



Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas

Nucleo Disciplinario: ELEMENTOS BIOACTIVOS Y SUS APLICACIONES

Título: “ PRIMERAS EVIDENCIAS DE RECUPERACIÓN DE HIGADOS AFECTADOS POR HEPATOTOXINAS PRODUCIDAS POR CIANOBACTERIAS PRESENTES EN EL RÍO DE LA PLATA.”

Autores: ^cMARTINEZ M., ^cNASO L., ^cSEDAN D., ^cTELESE L., ^a Aura C., ^bMasera S., ^cGiannuzzi L., ^dEchenique R. y ^cAndrinolo D.

^a Servicio de Patología, Hospital General San Martín, La Plata. ^d Toxicología y Química Legal. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. ^c Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) Universidad Nacional de La Plata. ^d Departamento Científico Ficología, Museo de La Plata.

E-MAIL : danielasedan@yahoo.com.ar
luciananaso504@hotmail.com
marianalujan@gmail.com
lht15@hotmail.com

PALABRAS CLAVES: MICROCYSTINAS, CIANOBACTERIAS
PALABRAS CHAVE: MICROCYSTINAS, CIANOBACTÉRIAS

INTRODUCCION

Las microcystinas son heptapéptidos monocíclicos, sintetizados por varias especies de cianobacterias tales como *Microcystis aeruginosa* en cuerpos de agua dulce. Su efecto tóxico se basa en su capacidad de Inhibir específicamente las Proteínas Fosfatasa 1 y 2A (Barreto et al., 1996)

Su estructura general es ciclo (D-Ala-X-D-MeAsp-Y-Adda-D-Glu-Mdha), donde X e Y son aminoácidos variables, Mdha es Metildehidroalanina, Adda es un aminoácido característico de 20 carbonos (3-amino-9-metoxi-2,6,8 trimetil-10 fenil-4,6 ácido diecadenoico) (Botes et al., 1985). Mas de cincuenta microcystinas han sido identificadas, todas son heptapéptidos cíclicos que difieren en el grado de metilación, la configuración de Adda o los aminoácidos que ocupan las posiciones X o Y (Rinehart., 1994). La dosis letal 50 determinada para microcystina LR por vía intraperitoneal es de 50 ug/kg.

La presencia de estas toxinas en el agua potable ha sido fuente de intoxicaciones agudas y crónicas. En Febrero de 1996, en Caruarú (Brasil), pacientes de un centro de diálisis presentaron alteraciones visuales, nauseas y vómitos, debilidad muscular, asociados con la hemodiálisis. Subsecuentemente, 100 pacientes desarrollaron falla hepática aguda. En Diciembre de ese año, 56 de estos pacientes murieron. Del análisis de suero e hígados de los pacientes se concluyó que el mayor factor que contribuyó a la muerte de los pacientes dializados fue la exposición por vía intravenosa a microcystinas. (Carmichael et al., 1997). Por otro lado la presencia de estas toxinas en cuerpos de agua utilizadas para el consumo humano se correlaciona con la una alta incidencia de cáncer primario de hígado como ha sido estudiado en China (Carmichael, et al 1997).

Una intoxicación aguda produce inflamación hepática, degeneración focal de los hepatocitos y depósitos de hemosiderina (Fawell et al., 1994), como así también una disrupción de la estructura de los hepatocitos, pérdida de la estructura sinusoidal, aumentos del peso del hígado acompañado de una marcada hemorragia, shock hemodinámico, falla cardíaca y posterior muerte (Hooser et al., 1990).

Sin embargo no se conoce si los daños hepáticos producidos en forma aguda con dosis subletales de microcystinas revierten cuando concluye la exposición.

En este trabajo se analizaron mediante diferentes técnicas histopatológicas hígados de ratones a los que se administró dosis letales de 100 µg/Kg y dosis subletales de 25 µg/K. Los hígados de estos animales se analizaron con técnicas histológicas.

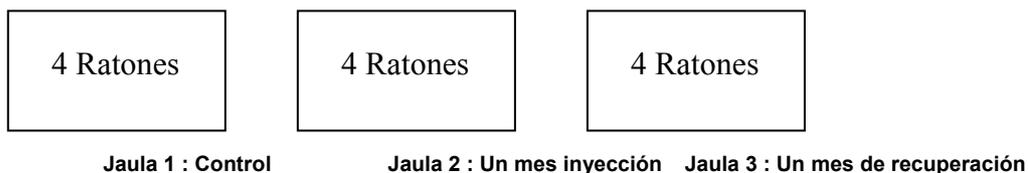
MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este experimento se utilizaron 22 ratones machos adultos (32 ± 4 gr) procedentes del lote N:NIH-S cuyos progenitores provienen de National Institute of Health (USA).

Los animales fueron criados y producidos en sistemas cerrados bajo barrera en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

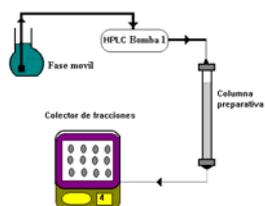
Para los ensayos se utilizaron tres jaulas con la siguiente disposición de los animales:



Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y los hígados fueron pesados e inmediatamente guardados en solución de formol al 15 %

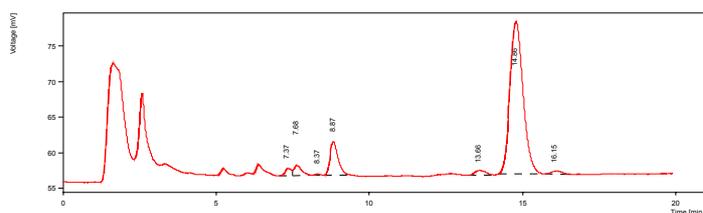
Purificación de microcystina LR

La toxina utilizada fue obtenida a partir de florecimientos de algas previamente identificadas taxonomicamente como *Microcystis*, mediante la técnica HPLC usando una columna preparativa THERMO Hyperprep HS C18, (250x10 mm).

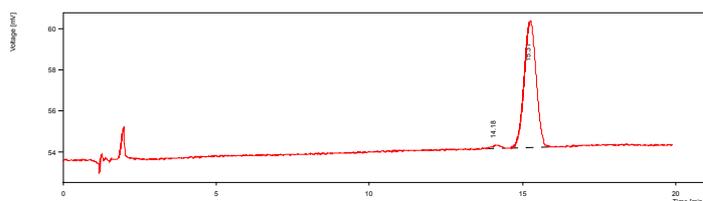


Esquema del equipo utilizado para la purificación de la muestra (HPLC)

Se obtuvieron los siguientes perfiles cromatográficos, los cuales nos permitieron identificar la microcystina LR y determinar su pureza.



Cromatograma de una muestra sin purificar



Cromatograma de la muestra purificada, conteniendo Microcystina LR

Técnicas histológicas

Los cortes hepáticos formolados fueron fijados con Líquido de Bouin e incluidas en parafina. Se obtuvieron secciones de 3 μ m con un micrótom.

A cada muestra se le practicaron distintas tinciones y se observaron al microscopio.

Tinción de Hematoxilina – Eosina:

La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico perteneciente a los xantenos. Se teñirán los núcleos de azul, citoplasmas en rosa, músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

Tinción de Reticulina:

Es una técnica de impregnación argéntica que pone de manifiesto la estructura de la red de reticulina presente en el parénquima hepático.

Diseño experimental

Intoxicación aguda: Se administró intraperitonealmente una dosis de 100 μ g/kg. Se observó la respuesta de los ratones y se determinó el tiempo de muerte. Se realizó la disección de los animales y se extrajo el hígado para el posterior procesamiento.

Intoxicación crónica:

Se dividieron los animales en 3 grupos. A los animales de las jaulas 2 y 3 se les administraron 25 μ g/ Kg de mic LR intraperitonealmente cada 48 hs durante 1 mes. Los ratones de la jaula 2 fueron sacrificados al cumplirse el mes de inyección. El grupo de la jaula 3 se sacrifico después de un mes sin administración de la toxina. El grupo correspondiente a la jaula 1 se utilizo como control, inyectándolo con el equivalente de solución fisiológica.

RESULTADOS

Intoxicación Aguda:

Las primeras observaciones mostraban un estado de shock de los ratones los cuales disminuían su movilidad, hiperventilaban y finalmente sufrían convulsiones y muerte. Los ratones inyectados con la dosis letal de 100 μ g/kg de Myc-LR murieron en $40,6 \pm 4$ min (media \pm desv. est., n = 6). La observación macroscópica revela un color intenso y un aumento de la masa hepática (Fig. 1)



Figura 1. Hígados de los distintos ratones, obtenidos en ensayo agudo (arriba) comparados con hígados de ratones controles (abajo) se puede observar el aumento de tamaño y diferente coloración que evidencia congestión vascular.

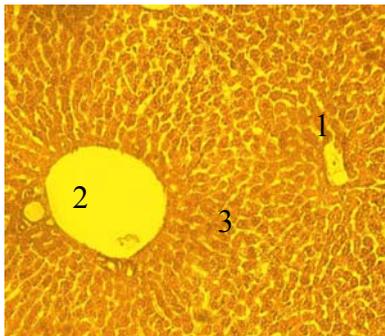
En la figura 2 A) se observa la estructura hepática normal, donde se puede distinguir la vena hepática y el tracto portal. La distribución de los hepatocitos esta dada en forma radial desde los vasos principales, pudiendo observarse también la red de sinusoides hepáticos.

En la figura 2 C) se distinguen hepatocitos normales, los cuales presentan citoplasma homogéneamente teñido, núcleos definidos y con cromatina condensada.

En la figura 2 B) se presenta una muestra de hígado de uno de los ratones inyectados con microcystina LR. En ésta se observa un importante daño tisular evidenciado por una notable vasoconstricción en el tracto portal, pérdida de la disposición radiada de los hepatocitos, típica de la arquitectura normal del parénquima hepático; pérdida de tejido parenquimatoso por destrucción de células y la consecuente desaparición de la mayor parte de los sinusoides hepáticos normales.

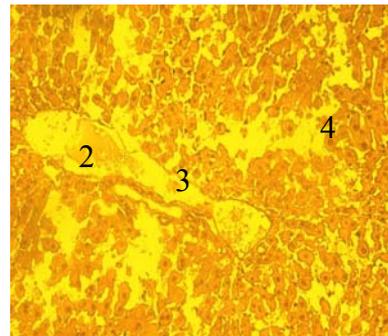
En la figura 2 D) se muestra el preparado observado en la figura 2 B) a un mayor aumento (40 X) Los hepatocitos presentan una importante deformación, ya que se puede ver un contorno irregular de la célula, pérdida de homogeneidad del citoplasma y núcleos de mayor tamaño y cromatina mas laxa.

Por lo tanto, estos análisis histológicos muestran disrupción masiva de la arquitectura lobular y sinusoidal del hígado, alteración de los vasos hepáticos, pérdida de hepatocitos y displasia pero no hemorragia intra hepática ya que no se detectan elementos figurados de la sangre en el parénquima hepático.

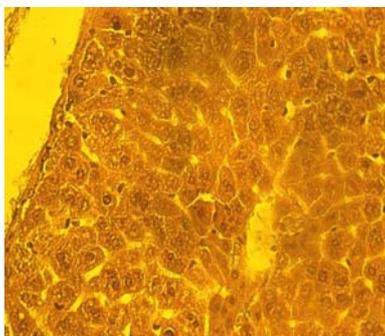


A) Corte de hígado de ratón control que muestra una estructura normal. 1- Vena hepática terminal 2- Tracto portal 3- Interface del parénquima en posición radiada

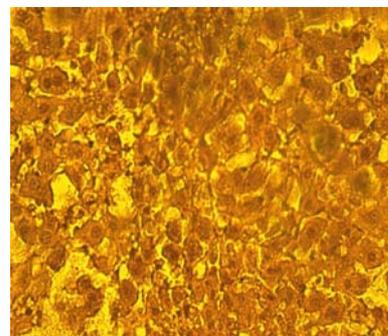
Figura 2



B) Corte de hígado de un ratón inyectado, mostrando importante daño en el parénquima 2- Tracto portal con importante vasoconstricción 3- Disrupción de la interfase del parénquima 4- Pérdida del parénquima



C) Corte de hígado de ratón en donde se muestra la estructura típica del hepatocito



D) Ratón inyectado, hepatocitos deformados, con núcleo amorfo y coloración.

Intoxicación crónica:

El estudio de exposición crónica consistió en la administración intraperitoneal de dosis subletales de 25ug/kg de microcystinas cada 48 horas durante un mes a dos grupos de 4 ratones cada uno, y de la inyección intraperitoneal de una cantidad equivalente de solución fisiológica, administrada con la misma frecuencia al grupo control.

Transcurrido un mes de inyección de toxina, un grupo de cuatro ratones fue sacrificado y se realizaron las disecciones correspondientes de estos animales con el fin de extraer los hígados para su posterior análisis.

En ese momento se interrumpió la exposición a la toxina y se dejó el grupo restante en recuperación durante un mes. Finalizado este período se sacrificó a los animales pertenecientes a este grupo y se obtuvieron los hígados mediante el mismo procedimiento de disección.

Con los hígados extraídos se realizaron cortes histológicos, los cuales fueron sometidos a diferentes técnicas de tinción y observados al microscopio.

En las figuras 3 A, C y E se presentan muestras de hígados pertenecientes a ratones sometidos a un mes de inyección intraperitoneal con Microcystina LR. En ellas se observa daño hepático evidenciado por macrovacuolización y microvacuolización intracitoplasmáticas en las tres principales zonas determinadas por la disposición de los hepatocitos en el lobulillo hepático, pérdida parcial de arquitectura, binucleación y leve discariosis nuclear; mientras que no se observaron fibrosis, ectasia (congestión vascular), ni hemorragias ya que no se detectan elementos figurados de la sangre en el parénquima. La pérdida de arquitectura del parénquima hepático puede deberse a la gran cantidad de vacuolas presentes en el citoplasma de los hepatocitos, así como a la pérdida de cohesión celular y una ostensible disrupción de la red de reticulina. Se observan, núcleos replegados por la presencia de las macrovacuolas que ocupan gran parte del citoplasma celular, así como, núcleos aumentados en tamaño y con vesiculación. Las características observadas en estos preparados se correlacionan con un daño hepático moderado.

En los cortes histológicos de los hígados de los animales a los que se les permitió una recuperación de 1 mes sin exposición a la toxina, luego del tratamiento previo de 1 mes con inyecciones intraperitoneales de microcystina, se observaron triada hepática y vena porta con estructura normal, pérdida parcial de estructura, microvacuolas que no deforman los núcleos, células espumosas, discariosis, hiper Cromacia nuclear y atipia reactiva leve (Fig. 3 B, D, F y G)

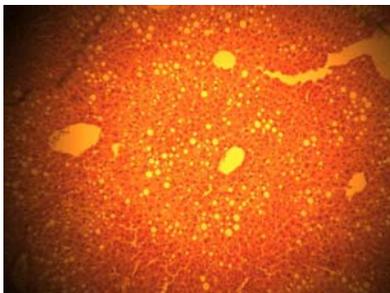
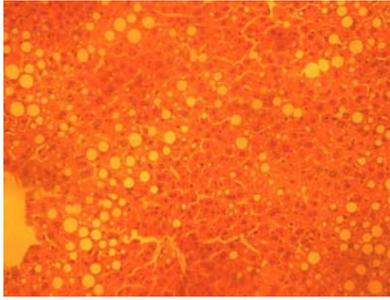


Figura 3

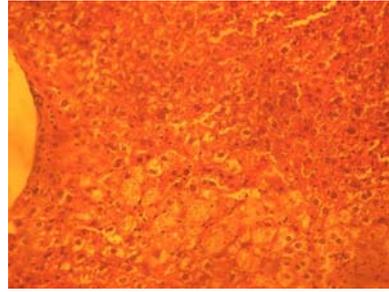


A) Hígado de ratón, 1 mes de inyección (10 X)
Macrovacuolización intracitoplasmática,
pérdida parcial de arquitectura

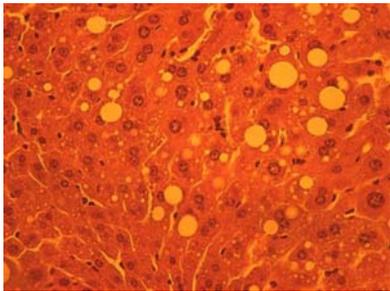
B) Hígado de ratón, 1 mes de recuperación (10 X)
Áreas con pálida eosinofilia en el citoplasma, debido a
la presencia de microvacuolas



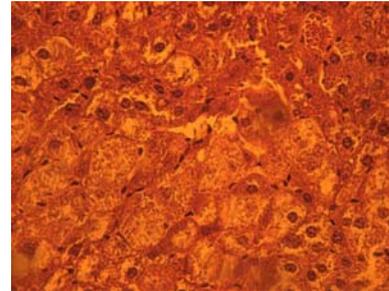
C) Hígado de ratón, 1 mes de inyección (20 X)
Macrovacuolización y microvacuolización intracitoplasmática, pérdida parcial de estructura del parénquima



D) Hígado de ratón, 1 mes de recuperación (20 X)
Microvacuolas intracitoplasmáticas, discariosis, hiperchromacia nuclear, binucleación



E) Hígado de ratón, 1 mes de inyección (40 X)
Macro y microvacuolización intracitoplasmática, pérdida de arquitectura, leve discariosis nuclear, binucleación



F) Hígado de ratón, 1 mes de recuperación (40 X)
Microvacuolas que no deforman el núcleo, células espumosas, discariosis, hiperchromasia nuclear, atipia reactiva leve



G) Hígado de ratón, 1 mes de recuperación (Tinción Reticulina 40 X)
Ostensible pérdida de la red de reticulina

DISCUSIÓN.

Dado que estas toxinas son promotoras de tumores y de hecho existe una fuerte correlación entre cáncer primario de hígado y la presencia de cianobacterias en los reservorios de agua que utiliza la población, producto una intoxicación crónica; los efectos de las cianobacterias en la salud de la población deberán ser estudiados mas profundamente con el objetivo de realizar una evaluación del riesgo que representan para la salud humana y animal la presencia de florecimientos masivos de algas tóxicas en la zona costera del Rio de la Plata utilizadas con fines recreativos y como fuente de agua potable para millones de personas.

En estudios recientes se han realizado determinaciones de concentración de microcystina en suero de pacientes sometidos a diálisis de los cuales se sabía que estaban expuestos a la toxina, utilizando el método de ELISA para la detección (Hilborn et al, 2005).

De acuerdo a los resultados obtenidos en dicha experiencia, estos investigadores proponen la utilización de la detección de microcystinas en suero como un marcador de exposición a la toxina.

La presencia de microcystina en suero indicaría la exposición del paciente a la toxina en el momento de la toma de la muestra o en un período de tiempo cercano a la misma.

Nuestro trabajo realiza el estudio del daño hepático producido por la exposición crónica a la microcystina y de las posibilidades de recuperación de dicho órgano luego de la interrupción del contacto con la toxina.

Este constituye nuestro punto de partida hacia la búsqueda de un posible biomarcador de exposición crónica a microcystina que permita determinar los efectos de la toxina y la magnitud del período de exposición a la misma.

La binucleación, signo de duplicación celular, junto con la atipia reactiva leve y las células espumosas que se observan en los animales con 1 mes de recuperación indican la reparación a nivel celular de los daños ocasionados en el tratamiento previo.

De los ensayos agudos y crónicos se desprende que una de los efectos más evidentes de microcystina LR es la disrupción de la estructura de reticulina que es la que proporciona la base estructural de el parénquima hepático, la cual es fundamental para el correcto funcionamiento del hígado.

La destrucción parcial de la red de reticulina no se recupera en animales después de interrumpir su exposición a la toxina, en los tiempos estudiados en este trabajo. La alteración de la estructura de reticulina podría ser un excelente marcador de exposición que será estudiado con más profundidad

CONCLUSIONES

La presencia de *Microcystis aeruginosa* en la cuenca del Plata es un problema ambiental y sanitario que debe ser estudiado

Estos resultados son considerados como punto de partida para el necesario desarrollo de investigaciones acerca del impacto sobre la salud humana resultante de la presencia de cianobacterias y cianotoxinas en el Rio de La Plata

REFERENCIAS:

Barreto, V., Lira, V., Figuerido, J., Fittipaldi, H., Juca, N., Gayotto, L. C., Raposo, F., Barbosa, J., Holmes, C., Cardo, D., Azevedo, S., and Carmichael. W (1996). "Caruarú syndrome" . A previously undescribed form of acute toxic liver disease in humans caused by microcystin LR with a high lethality rate (Abstract)

Carmichael W. The cyanotoxins. *Adv Bot. Res* 27:1997

Hooser. S.B, Beasley. V.R, Basgall E.J, Carmichael. W.W, and Haschek W.N (1990). Microcystin-LR- induced ultrastructural changes in rats. *Vet Pathol* 27, 9-15.

Elleman. T.C, Falconer. I.R, Jackson. A.R and Runnegar,M.T(1978). Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* bloom. *Aust. J Biol. Sci.* 31, 209-218

Kl Rinehart, M Namikoshi, BW Choi. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae. *J Appl Phycol* 6:159-176, 1994

Hilborn, H., Carmichael, W.W., Yuan, M., Azevedo, S.(2005) A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins.