

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata.

NÚCLEO DISCIPLINARIO: Productos Naturales Bioactivos y sus aplicaciones.

TÍTULO: ***DESARROLLO DE UN INDICADOR CUANTITATIVO PARA LA MEDICIÓN DE TOXINAS INHIBIDORAS DE PROTEÍNA FOSFATASA OBTENIDA DE RAÍZ DE SOJA.***

AUTOR: Letizia Bauzá.

CORREO ELECTRÓNICO DEL AUTOR: letiziabau@yahoo.com.ar

PALABRAS CLAVES: Cianotoxinas, fosfatasas, microcistinas.

Introducción:

La presencia de algas tóxicas en los cuerpos de agua dulce y marina se ha transformado en una creciente preocupación para los organismos de salud pública. La exposición a las toxinas producidas por estas algas se produce no solamente por la exposición al agua de consumo sino además por contacto e inhalación en lugares de recreación (Carmichael et al, 2001, Chorus et al, 1999). La posibilidad de detectar la presencia de estas toxinas y evitar la utilización de agua con contenidos elevados de toxinas constituye un objetivo prioritario en zonas como el noroeste del país y el delta bonaerense. Actualmente se sabe que algunas especies producen potentes toxinas, capaces de originar efectos agudos y crónicos en el hombre, en animales y vegetales. Se estima que más del 50% de estas floraciones son tóxicas. Las primeras intoxicaciones de poblaciones humanas por el consumo de agua contaminada por cepas tóxicas de cianobacterias, fueron descritas en Australia, Inglaterra, China y África del Sur. Las microcistinas actúan a nivel molecular inhibiendo ciertas enzimas denominadas genéricamente Fosfatasas (*Protein Phosphatases*, **PP**), en particular las formas PP1A y PP2A.

La detección de estas toxinas en agua se realiza mediante métodos laboriosos y costosos, siendo además métodos retrospectivos, es decir luego de la exposición (APHA, 1998, Mxolisi et al, 2007). Entre las diversas toxinas presentes en agua dulce, es necesario evaluar las nodularinas y microcistinas, existiendo al menos sesenta formas químicas de esta última siendo las denominadas LR, YR, y RR las detectadas con mayor frecuencia.

La OMS (Organización Mundial de la Salud) ha realizado evaluaciones con respecto al impacto de las microcistinas sobre la salud humana. Se ha concluido que no existe suficiente información para dictar normas que establezcan límites aceptables para microcistinas excepto para la variante LR, dejando como límite provisorio para agua potable 1µg/l (1 ppb) de microcistina-LR. Este valor es provisional, debido a la poca información disponible. Tanto el *Codex Alimentarius* como el *Código Alimentario Argentino* no hacen mención alguna sobre las microcistinas y sus valores admisibles en agua potable. Los límites australianos, país que se dedica intensivamente al estudio de problemas con cianobacterias en especial *Microcystis sp.*, determinan un máximo admitido es de 1,3 µg/l. Esta diferencia con el valor establecido por la OMS se debe a diferentes valores establecidos para el peso corporal estándar de 70 kg en Australia contra 60 Kg en otros

países.

Los métodos actualmente disponibles para su cuantificación incluyen métodos semicuantitativos como bioensayos en ratón, ELISA e inhibición de fosfatasas; así como métodos cuantitativos basados en la cromatografía líquida precedida por etapas de concentración en fase sólida y detección por arreglo de diodos o masa. Estos métodos son costosos y requieren de personal adecuadamente entrenado para su realización.

Los métodos bioanalíticos incluyen en la actualidad dos variantes: los métodos inmunológicos del tipo ELISA y aquellos basados en la inhibición de la actividad de las enzimas blanco de las toxinas, usualmente las formas PP1A y PP2A, las cuales son comercialmente disponibles en forma altamente purificada por proveedores como SIGMA&Co entre otras (Rapala et al, 2002).

Esta última clase de métodos presenta como desventaja que no permiten diferenciar la clase de toxinas presente, expresando el resultado como equivalente a microcistina LR. Su utilidad radica en que ambos métodos, inmunológicos y de inhibición, presentan la característica de no requerir etapas de pre-concentración manteniendo la sensibilidad por debajo del límite de la OMS (1ppb). Ambos métodos pueden considerarse un screening valioso, dado que pueden obtenerse resultados en menos de dos horas, cumpliendo el objetivo de no exponer a la población a niveles elevados de toxinas mientras se realizan métodos químicos más laboriosos. Los métodos bioanalíticos requieren menor infraestructura de equipamiento, si los comparamos con un método cromatográfico; a pesar de ello, los costos siguen siendo demasiado elevados en zonas de escaso desarrollo económico.

Por ello, resulta de interés el desarrollo de un ensayo de fácil empleo en zonas de riesgo de toxinas que afectan la salud pública. Debido a las complejidades del desarrollo de métodos inmunológicos se eligió a los métodos de inhibición de fosfatasas como los más adecuados, ya que, disponiendo de la enzima y el sustrato, pueden aplicarse en laboratorios de infraestructura instrumental mínima. Los métodos existentes utilizan fosfatasa de origen animal (hígado y riñón de mamífero, variantes expresadas en *E. coli*), implicando manejo de tejido animal, dificultades éticas y procesos de producción y extracción costosos (Dignam et al 1998, Szöör et al 1995). Usualmente la forma comercial obtenible suele ser la subunidad catalítica, la cual es funcional en ausencia de las subunidades regulatorias. Estas formas, sin embargo, son costosas, poco estables y de baja actividad según nuestra experiencia.

Objetivos:

El presente desarrollo tiene como objetivo la obtención de una fuente económicamente viable de proteína fosfatasa utilizable en la determinación cuantitativa de las microcistinas midiendo su inhibición. Las fosfatasas de origen vegetal no han sido utilizadas hasta la fecha, presentan las ventajas de una alta disponibilidad, bajo costo de la materia prima, equipamiento sencillo y elevado rendimiento final (Meek et al, 1999, Stubbs et al, 2001). Asimismo, la utilización de esta enzima debe permitir cumplir con los límites de sensibilidad impuestos por la OMS (1ppb).

La producción en nuestro laboratorio de esta enzima ha sido motivo de la patente en trámite **MÉTODO Y KIT PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TOXINAS INHIBIDORAS DE FOSFATASA**, presentada ante Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual, Patente de invención, (2008) N° 080101890 en trámite.

Materiales y métodos:

Descripción del proceso de aislamiento:

La fuente de proteína seleccionada es de origen vegetal, a partir de un tejido con bajo contenido de cloroplastos, taninos y polifenoles. Las radículas provenientes de semillas de soja (*Glycine max*) germinando en oscuridad ofrecen ventajas sobre las otras debido a su bajo costo, rápido crecimiento y fortaleza ante agentes ambientales y biológicos.

El proceso lleva los siguientes pasos: germinación, extracción, purificación, cuantificación de la actividad enzimática. Las etapas generales de la extracción se muestran en la **Fig.1**.

- **Germinación.**

Las semillas se desarrollan luego de un período de hidratación en una cama de arena húmeda a temperatura ambiente durante tres días o hasta obtener una longitud de radícula de 1,5 cm. Luego se separan las raíces de la arena y se lavan en agua corriente hasta eliminar la arena completamente.

- **Extracción.**

A las raíces lavadas se agrega arena (previamente lavada en ácido nítrico al 30 % y enjuagada en agua bidestilada hasta pH neutro) en mortero en una relación de 2 gramos de

raíz a 1 gramo de arena con el objeto de facilitar su disgregación en el mortero.

Para realizar la extracción, la proteína es liberada mediante homogenización en mortero con arena y buffer Tris 30 mM – EDTA 1mM – Mn (II) 0,1mM - β -mercaptoetanol 0,01% v/v, o-fenantrolina 1 mM, pH 7,2 en relación 2-3 volúmenes de buffer /g de raíz y PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo) 1mM como inhibidor de proteasas. Todo el procedimiento se realiza en baño de hielo y el homogenato se clarifica mediante centrifugación a 10000 g en una centrífuga a 4 °C durante 15 minutos.

El total del sobrenadante de la centrifugación se concentra mediante precipitación con sulfato de amonio sólido al 70% de saturación en baño de hielo durante una hora con agitación mecánica y monitoreo del pH manteniéndolo a pH 7 mediante el agregado de Tris sólido. Luego se centrifuga a 10000g a 4 °C durante 15 minutos de manera de obtener un precipitado. Este precipitado es resuspendido en cantidad suficiente de buffer imidazol 10mM – EDTA 1 mM y β - mercaptoetanol 0,01% v/v pH 7,2 y luego se agregan de tres a cinco volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente con el fin de disociar las subunidades catalíticas de la PP1A y PP2A y obtenerlas en forma soluble. Centrifugar a 10000g 4° C, 10 min. El sobrenadante se reserva para la purificación.

- **Purificación.**

La purificación se evalúa mediante una serie de ensayos de proteínas, como la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Electrophoresis in Practice, 2005). En cada etapa de la purificación se mide la actividad específica de las fosfatasa por ensayo colorimétrico (hidrólisis de p-nitrofenilfosfato) y ensayo de Bradford (proteínas totales) empleando albúmina de suero bovino como estándar de calibración (Bradford, 1976).

El sobrenadante obtenido en la extracción se siembra en una columna de cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sephacel 20 cm x 1cm, eluyendo con un gradiente de NaCl de 0 a 0,3 M en un buffer de imidazol – EDTA 1 mM - β - mercaptoetanol 0,01 % v/v - glicerol 10% pH 7,2. El eluato de la columna se monitorea midiendo la concentración de proteína total mediante método de Bradford anteriormente mencionado. Las fracciones conteniendo proteína son ensayadas para su actividad de fosfatasa y de su capacidad de inhibirse por la presencia de microcistina LR. El perfil de elución y de actividad se observa en la **fig. 2**. El seguimiento de la purificación se realiza mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida (T 10%, C 5%), **fig. 3**.

- **Cuantificación de la actividad de fosfatasa.**

La actividad se monitorea siguiendo la acción de la fosfatasa sobre p-nitrofenilfosfato en un buffer conteniendo β -mercaptoetanol 0,01 % v/v y albúmina sérica bovina 0,1 % imidazol 10

mM – EDTA 1 mM y p-nitrofenolfosfato 5 mM pH 7,2.

Se adiciona un volumen adecuado de eluato en un medio que contenga el buffer de actividad anteriormente descrito. Luego se agrega el sustrato (p-nitro fenol fosfato) y se deja actuar durante 40 minutos en oscuridad. La reacción se detiene mediante el agregado de hidróxido de sodio 0,25 N y se cuantifica mediante lectura en un fotolorímetro a 405 nm.

- ***Ensayo de inhibición.***

El ensayo de inhibición incluye una preincubación durante 10 minutos con microcistina LR 5 μ M a 40°C. Luego se agrega el sustrato (p-nitrofenolfosfato) y se deja actuar durante 40 minutos. La reacción se detiene mediante el agregado de hidróxido de sodio 0,25 N y se cuantifica mediante lectura en un fotolorímetro a 405 nm.

Las fracciones que muestran inhibición en la actividad de fosfatasa son recolectadas y guardadas en freezer a -20°C. La actividad de la enzima es estable durante 2 meses en esas condiciones. La actividad de enzima utilizada se optimizó para trabajar en el rango de mejor exactitud espectrofotométrica de equipos simples. Se define 1 U como la cantidad de enzima que hidroliza un nanomol de sustrato por minuto por ml.

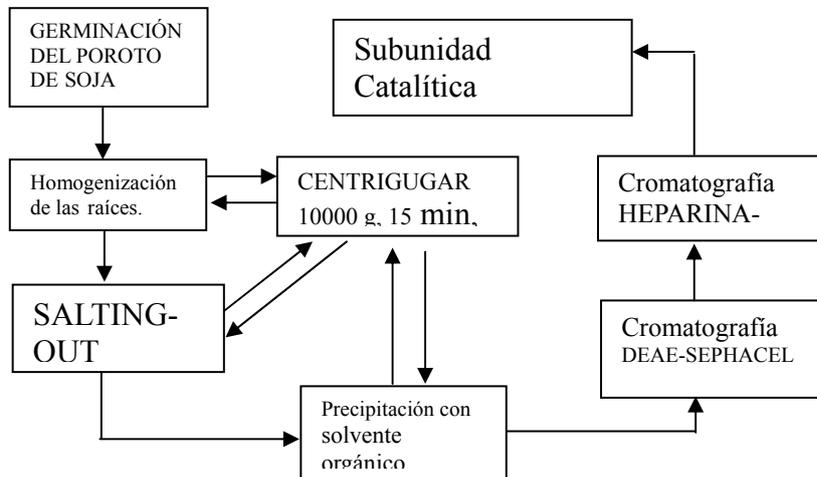
- ***Ensayo de detección de microcistinas en agua dulce.***

Primeramente se filtra un litro de muestra de agua por filtro de 0,45 μ m para la remoción de material particulado. Seguidamente el agua filtrada se agrega a un volumen de buffer conteniendo β -mercaptoetanol 0,01 % v/v y albúmina sérica bovina 1 %, imidazol 10 mM – EDTA 1 mM, pH 7,2 junto con la enzima (1,5 mU). La mezcla se deja incubar durante 15 minutos a 40 °C para favorecer el contacto entre la enzima y la toxina. A continuación se agregan el p-nitrofenolfosfato y se deja incubar a 40 °C durante 30 minutos. La lectura de la absorbancia se realiza a 405 nm y la concentración de microcistina se determina mediante el empleo de una curva de calibración realizada con diluciones de microcistina LR.

Resultados:

A continuación se observa una breve sinopsis de las etapas fundamentales de la obtención de la enzima, obteniéndose finalmente una única banda en el gel de SDS-PAGE.

Fig.1: etapas de la producción de la enzima.



La separación por intercambio iónico produce típicamente un perfil de elución como el siguiente:

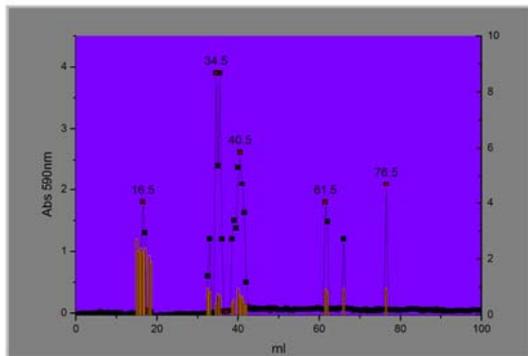


Fig. 2: cromatografía en DEAE-SEPHACEL. Los picos eluidos a 34,5 y 40,5 ml muestran la mayor actividad (barras de color naranja) inhibibles con microcistina LR. La separación procede mediante un gradiente de NaCl de 0 a 0,3 M.

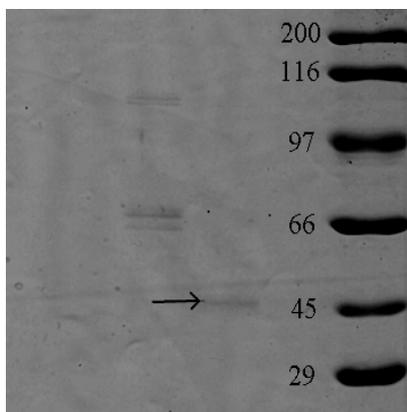


Fig. 3: gel de poliacrilamida SDS-PAGE mostrando la purificación el avance de la purificación en sus etapas finales. De izquierda a derecha sobrenadante de la cromatografía en DEAE-SEPHACEL, la flecha indica la banda eluida en la cromatografía en Heparina-Agarosa.

A continuación en la Fig. 4 se muestra un gráfico de los resultados de inhibición obtenidos con microcistina LR utilizando la enzima purificada.

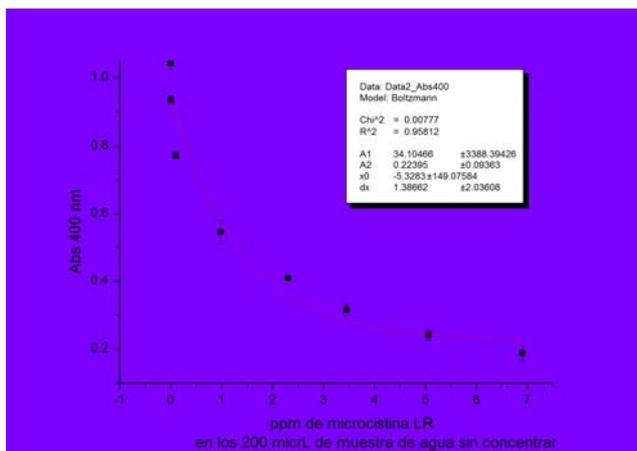


Fig. 4: El método produce resultados lineales en el intervalo de 20 a 80 % de inhibición, lo cual se correlaciona con concentraciones de microcistina LR estándar de 0,1 a 7 ppb de agua. La linealidad del método es comparable a las enzimas comerciales.

Discusión y Conclusiones:

La necesidad de realizar el monitoreo de cianotoxinas no puede, por sus consecuencias sobre la salud pública, quedar restringido a los grandes centros urbanos, los cuales poseen la infraestructura para realizar los monitoreos necesarios. Con el objetivo de aportar una herramienta diagnóstica efectiva y de bajo costo, comparada con los kits importados, es que el presente proyecto de investigación tuvo origen. La enzima purificada por nuestro laboratorio resulta de bajo costo, es sumamente estable en condiciones normales de uso y permite distinguir rápidamente la presencia de microcistinas y/o nodularinas en muestras de agua sin necesidad de realizar pre tratamientos sobre la muestra. Si bien esto no permite saber con exactitud el tipo o clase de toxina presente, cumple con un objetivo de significativa importancia: alertar a una población de que se abstenga de consumir agua contaminada durante los florecimientos algales.

Bibliografía:

- APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, ANWA & WPCF, Washington, 1998.
- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Bradford, M. Anal Biochem 72: 248-254, 1976.
- Carmichael W.W, Azevedo SMEO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham G.K., Human fatalities from cyanobacteria: Chemical & biological evidence for cyanotoxins. Environmental Health Perspectives 109: 663-668, 2001.
- Chorus I & Bartram J (Eds.) Toxic cyanobacteria in water - A guide to their public health consequences, monitoring and management. Published on behalf of World Health Organization, E & FN Spon, pp. 1-416, 1999.
- Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay. Comparison of methods, Jarkko Rapala et al, Analytica Chimica Acta 466, 213–231, 2002.
- Szöör et al., (1995). Isolation and characterization of the catalytic subunit of protein phosphatase A2 from *Neurospora crassa*. Comp. Biochem. Physiol.Col 112B, Vol 3, 515-522.
- A comparison of in vivo and in vitro assays to assess the toxicity of algal blooms. Mxolisi Masango, Jan Myburgh, Christo Botha, Leonie Labuschagne, Dharmarai Naickera. Water Research. 10, 033, 2007.
- Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. Monica Barco, Josep Rivera, Josep Caixach. Journal of Chromatography A, 959 103–111, 2002.
- Purification and properties of Arabidopsis thaliana type 1 protein phosphatase (PP1) Michael D. Stubbs, Hue T. Tran, Adrian J. Atwell, Catherine S. Smith, Doug Olson, Greg B.G. Moorhead, Biochimica et Biophysica Acta 1550, 52 y 63, 2001.
- A colorimetric assay for screening microcystin class compounds in aquatic systems, Bryan S. F. Wong, Paul K. S. Lam, Lihong Xu, Yongyuan Zhang and Bruce J.

Richardson. Chemosphere, Vol, 38, Nro 5, pp 1113 – 1122, 1999.

- Expression of protein phosphatase 1 during the asexual development of *Neurospora crassa*. Tamas Zekea, Endre Kokai, Balazs Szoor, Einat Yatzkan, Oded Yarden, Krisztina Szirak , Zsigmond Feher , Peter Bagossid, Pal Gergely, Viktor Dombradia. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 134,161–170, 2003.
- Microcystin affinity purification of plant protein phosphatases: PP1C, PP5 and a regulatory A-subunit of PP2A .Sarah Meek, Nick Morrice, Carol MacKintosh. FEBS Letters, 457, 494 -498, 1999.
- Purification and Characterization of Type 1 Protein Phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of the R73C Mutation. Susan S. Dignam, Jyoti S. Koushik, Jing Wang, Robert J. Trumbly, Keith K. Schlender, Ernest Y. C. Lee and Erwin M. Reimann. Vol. 357, No. 1, September 1, pp. 58 – 66, 1998.
- Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Principles and Methods. Amersham Biosciences Limited 2004.
- Electrophoresis in Practice, Reiner Westemeier, Fourth, revised and enlarged Edition ISBN 3-527-30354-5, 2005.