forman una relación simbiótica con una cianobacteria fijadora de nitrógeno del género *Nostoc*, que sintetiza el BMAA (47).

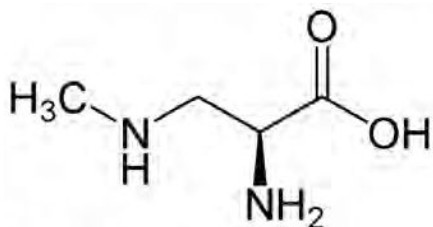


Fig. 13. Estructura química del aminoácido BMAA.

En el caso particular de Guam ocurre una biomagnificación de 100 veces al pasar la toxina de un nivel trófico a otro. La biomagnificación de BMAA a través de la cadena de cianobacterias - las cícadas - zorros voladores - los seres humanos podría ser la explicación para la alta incidencia de ALS-PDC en Guam y las islas vecinas, de acuerdo con Cox y cols. (46).

Sin embargo, el BMAA no se encuentra solo en las cianobacterias simbióticas de las cícadas sino que muchas especies de cianobacterias que producen floraciones, producen BMAA, y que BMAA se puede encontrar en el tejido cerebral de los habitantes no sólo de Guam, sino también de pacientes con Alzheimer de Norteamérica.

Actualmente se sabe que el 73 % de las cepas de cianobacteria testeadas, tanto de vida simbiote como libre, producen BMAA. Estas observaciones podrían indicar que aguas superficiales pueden estar contaminadas con bajos niveles de BMAA de cianobacterias, que pasarían al agua potable y que podrían ser responsables en parte de la incidencia de la enfermedad degenerativa neurológica, incluyendo Parkinson y Alzheimer.

Es de resaltar que millones de personas podrían estar expuestas a BMAA por consumo de alimentos tales como el arroz. Para el cultivo del arroz es ampliamente utilizada la capacidad fijadora de nitrógeno de cianobacterias. Aunque las cianobacterias están provistas de fotosíntesis oxigénica han desarrollado estrategias especiales dirigidas a la convivencia de la fijación, proceso anaerobio, con la fotosíntesis. Los niveles de nitrógeno aportados por las cianobacterias pueden hacer al arroz bastante independiente de la fertilización nitrogenada. La presencia de BMAA en el ambiente, su traspaso a alimentos y efectos en humanos a largo plazo está siendo actualmente investigada.

## Referencias

1. Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites - The Cyanotoxins. J. Appl. Bact. 1992; 72: 445-459.
2. Chorus I, Bartram J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Published on the behalf of WHO by E&FN Spon, London. 1999.
3. Santana C, Carvalho L. Highly Toxic *Microcystis aeruginosa* strain, Isolated from Sao Paulo-Brazil, produce hepatotoxins and paralytic shellfish poison neurotoxins. Neurotoxicity Research. 2011; 19:389-402.
4. Rinehart KL, Namikoshi M, Choi BW. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae. J Appl Phycol. 1994; 6:159-176.
5. Watanabe MF, Harada K-I, Carmichael WW, Fujiki H. Toxic Microcystis. CRC Press, Boca Raton, FL; 1996.
6. Chorus E, Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organisation, E&FN Spon London & New York, 1999.
7. Ito E, Kondo F, Harada K. First report on the distribution of orally administered MCLR in mouse tissue using immunostaining method. Toxicon. 2000; 38:37-48.
8. Robinson NA, Matson CF, Pace JG. Association of microcystin-LR and its biotransformation product with a hepatic-cytosolic protein. J Biochem Toxicol. 1991; 6(3):171-80.
9. Kondo F, Matsumoto H, Yamada S y cols. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. Chem Res Toxicol. 1996; 9:1355-59.
10. MacKintosh C, Beattie K, Klumpp S, Cohen P, Codd G. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Lett. 1990; 264:187-92.
11. Gehringer MM. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. FEBS Lett. 2004; 57(1-3):1-8.
12. Ding W, Shen M, Ong C. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. Environ Health Perspect. 2000;108:605-9.13.
13. Ding W, Shen M, Ong N. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. J Toxicol Environ Health A. 2001, 64: 507-19.
14. Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. - In: Chorus & Bartram, J. (eds.) Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management, 1999.
15. Fawell JK, Hart J, James HA, Parr W. Blue-green algae and their toxins - analysis, toxicity, treatment and environmental control. Water Supply. 1993;11(3/4): 109-21.



16. Andrinolo D, Sedan D, Telese y cols. Recovery after damage produced by subchronic intoxication with the cyanotoxin microcystin LR. *Toxicon*. 2008; 51:457-67.
17. Falconer IR, Humpage AR. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia*.1996; 35(6 supplement):74-79.
18. Sedan D, Andrinolo D, Telese, L, Giannuzzi L, de Alaniz M.J, Marra CA. Alteration and recovery of the antioxidant system induced by sub-chronic exposure to microcystin-LR in mice: its relation to liver lipid composition. *Toxicon*. 2010; 55:333-42.
19. Lagos N, Onodera H, Zagatto P, Andrinolo D, Azevedo S and Oshima Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*. 1999; 37: 1359-1373.
20. Pereira P, Onodera H, Andrinolo y cols. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacteria *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon*. 2000; 38: 1689-1702.
21. Negri A, Jones G, Hindmarsh M. Paralytic Shellfish toxins produced by the fresh water cyanobacteria *Aphanizomenon flos aqua* NH-5. *Toxicon*. 1995; 24:175-186.
22. Andrinolo D, Santinelli N, Otaño S, Sastre V. and Lagos N. Paralytic shellfish toxins in mussels and *Alexandrium tamarense* at Valdes Peninsula, Chubut, Patagonia Argentina: Kinetic of a natural depuration. *Journal Shellfish Research*. 1999,18: 203-209.
23. Schantz E, Ghazarossian E, Schones K and Strong F. The Structure of Saxitoxin. *Journal of the American Chemical Society*. 1975; 97:1238 -1239.
24. Oshima Y. Post column Derivatization Liquid Chromatographic Method for Paralytic Shellfish Toxins. *Journal of AOAC International*. 1995; 78: 528-532.
25. Andrinolo D, Michea L and Lagos N. Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP) in cats. *Toxicon*. 1999; 37: 447-464.
26. Lagos N, Andrinolo D. Paralytic Shellfish Poisoning (SPS): Toxicology and Kinetics. In: "Seafood Toxicity: Mode of Action, Pharmacology and Physiology". Eds. Luis M. Botana. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA. 2000; 203-216.
27. Borinson H, Culp W, Gonsalves F, McCarthy L. Central respiratory and circulatory depression caused by intravascular saxitoxin. *Br. J. Pharmacol.* 1980; 68: 301-309.
28. Andrinolo D, Iglesias V, García C. y Lagos N. Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicon*. 2002; 40: 699-709.
29. Gorham PJ, McLachlan J, Hammer UT, Kim W.K. Isolation and toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (lyngb.) de Breb. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 1964; XV, 796-804.
30. Devlin J, Edwards OE, Gorham PR, Hunter N, Pike RK, Stavric B. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Can. J. Chem.* 1977; 55:1367-1371.
31. Carmichael WW, Jones C, Mahmood A, Theiss C. Algal toxins and water-based diseases. In *CRC critical reviews in environmental control*. 1985. Vol. 15, issue 3. CRC Press Inc., Cleveland, OH, pp. 275-313.
32. Spivak C, Albuquerque E. Dynamic properties of the nicotinic acetylcholine receptor ionic channel complex: Activation and Blockade. In: *Progress in Cholinergic Biology: Model Cholinergic Synapses*. I. Hanin and A.M. Goldberg, Ed. Raven Press, New York, NY. 1982; p. 323-357.
33. Fawell JK, Mitchell RE, Hill ED, Everett D. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Hum. Exp. Toxicol.* 1999, 18(3):168-173.
34. Astrachan N, Archer BG, Hilbelink DR. Evaluation of the subacute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon*. 1980; 18(5-6):684-688.
35. Hawkins PR, Chandrasena NR, Jones GJ, Humpage AR, Falconer, IR. Isolation and toxicity of *cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon*. 1997; 35: 341-346.
36. Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC. Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*. 1992; 114: 7941-7942.
37. Griffiths DJ, Saber ML. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin, *Environ. Toxicol.* 2003; 18: 78-93.
38. Froscio S, Humpage A, Burcham PC, Falconer IR. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology*. 2003; 18 (4): 243-251.

39. Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada KI. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicol.* 1994; 32: 833-843.
40. Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Ge JL, Lu SC. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 201: 235-241.
41. Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ Toxicol.* 2003; 18: 94-103.
42. Shaw GR, Seawright A, Moore M.R. Toxicology and human health implications of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. In: *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium*, W.J. Dekoe, R.A. Samson, H.P. van Egmond et al., Ed. IUPAC & AOAC International, Brazil, 2001. p. 435-443.
43. Metcalf JS, Barakate A, Codd G. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiology Letters.* 2004; 235:125–129.
44. Vasas G, Gaspar G, Suranyi G, y cols. Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test blue-green sinapis test, *Anal. Biochem.* 2002; 302: 95–103
45. Rasmussen J, Froscio S, Cursaro M, Saint C. An examination of the antibiotic effects of cylindrospermopsin on common Gram positive and Gram negative bacteria and the protozoan *Naegleria lovaniensis*. *Environ. Toxicol.* 2008; 3: 36-43.
46. Cox P, Banack S, Murch S. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:13380-13383.
47. Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102(14):5074-5078.