

# Alteración de biomarcadores de estrés oxidativo en *Tilapia (Oreochromis niloticus)* expuesta a dosis repetidas de Cilindrospermopsina por diferentes vías de exposición

Ríos MV, Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Moreno IM, Cameán AM\*

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González 2, 41012 Sevilla. España

Recibido 26 de septiembre de 2013 / Aceptado 22 de diciembre de 2013

**Resumen:** Las cianobacterias tienen capacidad de sintetizar una gran variedad de metabolitos secundarios, identificándose entre ellos la Cilindrospermopsina (CYN), toxina principalmente citotóxica. En general, la exposición a esta molécula se caracteriza por una toxicidad tardía sobre múltiples órganos, principalmente hígado y riñón. Se han sugerido varios mecanismos de acción tóxica: inhibición de la síntesis de proteínas y de glutatión y más recientemente el estrés oxidativo. El objetivo del presente estudio fue investigar la influencia del tiempo y de la vía de exposición sobre la inducción de estrés oxidativo como mecanismo de acción tóxica asociado a la patogenicidad de CYN, en pescados de consumo público, Tilapias (*Oreochromis niloticus*), expuestas a dosis repetidas de la toxina mediante inmersión en biomasa de *Aphanizomenon ovalisporum* o por vía oral con células liofilizadas de *A. ovalisporum* durante tres períodos de 7, 14 y 21 días. Los biomarcadores ensayados en hígado y riñón de los peces fueron: peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, oxidación del ADN, las actividades glutatión-S-transferasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa  $\gamma$ -glutamilcisteín sintetasa, y la relación glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG). Se observó una inducción de estrés oxidativo en hígado y riñón de las tilapias expuestas a dosis repetidas de CYN, manifestado por una alteración en los niveles de peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y de ADN, así como en las actividades de las enzimas antioxidantes estudiadas y en los niveles de glutatión a lo largo de los tres períodos de exposición. En general, las alteraciones más significativas se observaron en tilapias expuestas a CYN por inmersión en biomasa de *A. ovalisporum* durante un período de 21 días, demostrándose así que estos efectos se ven influenciados por la vía y el tiempo de exposición.

**Palabras claves:** Cilindrospermopsina, tilapia, estrés oxidativo, dosis repetidas

**Abstract:** Alteration of oxidative stress biomarkers in *Tilapia (Oreochromis niloticus)* exposed to repeated doses of *Cylindrospermopsin* by different exposure routes. Cyanobacteria are able to synthesize a large variety of secondary metabolites, including *Cylindrospermopsin* (CYN), a mainly cytotoxic toxin. In general, exposure to this molecule is characterized by late toxicity on multiple organs, mainly liver and kidney. Several mechanisms of action have been suggested; as inhibition of protein and glutathione synthesis and more recently oxidative stress. The aim of this study was to investigate the influence of time and route of exposure on the induction of oxidative stress as a mechanism of toxic action associated with CYN pathogenicity in public-consumed fish exposed to repeated doses of CYN by immersion, containing a culture of *A. ovalisporum* or orally with lyophilized cells of *Aphanizomenon*

*ovalisporum* for three periods of exposure: 7, 14 and 21 days. Fish biomarkers tested in liver and kidney were: lipid peroxidation, protein oxidation, DNA oxidation, activities glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, and glutathione reduced/glutathione oxidized ratio. An induction of oxidative stress was observed in liver and kidney of tilapia fishes exposed to repeated doses of CYN. Alterations in lipid peroxidation levels, protein and DNA oxidation process, as well as in the activity of the studied antioxidant enzymes and glutathione levels for all three periods of exposure tested, were observed. In general, the most significant changes were observed in tilapias exposed to CYN by immersion in a CYN-containing culture of *A. ovalisporum* over 21 days, thus demonstrating that these effects are influenced by the route and time of exposure.

**Keywords:** *Cylindrospermopsin*, tilapia, oxidative stress, repeated doses.

## Introducción

La proliferación de floraciones de cianobacterias se ha observado en aguas continentales y salobres de todo el mundo como consecuencia del aumento de la eutrofización de las mismas [1-3] y probablemente influenciada en gran medida por el cambio climático [4].

Las cianobacterias tienen capacidad de sintetizar una gran variedad de metabolitos secundarios, identificándose algunos de ellos como cianotoxinas [5], entre las que se encuentra la Cilindrospermopsina (CYN). Esta toxina estructuralmente es un alcaloide que contiene un grupo guanidino tricíclico combinado con un grupo hidroximetiluracilo [6], que puede ser producida por diferentes géneros de cianobacterias como *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Umezakia* y *Lyngbya* [7,8]. Además, CYN es un ión híbrido y estable en diferentes condiciones de calor, luz y pH [9], altamente soluble en agua y tiene un peso molecular relativamente bajo de 415 Daltons [10].

La exposición humana a CYN puede ocurrir durante la práctica de actividades recreativas en lagos, embalses y ríos, a través de la ingesta de agua contaminada. También se puede dar a través del consumo de alimentos contaminados con CYN, bien por productos agrícolas regados con aguas que contienen la toxina, o bien pescados, mariscos y otros alimentos de origen acuático previamente expuestos a CYN en su medio natural [11].

CYN es principalmente citotóxica y, en general, la exposición a esta toxina se caracteriza por presentar una toxicidad tardía sobre múltiples órganos, principalmente hígado y riñón. Varios estudios han confirmado que la CYN causa daños histopatológicos en diferentes órganos de mamíferos [12] y peces [13,14]. En seres

\* e-mail: : camean/us.es

humanos, el primer episodio de intoxicación documentado por ingesta de agua contaminada con CYN fue en Palm Island, Australia (1979), donde se registraron 148 casos de hepatoenteritis, acompañado de daño tubular renal [15-17].

Debido a la toxicidad de CYN, y teniendo en cuenta los estudios de toxicidad aguda realizados en ratón, se ha establecido un valor de ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,03 µg CYN/kg/d. Además la OMS está estudiando establecer un valor guía en aguas para esta toxina, siendo el valor propuesto de 1 µg/L [18].

Con el fin de explicar la patogenicidad de CYN se han sugerido varios mecanismos de acción tóxica, siendo el principal la inhibición de la síntesis de proteínas [19,20] y de glutatión [21,22], así como la genotoxicidad por la fragmentación de ADN [23] y más recientemente el estrés oxidativo demostrado por estudios *in vivo* e *in vitro* realizados en peces [24-26]. Estos ensayos mostraron daños en distintos órganos de tilapias después de una exposición aguda a CYN pura (>95%). Por otra parte, hay estudios que sugieren que los extractos de células y, por tanto, las floraciones de cianobacterias productoras de CYN, son susceptibles de contener uno o más compuestos bioactivos distintos de CYN, aumentando el riesgo de efectos tóxicos [27]. Por otro lado, son muy escasos los estudios de toxicidad crónica de CYN realizados en peces, existiendo hasta la fecha sólo un ensayo de toxicidad subcrónica en tilapias expuestas por inmersión a células liofilizadas de *A. ovalisporum* (productora de CYN) donde las alteraciones en los parámetros de estrés oxidativo estudiados fueron más acusadas con el aumento de la concentración de toxina y dependientes del tiempo de exposición [28]. Sin embargo, el mecanismo de acción tóxica de CYN aún no se ha esclarecido completamente y se requiere de la realización de nuevas investigaciones, especialmente en organismos acuáticos, con el fin de poder explicar las diferencias en la toxicidad de CYN mostrada con el tiempo, así como en relación con la vía de exposición [13].

Por otra parte, diferentes estudios han demostrado la capacidad que tiene CYN para bioacumularse en animales acuáticos expuestos por diferentes vías [27]. Estos estudios se han realizado en una gran variedad de organismos invertebrados y vertebrados, tanto a escala de laboratorio como en animales recogidos en masas de aguas contaminadas con cianobacterias, incluyendo los caracoles *Melanoides tuberculata* [29] y Tegogolos [30]; el mejillón *Anodonta* [31]; el cangrejo de río *Cherax* [32] y los renacuajos *Bufo marinus* [33]. Por todo esto, es importante la realización de estudios sobre los efectos tóxicos que la bioacumulación de CYN produce en esta amplia diversidad de especies [27].

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue investigar la influencia del tiempo y de la vía de exposición sobre la inducción de estrés oxidativo como mecanismo de acción tóxica asociado a la patogenicidad de CYN en peces de consumo público expuestos a dosis repetidas de la toxina. Para ello, un total de setenta y dos tilapias (*Oreochromis niloticus*) fueron expuestas a dosis repetidas de CYN mediante la administración cada dos días de biomasa de *Aphanizomenon ovalisporum* por inmersión (10 µg CYN/L), o de células liofilizadas de *A. ovalisporum* por vía oral (30 µg CYN/pez), durante tres períodos de tratamiento diferentes (7, 14 y 21 días). Los biomarcadores ensayados en hígado y riñón de los peces fueron: peroxidación lipídica (LPO), oxidación de proteínas, oxidación del ADN, las actividades enzimáticas de glutatión-S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT),  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa (GCS) y la relación glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG). Por otra parte, se llevaron a cabo

determinaciones de CYN en muestras de agua tomadas de los acuarios.

## Materiales y métodos

### Productos químicos

El estándar de CYN pura (pureza >95%) fue suministrado por Alexis Corporation (Lausen, Suiza). Todos los disolventes empleados fueron de grado analítico (metanol, diclorometano, ácido fórmico y ácido trifluoroacético (TFA)), adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). Los productos químicos para los diferentes ensayos fueron proporcionados por Sigma-Aldrich, VWR International Eurolab y laboratorios BioRad. El agua desionizada (resistividad >18 mΩ cm<sup>-1</sup>) se obtuvo a partir de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, EE.UU.). Los cartuchos de carbon BON ELUT® (500 mg, 6 ml) fueron suministrados por Agilent Technologies (Países Bajos).

### Cultivo de *Aphanizomenon ovalisporum*

La cepa de *Aphanizomenon ovalisporum* (LEGE X-001) productora de CYN (CYN+) se aisló del Lago Kinneret, Israel [34] y fue amablemente suministrada por el Dr. Vitor Vasconcelos, Director del Centro de Investigaciones Marinas (Oporto, Portugal). Un cultivo de esta cepa se mantuvo en medio Z8 a 25°C bajo iluminación continua de intensidad 28 µmoles fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> proporcionada por tubos blancos fluorescentes. Pasados 33 días, los cultivos se recogieron por decantación con una red de plancton (20 µm de diámetro). La biomasa obtenida se separó en dos porciones que se congelaron a -80°C. Posteriormente, una de las porciones de la biomasa (~300 mL) se liofilizó durante 48 horas en un liofilizador modelo Cryodos-80 de la marca Telstar, en sus condiciones óptimas de trabajo (0,075 mba y -80°C).

### Cuantificación de la CYN producida por *Aphanizomenon ovalisporum* (LEGE X-001)

La extracción de CYN, tanto del cultivo (biomasa) como de las células liofilizadas de *A. ovalisporum* (CYN+), se llevó a cabo según el método de Guzmán-Guillén y col. [35]. Brevemente, la extracción se realizó a partir de 14 mg de material (liofilizado o biomasa) con 3 mL de agua, tras dos períodos de 15 minutos de sonicado y una hora de agitación entre ambos. Posteriormente la muestra se centrifuga (4500 rpm, 10 min) y se recoge el sobrenadante al que se le añaden 6 µL de ácido trifluoroacético 0,1%. La purificación del extracto se lleva a cabo con cartuchos de grafito (Bond Eluts 500 mg, 6mL), los cuales se activan con 10 mL de una mezcla de diclorometano-metanol (10/90) más 10 mL de agua milliQ, justo antes de pasar la muestra. Posteriormente, el cartucho se lava con 10 mL de agua milliQ y se eluye con 10 mL de diclorometano-metanol (10/90). El extracto se evapora a sequedad y se resuspende en 500 µL de agua milliQ.

La determinación de CYN se realizó usando un sistema de HPLC Perkin Elmer Serie 200 (Wellesley, EE.UU.) acoplado a un sistema de triple cuadrúpolo lineal QTRAP MS/MS de Applied Biosystems (Foster City, EE.UU.) y una fuente de iones ESI en modo positivo. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna de Zorbax SB-AQ (150 x 2,1 mm). El flujo empleado fue de 0,2 ml min<sup>-1</sup> utilizando un gradiente binario de agua (A), y metanol (B): 0% de B (1 min), hasta 90% de B (10 min), 90% de B (5 min) y, finalmente, 0% de B (5 min). Ambos componentes contenían TFA al 0,05% (v/v). El volumen de inyección fue de 20 µL. La Monitorización de Reacción Múltiple (MRM) se aplicó en los iones precursores y fragmentados,

monitorizados a Q1 y Q3, respectivamente. Las transiciones para la detección de CYN fueron: 416,2/194,0; 416,2/274,0; 416,2/336,0 y 416,2/175,9. La transición 416,2/194,0 fue elegida para la cuantificación de CYN, por ser la mayoritaria y la que mayor sensibilidad presentaba. Para los análisis de LC-MS/MS, el espectrómetro de masas fue ajustado para una óptima calibración de los siguientes parámetros: 35 psi de cortina de gas, 60 psi de fuente de gas, 5500 V de pulverización iónica, y la temperatura Turboprobe se mantuvo a 350°C. El tiempo de retención fue de 7,55 min. La concentración obtenida de CYN fue de 0,072 g CYN/mg de biomasa y de 2,14 g CYN/mg de células liofilizadas.

#### Condiciones experimentales

Para llevar a cabo nuestros estudios se utilizaron setenta y dos machos de *Oreochromis niloticus* (tilapia del Nilo, Perciformes: Cichlidae). Fueron adquiridos a la empresa "Valenciana de Acuicultura" y una vez alcanzados los 20 ±4 g de peso y 8 ± 2 cm de longitud, se introdujeron en acuarios (8 individuos/acuario) con 96 litros de agua libre de cloro. Los acuarios contaban con un sistema continuo de filtración de agua y de aireación (cartuchos de Eheim Libertad 150 y Bio-espumador), manteniéndose una temperatura constante de 21 ± 2°C. Los valores de oxígeno disuelto se mantuvieron entre 6,5 y 7,5 mg/L. Los valores medios de los parámetros adicionales de la calidad del agua fueron: pH 7,6 ± 0,3, conductividad 287 µS/cm, Ca<sup>2+</sup> 0,60 mM/L y Mg<sup>2+</sup> 0,3 mM/L. Los peces se alimentaron con comida comercial de peces (ciprínidos, 2 mm, Dibaq, Segovia, España) y se aclimataron durante 15 días antes del comienzo del experimento.

#### Exposición experimental

Tras el período de aclimatación, se establecieron nueve grupos experimentales de 8 peces (*Oreochromis niloticus*) cada uno (Tabla 1). Las tilapias fueron expuestas a dosis repetidas de CYN, mediante la administración cada dos días de biomasa del cultivo por inmersión (10 µg CYN/L) o de células liofilizadas de *A. ovalisporum* (CYN+) por vía oral (30 µg CYN/pez) durante tres períodos diferentes (7, 14 y 21 días). Las dosis de CYN fueron seleccionadas en base a experimentos previos realizados en esta misma especie de pez donde una dosis subcrónica de 10 ó 100 µg CYN/L administrada por inmersión mostró inducción de estrés oxidativo y daño histopatológico en diferentes órganos [28,36].

Los peces de los grupos control (grupos 1, 4 y 7) fueron alimentados diariamente con comida comercial para peces durante 7, 14 y 21 días, respectivamente; no se expusieron a la toxina y se utilizaron como controles de los diferentes períodos de exposición a CYN. Las tilapias expuestas a la biomasa de cultivo CYN+ por inmersión (grupos 2, 5 y 8) fueron alimentadas de manera similar y se expusieron a CYN cada dos días añadiendo el volumen necesario de biomasa para alcanzar la dosis requerida de la toxina directamente a los acuarios durante 7, 14 y 21 días, respectivamente. Por otra parte, las tilapias expuestas a células liofilizadas de *A. ovalisporum* por vía oral (grupos 3, 6 y 9) fueron alimentadas durante 7, 14 y 21 días con una mezcla de pienso para peces y células liofilizadas previamente triturada en mortero con el fin de romper las células y producir la liberación de la toxina. Con este homogenizado resultante se elaboraron pequeñas esferas (pellets) con las que se alimentaron los peces [37]. Este procedimiento se asemeja al tipo de exposición que puede darse en la naturaleza cuando una floración de cianobacterias sufre un proceso de lisis celular, liberando su contenido de CYN al exterior. Se aseguró que todos los pellets fueran ingeridos por los peces mediante observación visual en un intervalo de una hora. La cantidad de alimento comercial para peces administrada por pez fue de 0,3 g/día.

Una vez finalizada la administración de la toxina cada dos días por inmersión o por vía oral, los grupos de peces fueron sacrificados a los 7, 14 y 21 días, como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Diferentes escenarios de exposición de *Oreochromis niloticus* mediante inmersión en biomasa o mediante vía oral con células liofilizadas de *A. ovalisporum* (CYN+)

|                       |                         | Grupos de exposición |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|-------------------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Período de exposición | Escenario de exposición | 1                    | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 7 días                | Biomasa                 | -                    | + | - | - | - | - | - | - | - |
|                       | Células liofilizadas    | -                    | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 14 días               | Biomasa                 | -                    | - | - | - | + | - | - | - | - |
|                       | Células liofilizadas    | -                    | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 21 días               | Biomasa                 | -                    | - | - | - | - | - | - | + | - |
|                       | Células liofilizadas    | -                    | - | - | - | - | - | - | - | + |

CYN+ = Células conteniendo Cilindrospermopsina

#### Evaluación de la CYN en el agua de los acuarios

Se controlaron los niveles de CYN en los acuarios recogiendo 200 mL de agua/acuario, cada dos días, a lo largo de los tres períodos de exposición.

La determinación de CYN se llevó a cabo utilizando el método validado de Guzmán-Guillén y col. [38] mediante LC-MS/MS. Brevemente, las muestras de agua fueron sometidas a dos ciclos de congelación-descongelación, en combinación con 15 min de sonicación y 15 min de agitación. Posteriormente las muestras se centrifugaron (4500 rpm, 15 min) y filtraron a través de filtros de fibra de cristal (45 mm). Los extractos fueron purificados a través de cartuchos de carbón Bond Elut (500 mg; Varian), los cuales fueron activados con una mezcla de diclorometano:metanol (10:90, v/v) acidificado con 5% de ácido fórmico seguido de 10 mL de agua milliQ. Posteriormente, se pasó la muestra y se lavó la columna con 10 mL de agua milliQ, eluyéndose el extracto con 10 mL de diclorometano:metanol (10:90, v/v). El extracto se llevó a sequedad y se resuspendió en 250 µL de agua milliQ. La determinación de CYN se realizó usando un sistema de HPLC Perkin Elmer Serie 200 (Wellesley, EE.UU.) acoplado a un sistema de triple cuadrupolo lineal QTRAP MS/MS de Applied Biosystems (Foster City, EE.UU.) y una fuente de iones ESI en modo positivo (ver apartado 2.3).

#### Preparación del sobrenadante postmitocondrial

Los peces se sacrificaron por transección de la médula espinal, previamente anestesiados con hielo. El hígado y el riñón fueron extraídos, pesados y enjuagados con solución salina, y se mantuvieron a -80°C hasta su posterior uso. Los extractos enzimáticos de cada tejido se prepararon a partir de cada pez de acuerdo con el método descrito por Puerto y col. [39]. Brevemente, los tejidos fueron homogenizados usando tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 6.5) conteniendo un 20% (v/v) de glicerol, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético, y 1,4 mM ditioeritritol. Tras eliminación de los restos celulares (10 min, 4000 rpm), la fracción membranosa fue separada por centrifugación a 10000 rpm durante 60 min. El sobrenadante resultante, que se corresponde con la fracción soluble postmitocondrial (citosol) es la empleada para la posterior determinación de los parámetros de estrés oxidativo.

#### Peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y de ADN

Los productos fruto de la peroxidación lipídica se cuantificaron por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) [40] con ligeras modificaciones [37]. Para ello al homogeneizado se le añadió una disolución de BHT al 1% en ácido acético glacial, SDS al 8%, ácido acético al 20% y una disolución al 0,8% de ATB. Tras calentar 30 minutos a 95°C las muestras, éstas se centrifugan durante 10 minutos a 4.000 rpm, se recoge la fase superior y se leen las absorbancias a 532 nm en el espectrofotómetro (Cary100, Varian, Madrid, España). Los valores se expresan como nmol de TBARS/g de tejido.

La cuantificación de los grupos carbonilos derivados de la oxidación de las proteínas se realizó mediante el método descrito por Levine y col. [41], adaptado por Atencio y col. [42]. Brevemente, al homogeneizado de la muestra se le adiciona DNPH 10 mM y se agita cada 15 min durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añade ácido tricloroacético al 20% y se centrifuga. Se lava el precipitado 3 veces con ácido acético-etanol 1:1 y se le añade una disolución de guanidina 6 M. Se incuban a temperatura ambiente hasta el día siguiente, y se mide la absorbancia del sobrenadante a 366 nm. Los resultados se expresan como nmoles de grupos carbonilos/mg de proteína.

Para la oxidación del ADN se utilizó el Kit OxiSelect™ de cuantificación del daño oxidativo del ADN (sitios AP) (Cells Biolabs, Inc, San Diego, CA, EE.UU.), siguiendo el protocolo de Gutiérrez-Praena y col. [24]. Los resultados se expresan como sitios apurínicos/apirimidínicos (AP) por 100,000 pares de bases.

#### *Enzimas antioxidantes*

La actividad de la glutatión-S-transferasa (GST; EC 2.5.1.18) se midió en los homogeneizados de hígado y riñón de acuerdo con el método descrito por Habig y col. [43], mediante la monitorización a 340 nm de un conjugado formado entre GSH 16 mM y 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) 16 mM. Para ello se mezcla el homogeneizado con tampón fosfato 0,2 M, CDBN 16,4 mM y GSH 16,4 mM.

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) se midió siguiendo la tasa de oxidación del NADPH a 340 nm por la reacción acoplada con glutatión reductasa [26,44]. Al homogeneizado se añaden tampón GPx, NADPH, redisolución de GSH, agua, y GR, disparando la reacción añadiéndole H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se mide la cinética cada veinte segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

La actividad total de la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) se determinó por el método de McCord y Fridovich [45] con modificaciones [46]. Al homogeneizado diluido se le añaden tampón SOD, agua milliQ, xantina, cianuro potásico 50 mM y 100 µL de citocromo C. La reacción se dispara añadiéndole xantina oxidasa, midiéndose espectrofotométricamente la actividad de la enzima a 505 nm.

La actividad catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) se ensayó midiendo la tasa inicial de descomposición del peróxido de hidrógeno (10 mM) a 240 nm [47]. En concreto, al homogeneizado se le añade tampón fosfato y agua milliQ. Posteriormente se añaden 600 µL de peróxido de hidrógeno y se mide la cinética a intervalos de 20 segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

La  $\gamma$ -glutamilcisteín sintetasa (EC 6.3.2.2.) (GCS), enzima limitante en la síntesis de GSH, se midió utilizando el método descrito por Seelig y Meister [48], adaptado a las muestras de peces [24]. La formación de ADP se monitorizó espectrofotométricamente tras un doble ensayo con piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa. La mezcla de reacción consiste en tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8,2),

L-glutamato sódico (10 mM), l- $\alpha$ -aminobutirato (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (20 mM), Na<sub>2</sub>ATP (5 mM), fosfoenolpiruvato sódico (2 mM), KCl (150 mM), NADH (0,2 mM), piruvato quinasa (5 unidades), lactato deshidrogenasa (10 unidades) y el homogeneizado. La cinética se monitoriza a 340 nm.

Los resultados de todas estas actividades enzimáticas se expresaron como nkat/mg de proteínas.

#### *Parámetros antioxidantes no enzimáticos: relación GSH/GSSG*

La relación GSH/GSSG se determinó en homogeneizados de hígado y de riñón utilizando un kit comercial (Bioxytech GSH/GSSH-412, Oxis Investigación, Foster City, CA, EE.UU.) adaptado para tejidos de peces [42]. En concreto, una mezcla de 50 µL de homogeneizado diluido y 350 µL de MPA al 5%, se centrifuga a 4°C, recogiendo 50 µL del sobrenadante al que se le añade el tampón de ensayo. De aquí se toman 200 µL que se mezclan con DTNB y GR. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se añaden 200 µL de NADPH para disparar la reacción y se mide a 412 nm cada 20 segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

#### *Estimación de proteínas*

El contenido de proteínas en las muestras se estimó mediante el método de Bradford [49] usando  $\gamma$ -globulina bovina como estándar. Brevemente, 5 µL de las muestras diluidas se mezclaron con 95 µL de H<sub>2</sub>O y 5 mL de colorante azul brillante de Coomassie (BioRad Laboratories, Hercules, EE.UU.) y se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro (Cary100, Varian, Madrid, España).

#### *Análisis estadístico*

Todos los resultados se sometieron a un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), representando la media  $\pm$  la desviación estándar (SD) de 8 animales por grupo. Las diferencias en los valores medios entre grupos se evaluaron mediante el test de Tukey y se consideraron estadísticamente significativos a partir de  $p < 0,05$ .

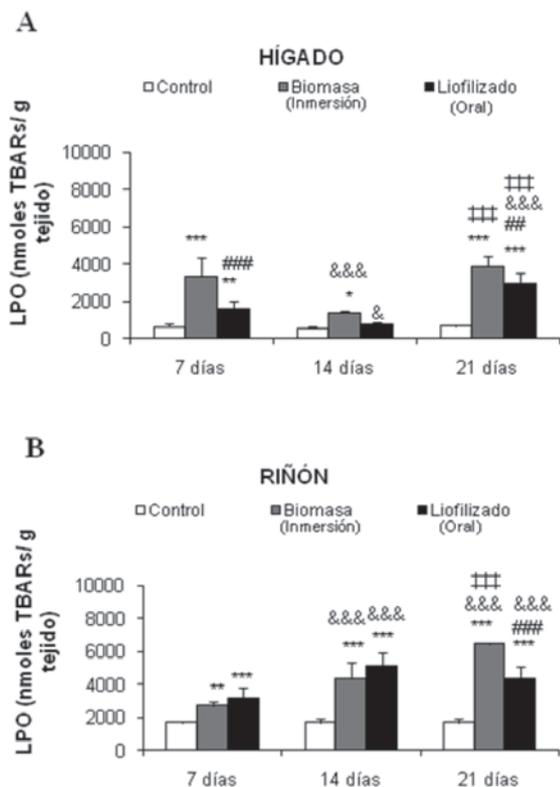
## Resultados

No se presentaron alteraciones visuales ni mortalidad en ninguno de los peces durante la realización del experimento, en las diferentes condiciones de exposición a CYN.

#### *Efectos sobre la oxidación de lípidos, proteínas y ADN*

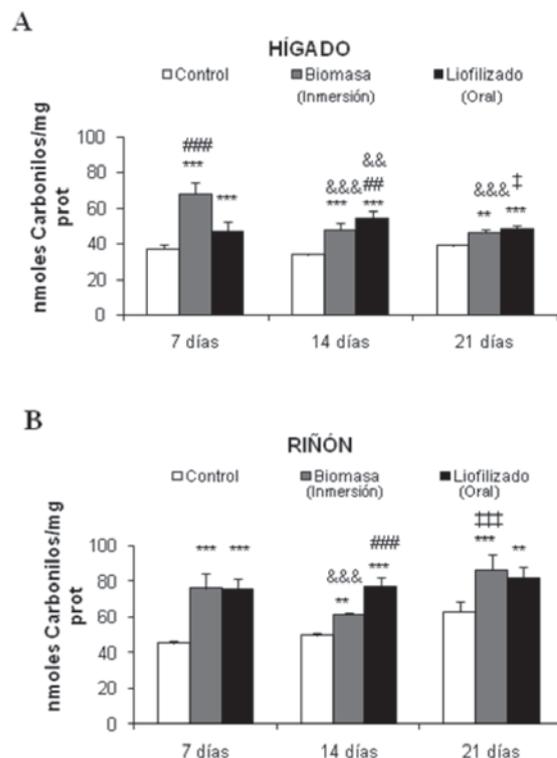
Los valores de LPO aumentaron significativamente en hígado de los peces expuestos a la biomasa de *A. ovalisporum* en comparación con sus respectivos grupos control tras 7, 14 y 21 días de exposición en un orden de 5,4; 2,5 y 5,9 veces, respectivamente (Figura 1A). Se observó también un aumento significativo en este parámetro en hígado de los peces expuestos a células liofilizadas de *A. ovalisporum* durante 7 días (2,5 veces) y 21 días (4,4 veces) con respecto a sus controles. Además, en estos períodos, hubo diferencias significativas según la vía de administración, mostrándose mayores alteraciones en los peces expuestos por inmersión a la biomasa frente a la vía oral mediante células liofilizadas de *A. ovalisporum*. Por otra parte, se mostraron diferencias significativas entre los tres períodos de exposición, siendo tras 21 días cuando se observó un mayor incremento de LPO en los peces expuestos por ambas vías. En el riñón (Figura 1B), se observó una inducción significativa de LPO en peces expuestos a CYN tanto por inmersión como por vía oral comparado con sus respectivos grupos control, oscilando este aumento entre 1,6 y 3,8 veces, tras los tres períodos de exposición ensayados. Además, los valores de LPO mostraron diferencias

significativas entre los grupos expuestos por diferentes vías de exposición tras 21 días, siendo 2,5 veces mayor en peces expuestos por inmersión a la biomasa frente a los alimentados con células liofilizadas de *A. ovalisporum*. En general, se observó asimismo un aumento significativo en los peces expuestos a CYN a lo largo del tiempo (21 días frente a 14 y 7 días).



**Figura 1.** Peroxidación lipídica (LPO) (nmol TBARS/g tejido) en hígado (A) y riñón (B) de peces expuestos a dosis repetidas de CYN (10 µg CYN/L, añadida al acuario cada dos días) mediante inmersión en biomasa y por vía oral con células liofilizadas de *A. ovalisporum*, por tres periodos (7, 14 y 21 días). Los valores se expresan como media SD (n=8). Los niveles de significación observados fueron \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 en comparación con su respectivo grupo control; ## p<0,01, ### p<0,001 comparando grupos expuestos a biomasa y grupos expuestos a células liofilizadas de *A. ovalisporum* por el mismo periodo de tiempo; & p<0,05, && p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 7 días; ††† p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 14 días.

Con respecto a la oxidación de proteínas, se produjo un aumento significativo en el hígado de los peces expuestos tanto por inmersión a la biomasa como por vía oral a células liofilizadas de *A. ovalisporum* en comparación con sus respectivos grupos control, para los tres periodos de exposición (Figura 2A). Por otra parte, se observó un aumento significativo de 1,5 veces de los niveles de carbonilos en el hígado de los peces expuestos durante 7 días por inmersión frente a la vía oral. De forma similar que en hígado, se observó un aumento significativo de la oxidación de las proteínas en el riñón de los peces expuestos a CYN por ambas vías y durante los tres periodos de exposición en comparación con sus respectivos grupos control. Además, este parámetro mostró un mayor aumento a nivel renal tras 21 días de exposición mediante inmersión en la biomasa de *A. ovalisporum* (Figura 2B).



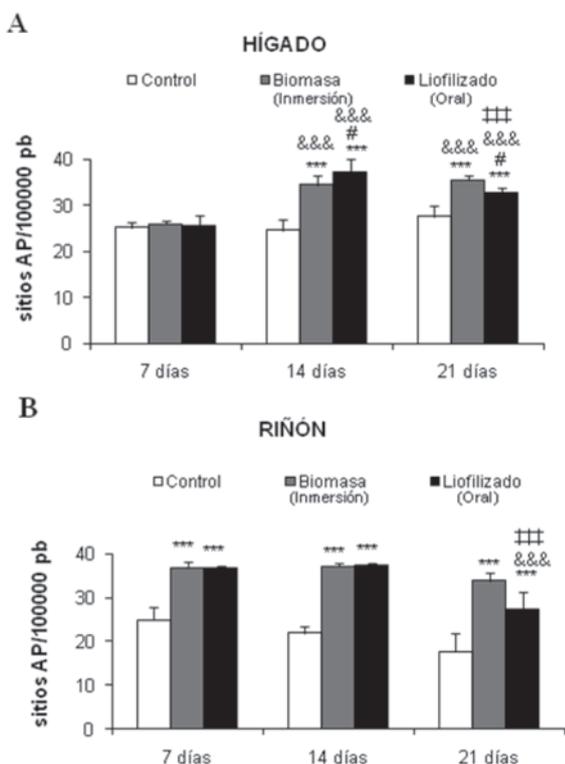
**Figura 2.** Oxidación de proteínas (nmol carbonilos/mg proteínas) en hígado (A) y riñón (B) de peces expuestos a dosis repetidas de CYN (10 µg CYN/L, añadida al acuario cada dos días) mediante inmersión en biomasa y por vía oral con células liofilizadas de *A. ovalisporum*, por tres periodos (7, 14 y 21 días). Los valores se expresan como media SD (n=8). Los niveles de significación observados fueron \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 en comparación con su respectivo grupo control; ## p<0,01, ### p<0,001 comparando grupos expuestos a biomasa y grupos expuestos a células liofilizadas de *A. ovalisporum* por el mismo periodo de tiempo; && p<0,01, &&& p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 7 días; † p<0,05, ††† p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 14 días.

No se encontraron cambios significativos en la oxidación del ADN en el hígado de los peces expuestos a CYN tras un periodo de 7 días por ninguna de las vías de administración en comparación con su grupo control (Figura 3A). Sin embargo, se observó un aumento significativo en los grupos expuestos por ambas vías (inmersión y oral) a CYN durante 14 y 21 días en comparación con sus respectivos grupos control. En general, se observa para este parámetro una tendencia de aumento frente al tiempo (14 y 21 días frente a 7 días de exposición). Por el contrario, en el riñón la oxidación del ADN mostró un aumento significativo desde los 7 hasta los 14 días de exposición (del orden de 1,5-1,9 veces) en todos los grupos de peces expuestos a CYN tanto por inmersión como por vía oral en comparación con sus grupos control. Además, en este órgano se observó una disminución significativa de la oxidación de ADN con respecto al tiempo (21 días frente a 14 y 7 días) solamente en los peces expuestos por vía oral a células liofilizadas de *A. ovalisporum* (Figura 3B).

#### Efectos sobre la actividad de enzimas antioxidantes

En general, la actividad enzimática GST se mostró disminuida en el hígado de los peces expuestos a CYN tanto por inmersión (1,5-2,0 veces) como por vía oral (1,3-2,1 veces) durante 7, 14 y 21 días,

respecto a sus grupos control (Figura 4A). En el riñón de los peces expuestos durante 7 días sólo se observó una disminución significativa (1,3 veces) con la administración por vía oral de células liofilizadas de *A. ovalisporum* en comparación con su grupo control. Por el contrario, sí se observó una disminución significativa de la actividad GST (1,5-3,3 veces) por ambas vías de administración tras 14 y 21 días de exposición, en comparación con sus respectivos grupos control. En general, en ambos órganos de peces expuestos por ambas vías se produjo una disminución significativa en esta actividad enzimática frente al tiempo (21 días frente a 14 y 7 días), observándose además diferencias significativas entre los grupos expuestos por distintas vías para los periodos de 7 y 14 días.



**Figura 3.** Oxidación del ADN (sitios AP/100000 pb) en hígado (A) y riñón (B) de peces expuestos a dosis repetidas de CYN (10 µg CYN/L, añadida al acuario cada dos días) mediante inmersión en biomasa y por vía oral con células liofilizadas de *A. ovalisporum*, por tres periodos (7, 14 y 21 días). Los valores se expresan como media SD (n=8). Los niveles de significación observados fueron \*\*\* p<0,001 en comparación con su respectivo grupo control; # p<0,05 comparando grupos expuestos a biomasa y grupos expuestos a células liofilizadas de *A. ovalisporum* por el mismo periodo de tiempo; &&& p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 7 días; ††† p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 14 días.

Con respecto a la actividad GPx, en el caso del hígado sólo se observó un aumento significativo tras la exposición de los peces a la toxina durante 7 días por ambas vías en comparación con su grupo control, produciéndose además, un aumento significativo entre ambas formas de exposición, inmersión frente a la vía oral (Figura 4B). Sin embargo, en el riñón, esta actividad enzimática experimentó un aumento en todos los grupos de peces expuestos a CYN, independientemente de la vía y del periodo de exposición.

En cuanto a la actividad de la SOD, la respuesta observada en hígado

y riñón fue contrapuesta; aumentando significativamente en hígado y disminuyendo en riñón, de forma significativa en todos los grupos expuestos (por ambas vías y durante los tres periodos de exposición) (Figura 5A). Sólo se observó un aumento más acusado en hígado de peces expuestos por vía oral a células liofilizadas frente a los expuestos por inmersión en biomasa tras un periodo de ensayo de 14 días.

Se observó un aumento significativo de la actividad CAT, en ambos órganos estudiados, de los peces expuestos a CYN tanto por inmersión (1,6 veces en el hígado y 2,7 veces en el riñón) como por vía oral (1,2 veces en el hígado y 2,6 veces en el riñón) en comparación con su grupo control para el periodo de 7 días (Figura 5B). Sin embargo, tras periodos mayores (14 y 21 días) se observó una disminución significativa de este parámetro. En hígado se observó un mayor aumento de la actividad CAT en los peces expuestos durante 7 días a la biomasa (inmersión) frente a las células liofilizadas de *A. ovalisporum* (vía oral).

La actividad γ-GCS experimentó un aumento significativo en el hígado de los peces expuestos por inmersión (3,3, 5,7 y 7,8 veces) y por vía oral (2,5, 6,7 y 5,3 veces) en comparación con sus grupos control, siendo además este aumento tiempo-dependiente (Figura 6A). En riñón se observa una situación similar, aunque en este caso el aumento parece constante e independiente del tiempo de exposición (aumentó 5,0; 4,0 y 3,8 veces en peces expuestos a la biomasa, y 5,5, 4,7 y 4,9 veces en peces expuestos al liofilizado de *A. ovalisporum*).

*Efectos sobre el balance GSH/GSSG*

Para todos los periodos de exposición (7, 14 y 21 días), la relación GSH/GSSG se vio disminuida significativamente tanto en hígado como en riñón de los peces expuestos por inmersión en la biomasa y por vía oral, en comparación con sus respectivos grupos control (Figura 6B). Además, en ambos órganos se observó un mayor agotamiento de GSH/GSSG en peces expuestos a CYN por vía oral con respecto a los expuestos por inmersión en biomasa durante un periodo de 14 días. Por otro lado, en el hígado esta disminución se mostró tiempo-dependiente (21 y 14 días frente a 7 días).

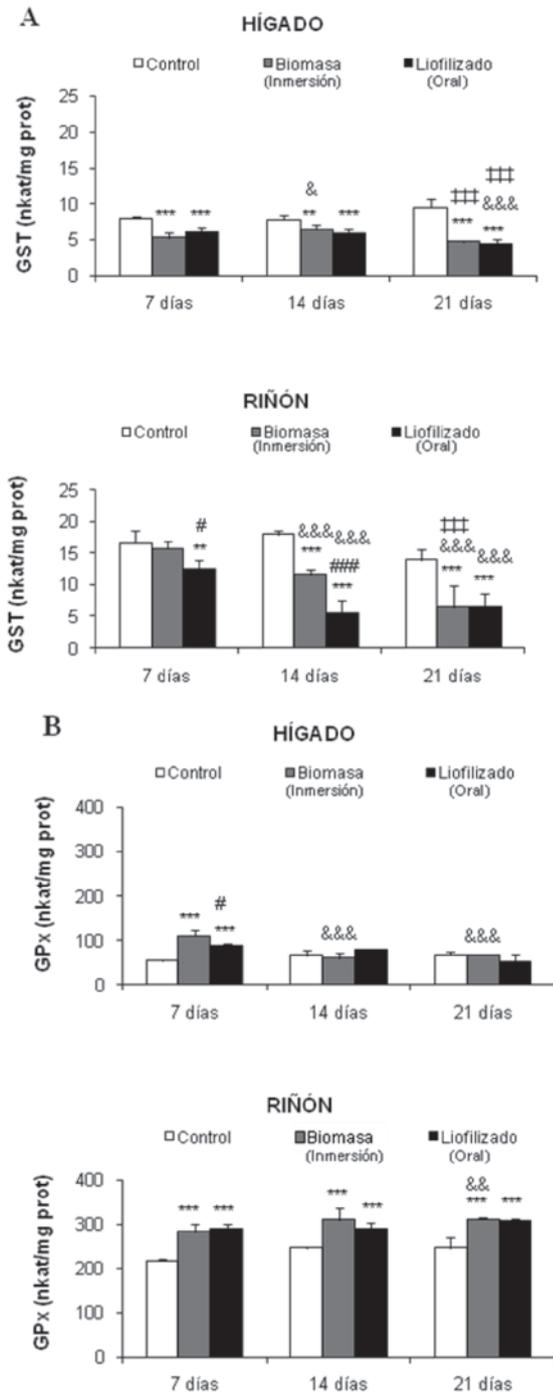
*Evaluación de CYN en el agua de los acuarios*

Se detectó CYN en todas las muestras de agua tomadas de los acuarios de peces expuestos a la toxina, para todas las vías de administración y los tres periodos de tiempo ensayados. En general, las concentraciones de CYN en los acuarios con liofilizado de células de *A. ovalisporum* fueron superiores a los detectados en los acuarios con biomasa (1,1-2,9 veces) (Tabla 2).

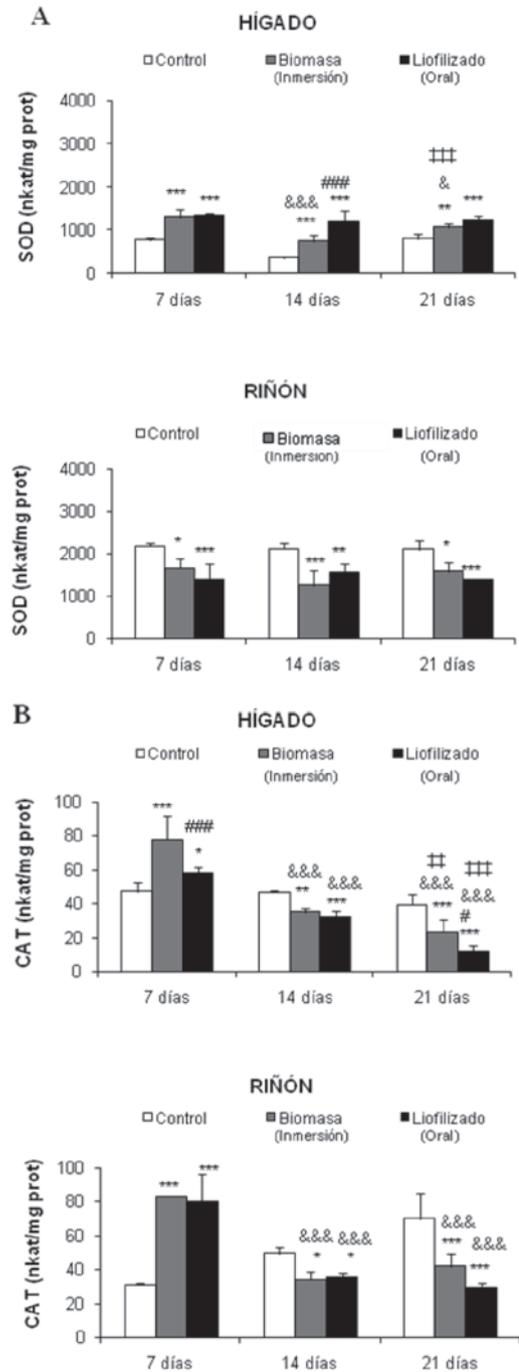
No se detectó CYN en las muestras de agua de los acuarios control.

**Tabla 2.** Concentración de *Cilindrospermopsis* (CYN, µg/L) en el agua de los acuarios (96 L) adicionados con 10 µg CYN/L cada dos días mediante biomasa y células liofilizadas de *A. ovalisporum*.

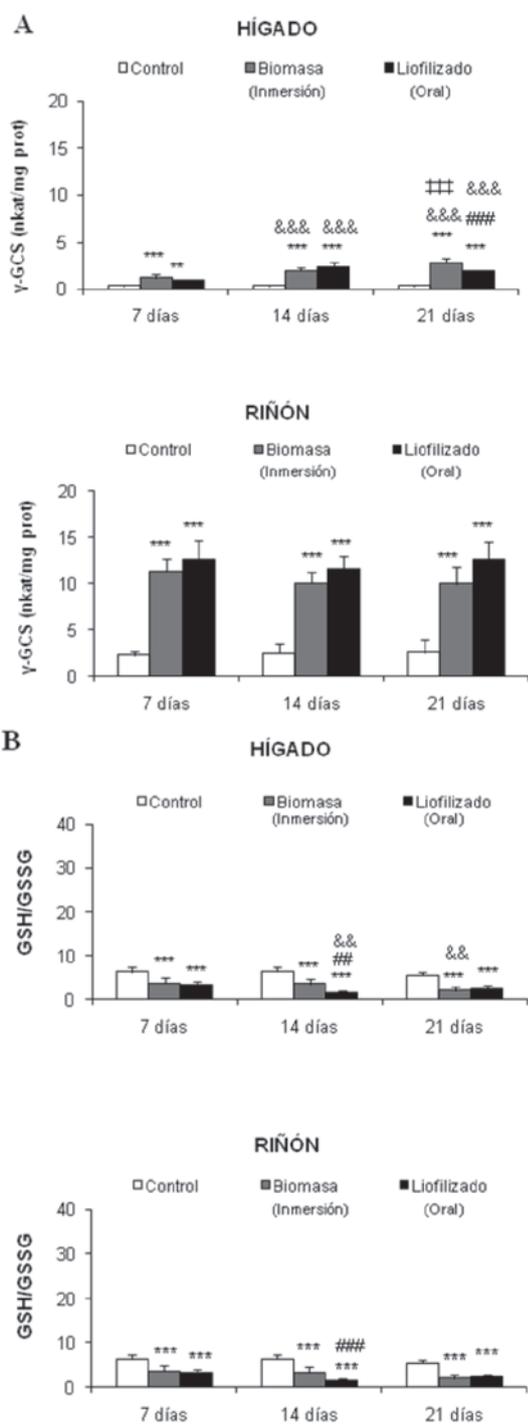
|                         |           | Día de recogida de agua de los acuarios |            |            |            |            |            |            |            |  |
|-------------------------|-----------|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|
| Escenario de exposición | 0         | 2                                       | 4          | 6          | 8          | 10         | 14         | 18         | 22         |  |
| Biomasa                 | 4,2 ± 0,3 | 11,2 ± 0,0                              | 19,9 ± 0,1 | 21,1 ± 0,1 | 12,5 ± 0,2 | 39,3 ± 0,2 | 45,9 ± 0,5 | 52,0 ± 1,4 | 75,3 ± 1,8 |  |
| Células liofilizadas    | 8,9 ± 0,5 | 12,4 ± 0,1                              | 24,8 ± 0,4 | 30,3 ± 1,1 | 36,0 ± 1,6 | 51,8 ± 0,4 | 57,8 ± 1,1 | 72,8 ± 1,1 | 93,0 ± 0,0 |  |



**Figura 4.** Actividades Glutación-S-transferasa (GST) (A) y Glutación peroxidasa (GPx) (B) (nkat/mg proteínas) en hígado y riñón de peces expuestos a dosis repetidas de CYN (10 µg CYN/L, añadida al acuario cada dos días) mediante inmersión en biomasa y por vía oral con células liofilizadas de *A. ovalisporum*, por tres periodos (7, 14 y 21 días). Los valores se expresan como media SD (n=8). Los niveles de significación observados fueron \* p<0,01, \*\*\* p<0,001 en comparación con su respectivo grupo control; # p<0,05, ### p<0,001 comparando grupos expuestos a biomasa y grupos expuestos a células liofilizadas de *A. ovalisporum* por el mismo periodo de tiempo; & p<0,05, && p<0,01, &&& p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 7 días; ††† p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 14 días.



**Figura 5.** Actividades Superóxido dismutasa (SOD) (A) y Catalasa (CAT) (B) (nkat/mg proteínas) en hígado y riñón de peces expuestos a dosis repetidas de CYN (10 µg CYN/L, añadida al acuario cada dos días) mediante inmersión en biomasa y por vía oral con células liofilizadas de *A. ovalisporum*, por tres periodos (7, 14 y 21 días). Los valores se expresan como media SD (n=8). Los niveles de significación observados fueron \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 en comparación con su respectivo grupo control; # p<0,05, ### p<0,001 comparando grupos expuestos a biomasa y grupos expuestos a células liofilizadas de *A. ovalisporum* por el mismo periodo de tiempo; & p<0,05, && p<0,01, &&& p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 7 días; ††† p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 14 días.



**Figura 6.** Actividad Gamma-glutamilcisteína-sintetasa ( $\gamma$ -GCS) (A) (nkat/mg proteínas) y balance glutatión reducido-glutatión oxidado (GSH/GSSG) (B) en hígado y riñón de peces expuestos a dosis repetidas de CYN (10  $\mu$ g CYN/L, añadida al acuario cada dos días) mediante inmersión en biomasa y por vía oral con células liofilizadas de *A. ovalisporum*, por tres periodos (7, 14 y 21 días). Los valores se expresan como media SD (n=8). Los niveles de significación observados fueron \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 en comparación con su respectivo grupo control; ## p<0,01, ### p<0,001 comparando grupos expuestos a biomasa y grupos expuestos a células liofilizadas de *A. ovalisporum* por el mismo periodo de tiempo; && p<0,01, &&& p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 7 días; ††† p<0,001 comparado con el grupo expuesto mediante la misma vía de administración por 14 días.

## Discusión

La exposición a toxinas producidas por floraciones de cianobacterias a través del consumo de alimentos es un hecho conocido y de creciente preocupación para la salud humana y medioambiental [50]. El potencial de bioacumulación de toxinas cianobacterianas en los organismos acuáticos y/o plantas que posteriormente pueden ser consumidos por los seres humanos aumenta el riesgo de intoxicaciones. Las cianotoxinas pueden acumularse en peces a través de diferentes vías: por ingesta directa del fitoplancton, por captación de la cianotoxina disuelta a través del epitelio (branquias, piel), o a través de la cadena alimentaria. Generalmente se cree que la vía oral es la más importante [51] y la acumulación de cianotoxinas suele depender del tiempo de exposición [52-54].

En concreto, los estudios sobre los efectos tóxicos de CYN en peces son escasos y, además, el potencial de bioacumulación de esta toxina es poco conocido en comparación con otras cianotoxinas, como las MCs [55]. Por otra parte, es probable que exista una relación directa entre la acumulación de toxinas y la peligrosidad de los efectos tóxicos producidos por éstas. Este es el primer trabajo que hasta la fecha estudia la influencia de la vía y el tiempo de exposición sobre los efectos de células de *A. ovalisporum* que contienen CYN en los biomarcadores de estrés oxidativo, utilizando tilapias como modelo experimental.

En el presente estudio se observó un aumento de LPO en hígado y riñón con influencia de la vía y el tiempo de exposición, mostrándose mayores alteraciones en los peces expuestos a la biomasa de *A. ovalisporum* por inmersión durante 21 días. Varios estudios realizados en tilapias expuestas a CYN han mostrado un aumento significativo de este parámetro en ambos órganos. En concreto, Puerto y col. [26] demostraron que la LPO aumentó de manera dosis-dependiente en hígado y riñón de tilapias expuestas a CYN pura por sonda de forma aguda a 200 y 400  $\mu$ g CYN/kg de peso corporal. Por otra parte, Gutiérrez-Praena y col. [24] observaron un aumento significativo en este parámetro en hígado y riñón de tilapias por exposición aguda a 200  $\mu$ g CYN pura/kg por sonda o inyección intraperitoneal y sacrificadas a las 24 horas y a los 5 días, aunque no detectaron diferencias significativas entre las distintas vías y tiempos de exposición. Por el contrario, nuestros resultados muestran diferencias significativas entre ambas vías y tiempos de exposición. Esto podría ser debido a que en nuestro ensayo se administran células de cianobacterias (en biomasa o liofilizadas) que además de CYN incluyen compuestos bioactivos que podrían propiciar la asimilación de la toxina mejor por una vía que por otra, en comparación con ensayos realizados con CYN pura. La presencia de estos compuestos bioactivos en floraciones productoras de CYN ha sido documentada por diferentes autores [56-57] y discutida por Kinneer y col. [58]. Es necesario llevar a cabo estudios con anticuerpos para comprobar si estos compuestos aún sin identificar podrían ser análogos de CYN [59].

Guzmán-Guillén y col. [28] en tilapias expuestas por inmersión a la biomasa de *A. ovalisporum* (10 y 100  $\mu$ g CYN/L) de forma subcrónica (7 y 14 días) mostraron que la LPO aumentó significativamente en el hígado de los peces tratados con ambas dosis sólo para un periodo de exposición de 14 días, mientras que en el riñón este parámetro aumentó significativamente en los peces tratados con la dosis más alta de CYN después de ambos periodos.

Se observaron aumentos significativos en el nivel de oxidación de proteínas tanto en el hígado como en el riñón de los peces expuestos a *A. ovalisporum* por inmersión y por vía oral para todos los periodos de

exposición (7, 14 y 21 días). La oxidación de proteínas se mostró más elevada en los hígados de peces expuestos a CYN por inmersión durante 7 días, sin embargo en el riñón este aumento se observó por vía oral durante 21 días, confirmando la influencia de la vía y el tiempo de exposición en ambos órganos. De acuerdo con estos resultados, Guzmán-Guillén y col. [28] mostraron un aumento significativo de este parámetro en hígado y riñón de tilapias expuestas por inmersión a células de *A. ovalisporum* (100 µg CYN/L) durante 14 días. En ambos órganos, se demostró que estos aumentos estaban influidos por la concentración de CYN y el tiempo de exposición. Por otra parte, Puerto y col. [26] señalan al riñón como el órgano en el que más incrementó la oxidación de proteínas en peces expuestos de forma aguda a CYN pura (200 y 400 µg/kg de peso corporal) por sonda nasogástrica. Asimismo, otros estudios mostraron que la vía de exposición (sonda nasogástrica o inyección ip) influye sobre este biomarcador en el riñón de peces expuestos de forma aguda a 200 µg CYN pura/kg y sacrificados a las 24 horas y a los 5 días [24].

Con respecto a la oxidación del ADN, se observa un aumento significativo en hígado y riñón de los peces expuestos a CYN por ambas vías estudiadas. Mientras que en el hígado estos cambios se produjeron tras 14 días, en el riñón se inducen de forma más temprana, a los 7 días de exposición a toxina, poniendo de manifiesto la mayor susceptibilidad del riñón. Estos resultados, están de acuerdo con estudios recientes llevados a cabo en peces expuestos por inmersión de forma subcrónica a células de cianobacterias (10 ó 100 µg CYN/L) durante 7 y 14 días que demostraron que el riñón era el órgano que más se afectaba [28].

La GST cataliza la conjugación de GSH con centros electrofílicos de gran variedad de sustratos, ayudando a detoxicar compuestos endógenos como los lípidos peroxidados [60], y a eliminar xenobióticos. En general, la actividad GST mostró una disminución en hígado y riñón de los peces expuestos a la biomasa y a las células liofilizadas de *A. ovalisporum* durante 7, 14 y 21 días de exposición, observándose diferencias significativas frente al tiempo (21 días frente a 14 y 7 días). Por el contrario, Puerto y col. [26] observaron un aumento en la actividad de esta enzima en ambos órganos de tilapia después de la exposición a 200 µg CYN pura/kg, sugiriendo que tal vez este efecto necesite más de 24 h para ser observado *in vivo* o que las concentraciones de CYN disponibles en ambos órganos no eran lo suficientemente altas como para inhibir la traducción de la proteína en el proceso de síntesis de GST. En general, la disminución de la actividad GST en hígado y riñón en este trabajo podrían indicar que el mecanismo de detoxificación de lípidos peroxidados, proteínas y ADN oxidados no se estaría llevando a cabo por la ruta de conjugación con GSH o, por otra parte, que la actividad enzimática GST no está implicada en el metabolismo de CYN.

La función de GPx es reducir los hidroperóxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes, y el peróxido de hidrógeno a agua. El aumento de los productos de peroxidación lipídica observado en ambos órganos con el tiempo concuerda con el incremento en la actividad GPx en el hígado (después de 7 días) y en el riñón (a lo largo de los tres períodos de exposición) de los peces expuestos a CYN mediante biomasa y células liofilizadas de *A. ovalisporum*. El hecho de que la actividad GPx se mantenga aumentada a lo largo de los tres períodos de exposición en el riñón, confirma la mayor sensibilidad de este órgano tras largos períodos de exposición. De forma similar, Guzmán-Guillén y col. [28] no hallaron cambios en esta actividad enzimática en hígado de peces expuestos de forma subcrónica a CYN por inmersión durante 7 y 14 días, observándose además un aumento significativo en el riñón para ambos períodos. Por otro lado, en el

presente estudio, esta actividad enzimática se mostró más afectada en hígado de peces expuestos a la toxina por inmersión en biomasa, que por vía oral con células liofilizadas de *A. ovalisporum*.

SOD y CAT son componentes críticos del sistema enzimático de defensa antioxidante, proporcionando la primera defensa contra la toxicidad de las especies reactivas del oxígeno (ERO) [42]. La SOD cataliza la dismutación del radical superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, que es a su vez detoxificado por la CAT. Por lo general, suele darse una inducción simultánea en las actividades de ambas enzimas tras exposición a contaminantes, entre los que se encuentran las células de cianobacterias que contienen MCs [37, 61]. En el presente estudio se demuestra una mayor sensibilidad del riñón, donde la disminución observada en la actividad SOD durante todos los períodos estudiados podría explicarse por una destrucción enzimática, mientras que en el hígado se ve aumentada, ya que es un órgano con mayor capacidad de detoxificación. De esta forma, el mayor aumento en la actividad SOD en hígado tras la exposición por vía oral a células liofilizadas frente a la inmersión en biomasa podría explicar los menores niveles de oxidación en lípidos, proteínas y ADN observados. Para ambos órganos estudiados, la actividad CAT muestra diferentes respuestas a lo largo del tiempo. Inicialmente, experimenta un aumento significativo en peces expuestos a CYN (mayor en el caso de la biomasa) para disminuir posteriormente tras 14 días de exposición, relacionándose con el aumento del daño oxidativo (LPO, oxidación de proteínas y de ADN). Tanto CAT como GPx actúan intentando eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno y, además, GPx también se encarga de contrarrestar otros hidroperóxidos. Ambas enzimas parecen estar más activas tratando de controlar los radicales de oxígeno tras 7 días de exposición a CYN.

El aumento en la actividad  $\gamma$ -GCS, enzima limitante en la síntesis de GSH, junto con el agotamiento de GSH/GSSG observado tanto en hígado como en riñón, señalan como mecanismo predominante en la eliminación de ERO la reducción con GSH. Por otra parte, en el hígado de los peces expuestos a CYN este parámetro se vio influenciado por el tiempo (21 y 14 días frente a 7 días) y la vía de exposición (inmersión comparada con vía oral). Guzmán-Guillén y col. [28], observaron un aumento en la actividad de esta enzima, aumentando principalmente en el riñón de tilapias expuestas de forma subcrónica a CYN durante 7 y 14 días. Por el contrario, Runnegar y col. [21] postularon que el mecanismo principal para la disminución de GSH en hepatocitos de rata era la inhibición de su síntesis. Según Gutiérrez-Praena y col. [24] se observa una reducción significativa en la actividad de la enzima  $\gamma$ -GCS en tilapias expuestas de forma aguda a CYN por vía oral o inyección ip., sacrificadas a las 24 horas, aunque no hubo cambios significativos en los peces sacrificados a los 5 días. Esto indicaría que una única dosis más alta de CYN pura administrada puede dañar las enzimas, mientras que dosis más bajas de células de cianobacterias (equivalente a 10 ó 100 µg CYN/L), administradas por un período de tiempo más largo, pueden inducir una respuesta defensiva [28].

El balance GSH/GSSG se vio disminuido tras los tres períodos de exposición en hígado y riñón de los peces expuestos a CYN por ambas vías estudiadas. Aún así, se observó un mayor agotamiento en el hígado frente al tiempo. De forma similar, Guzmán-Guillén y col. [28] observaron una disminución en la relación GSH/GSSG en hígado y riñón de peces expuestos a células de cianobacterias (10 ó 100 µg CYN/L) durante 7 y 14 días, con mayores cambios en el hígado tras 14 días de exposición, mientras que en el riñón hubo una recuperación significativa después de 14 días frente a 7 días. Investigaciones llevadas a cabo por Norris y col. [62] en ratón

sugirieron que era poco probable que el agotamiento de GSH, ya sea por conjugación con CYN o por inhibición de su síntesis, fuera el principal mecanismo de toxicidad hepática de CYN, considerando al citocromo P450 fundamental en su patogenicidad.

## Conclusión

Se ha observado la inducción de estrés oxidativo en hígado y riñón de tilapias expuestas a dosis repetidas de CYN mediante inmersión en biomasa de *A. ovalisporum* o por vía oral con células liofilizadas de *A. ovalisporum*, según las alteraciones observadas en los niveles de LPO, oxidación de proteínas y de ADN, así como en las actividades de las enzimas antioxidantes estudiadas (GST, GPx, SOD, CAT, y  $\gamma$ -GCS) y en los niveles de GSH a lo largo de los tres periodos de exposición. Además, se ha demostrado que estos efectos se ven influenciados por la vía y el tiempo de exposición.

En general, las alteraciones más significativas se observaron en tilapias expuestas a CYN por inmersión en biomasa de *A. ovalisporum* durante un periodo de 21 días. Se pone de manifiesto la necesidad de realizar más estudios para poder entender la relación existente entre los efectos tóxicos de CYN y la concentración de esta toxina en el medio acuático y en tejidos de peces.

## Agradecimientos

Los autores quisieran agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación (CICYT, AGL2009-10026AL) y a la Junta de Andalucía (P09-AGR-4672) por la financiación del presente estudio, así como al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la beca "Formación Profesorado Universitario (FPU)" concedida a Remedios Guzmán Guillén.

## Referencias

1. Quesada A, Moreno E, Carrasco D, Paniagua T, Wormer L, De Hoyos C, Sukenik A (2006) Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur J Phycol* 41: 39-45.
2. Fathaili A, Jenhani ABR, Moreira C, Saker M, Romdhane M, Vasconcelos V (2010) First observation of the potentially toxic and invasive cyanobacterium species *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) in Tunisian freshwaters: toxicity assessment and molecular characterization. *Fresenius Environ Bull* 19: 1074-1083.
3. Messineo V, Melchiorre S, Di Corcia A, Gallo P, Bruno M (2010) Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic Lake Albano, Central Italy. *Environ Toxicol* 25: 18-27.
4. Paerl HW, Huisman J (2009) Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ Microbiol Rep* 1: 27-37.
5. Bláha L, Babica P, Maršálek B (2010) Toxins produced in cyanobacterial water blooms— toxicity and risks. *Interdisc Toxicol* 2: 36-41.
6. Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC (1992) Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green

algae *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* 114: 794.

7. Padiśák J (1997) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch Hydrobiol* 4: 563-593; Supplement 107 (Monographic Studies).
8. Rucker J, Stüken A, Nixdorf B, Fastner J, Chorus I, Wiedner C (2007) Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. *Toxicol* 50: 800-809.
9. Chiswell RK, Shaw GR, Eaglesham G, Smith MJ, Norris RL, Seawright AA, Moore MR (1999) Stability of cylindrospermopsin, the toxin from cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environ Toxicol* 14: 155-161.
10. 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*. WHO and E & FN Spon. London. pp. 41-112.
11. Thomas AD, Saker ML, Norton JH, Olsen RD (1998) Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northern Queensland. *Aust Vet J* 76: 592-594.
12. Falconer IR, Humpage AR (2006) Cyanobacterial (Blue-green Algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. *Environ Toxicol* 21: 299-304.
13. Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Moyano R, Blanco A, Monterde JG, Cameán AM (2012) Time-dependent histopathological changes induced in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after acute exposure to pure cylindrospermopsin by oral route and intraperitoneal route. *Ecotox Environ Safe* 76: 102-113.
14. Puerto M, Jos A, Pichardo S, Moyano R, Blanco A, Cameán AM (2012) Acute exposure to pure Cylindrospermopsin results in oxidative stress and pathological alterations in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol*, in press. DOI 10.1002/tox.21764.
15. Byth S (1980) Palm Island mystery disease. *The Medical Journal of Australia* 2: 40-42.
16. Bourke ATC, Hawes RB, Neilson A, Stallman ND (1983) An outbreak of hepatoenteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicol Supplement* 3: 45-48.
17. Hawkins PR, Runnegar MT, Jackson A, Falconer IR (1985) Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ Microb* 50: 1292-1295.
18. Humpage AR, Falconer IR (2003) 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. *Environ Toxicol* 18: 94-103.
19. Runnegar MT, Xie C, Snider BB, Wallace GA, Weinreb SM, Kuhlenkamp J (2002) *In vitro* hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related

- synthetic analogues. *Toxicol Sci* 67: 81-87.
20. Frosco SM, Humpage AR, Bucham PC, Falconer IR (2003) *Cylindrospermopsin*-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol* 18: 243-251.
  21. Runnegar MT, Kong S, Zhong YA, Lu SC (1995) Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid *cylindrospermopsin* in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 49: 219-225.
  22. Humpage AR, Fontaine F, Frosco S, Burcham P, Falconer IR (2005) *Cylindrospermopsin* genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A* 68: 739-753.
  23. Žegura B, Gajski G, Straser A, Garaj-Vrhovac V (2011) *Cylindrospermopsin* induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. *Toxicol* 58: 471-479.
  24. Gutiérrez-Praena D, Jos MA, Pichardo S, Cameán AM (2011a) Oxidative stress responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a single dose of pure *cylindrospermopsin* under laboratory condition: Influence of exposure route and time of sacrifice. *Aquat Toxicol* 105: 100-106.
  25. Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos MA, Cameán AM (2011b) Toxicity and glutathione implication in effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure *Cylindrospermopsin*. *Ecotoxicol Environ Safety* 74: 1567-1572.
  26. Puerto M, Jos MA, Pichardo S, Gutiérrez-Praena D, Cameán AM (2011) Acute effects of pure *Cylindrospermopsin* on the activity and transcription of antioxidant enzymes in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed by gavage. *Ecotoxicology* 20: 1852-1860.
  27. Kinnear S (2010) *Cylindrospermopsin*: A decade of progress on bioaccumulation research. *Mar Drugs* 8: 542-564.
  28. Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Vasconcelos VM, Cameán AM (2013a) Cyanobacterium producing *Cylindrospermopsin* cause oxidative stress at environmentally relevant concentrations in sub-chronically exposed Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere* 90: 1184-94.
  29. White SH, Duivenvoorden LJ, Fabbro LD, Eaglesham GK (2006) Influence of intracellular toxin concentration on *cylindrospermopsin* bioaccumulation in a freshwater gastropod (*Melanoides tuberculata*). *Toxicol* 47: 497-509.
  30. Berry JP, Lind O (2010) First evidence of "paralytic shellfish toxins" and *cylindrospermopsin* in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco., and apparent bioaccumulation of the toxins in "teogolo" snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicol* 55: 930-983.
  31. Saker ML, Metcalf JS, Codd GA, Vasconcelos VM (2004) Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin *cylindrospermopsin* in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicol* 42: 185-194.
  32. Saker ML, Eaglesham GK (1999) The accumulation of *cylindrospermopsin* from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicol* 37: 1065-1077.
  33. White SH, Duivenvoorden LJ, Fabbro LD, Eaglesham GK (2007) Mortality and toxin bioaccumulation in *Bufo marinus* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* cell extracts and live cultures. *Environ Pollut* 147: 158-167.
  34. Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A (1997) Identification of *cylindrospermopsin* in *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J Phycol* 33: 613-616.
  35. Guzmán-Guillén R, Prieto Ortega AI, Moreno I, González AG, Soria-Díaz ME, Vasconcelos V, Cameán AM (2012a) Development and optimization of a method for the determination of *Cylindrospermopsin* from strains of *Aphanizomenon* cultures: intra-laboratory assessment of its accuracy by using validation standards. *Talanta* 100: 356-363.
  36. Guzmán-Guillén R, Prieto A I, Moreno I, Vasconcelos VM, Moyano R, Blanco A. Cameán AM (2013b) Cyanobacterium producing *Cylindrospermopsin* cause histopathological changes at environmentally relevant concentrations in sub-chronically exposed Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol DOI* 10.1002/tox.21904.
  37. Jos A, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vázquez CM, Moreno I, Cameán AM (2005) Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol* 72: 261-271.
  38. Guzmán-Guillén R, Prieto AI, González AG, Soria-Díaz ME, Cameán AM (2012b) *Cylindrospermopsin* determination in water by LC-MS/MS: Optimization and validation of the method and application to real samples. *Environ Toxicol Chem* 12: 1-6.
  39. Puerto M, Prieto AI, Pichardo S, Moreno I, Jos A, Moyano R, Cameán AM (2009) Effects of dietary N-acetylcysteine (NAC) on the oxidative stress induced in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Environ Toxicol Chem* 28: 1679-1686.
  40. Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonetal. *Meth Enzymol* 186: 407-421.
  41. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shatell S, Stadl ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Met Enzymol* 186: 464-478.
  42. Atencio L, Moreno I, Jos A, Pichardo S, Moyano R, Blanco A, Cameán AM (2008) Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to microcystin under laboratory conditions. *Toxicol* 52: 1-12.
  43. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
  44. Lawrence A, Burk RF (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 952-958.
  45. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
  46. Prieto AI, Pichardo S, Jos A, Moreno I, Cameán AM (2008) Protective role of vitamin E on the Microcystin-induced oxidative stress in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Environ*

- Toxicol Chem 27: 1152-1159.
47. Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195: 133-140.
  48. Seelig GF, Meister A (1985) Glutathione biosynthesis; - glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Meth Enzymol* 113: 379-392.
  49. 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.
  50. Ibelings BW, Chorus I (2007) Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environ Pollut* 150: 177-192.
  51. Ernst B, Hitzfeld BC, Dietrich DR (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.
  52. Vasconcelos VM (1995) Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 32: 227-237.
  53. Sipiä VO, Kankaanpää HT, Pflugmacher S, Flinkman J, Furey A, James KJ (2002) Bioaccumulation and Detoxication of Nodularin in Tissues of Flounder (*Platichthys flesus*), Mussels (*Mytilus edulis*, *Dreissena polymorpha*), and Clams (*Macoma balthica*) from the Northern Baltic Sea. *Ecotox Environ Safe* 53: 305-311.
  54. Ozawa K, Yokoyama A, Ishikawa K, Kumagai M, Watanabe MF, Park HD (2003) Accumulation and depuration of microcystin produced by the cyanobacterium *Microcystis* in a freshwater snail. *Limnology* 4: 131-138.
  55. Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Cameán AM (2013) Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food Chem Toxicol* 53: 139-152.
  56. Hawkins PR, Chandrasena NR, Jones GJ, Humpage AR, Falconer IR (1997) Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35: 341-346.
  57. Norris RL, Eaglesham G, Pierens G, Shaw G, Smith MJ, Chiswell RK, Seawright AA, Moore MR (1999) Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol* 14: 163-165.
  58. Kinnear SHW, Duivenvoorden LJ, Fabbro LD (2009) Ecotoxicity and bioaccumulation of toxin from *Cylindrospermopsis raciborskii*: towards the development of environmental protection guidelines for contaminated water bodies. In *Lake Pollution Research Progress*; Miranda FR, Bernards LM, Eds.; Nova Science Publishers, Inc.: New York, NY, USA, pp. 81-105.
  59. Pegram RA, Nichols T, Etheridge S, Humpage A, LeBlanc S, Love A, Neilan B, Pflugmacher S, Runnegar M, Thacker R (2008) Cyanotoxins workgroup report. In *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms State of the Science and Research Needs*; Hudnel HK, Ed.; Springer Press: New York, NY, USA; Volume 619, Chapter 15, pp. 317-381.
  60. Leaver MJ, George SG (1998) A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation. *Mar Environ Res* 46: 71-74.
  61. Prieto AI, Pichardo S, Jos A, Moreno I, 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. *Aquat Toxicol* 84: 337-345.
  62. Norris RL, Seawright AA, Shaw GR, Senogles P, Eaglesham GK, Smith MJ, Chiswell RK, Moore MR (2002) Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Toxicon* 40: 471-476.