



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Principales cianotoxinas

Generalidades y métodos de detección

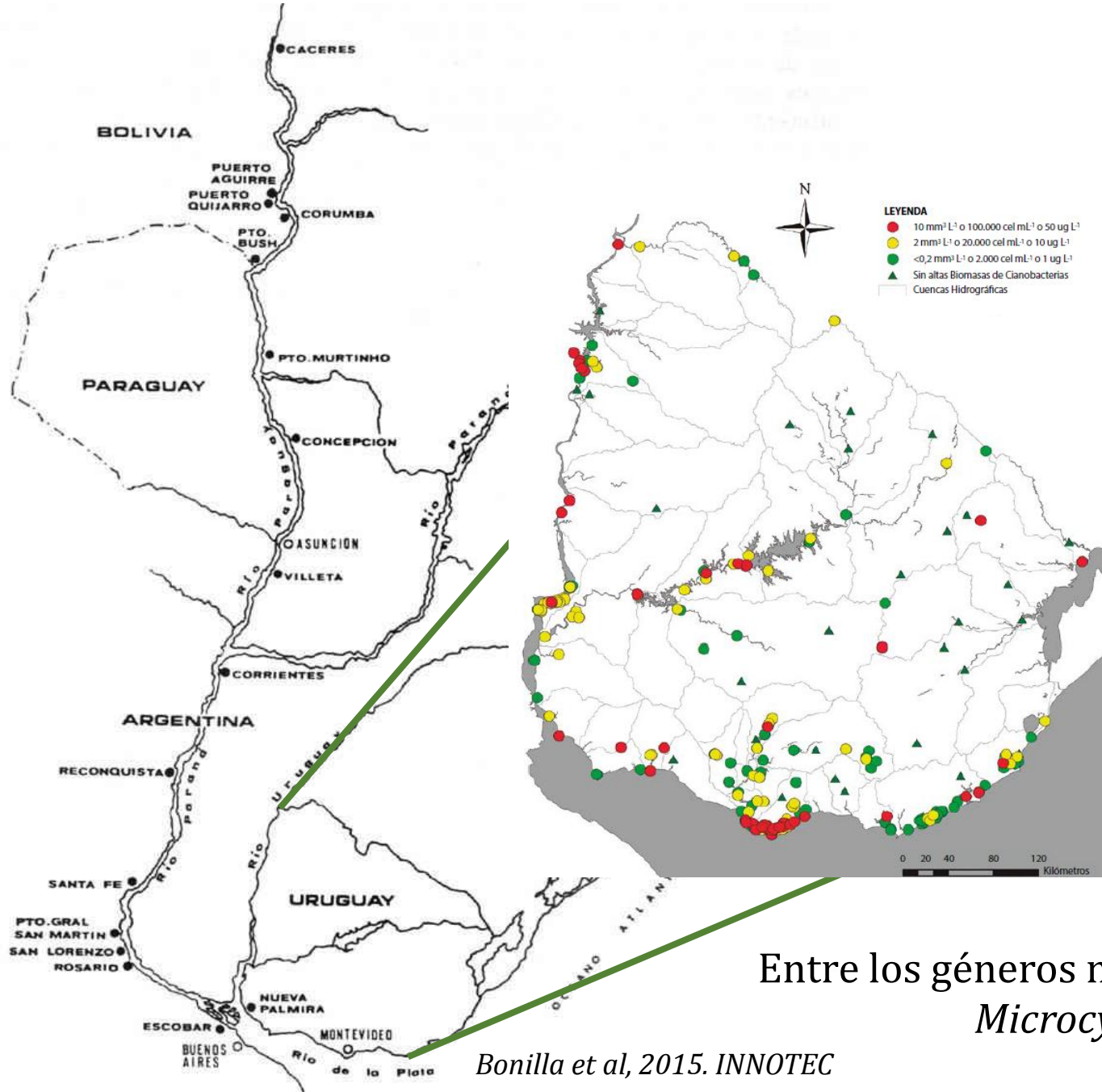
Macarena Pírez Schirmer

mpirez@fq.edu.uy

Área Inmunología
Departamento de Biociencias
Facultad de Química
Universidad de la República

30 de abril 2021

Floraciones cianobacterianas



Floraciones:

- Embalses del Río Negro
- Río de la Plata en toda su extensión
- Lagos someros eutróficos de la región.

Entre los géneros más comunes que producen floraciones se destacan *Microcystis* y *Dolichospermum* (>90% toxicas).

*Central Hidroeléctrica Constitución.
Embalse de Palmar, 2009.*



Fotografía: Personal UTE



*Bloom registrado en febrero 2019
en playa de Embalse de Palmar.*

Fotografía: D. Pérez

Cianotoxinas: Estructuras químicas, géneros productores y modo de acción

Cianotoxina	Estructura química	Cianobacteria productora	Modo de acción
Microcistinas (>200 variantes) [77]	Heptapéptidos cíclicos	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> *, <i>Nostoc</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Radiocystis</i> , <i>Gloeotrichia</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Rivularia</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Plectonema</i>	Hepatotóxica, promotor tumoral, inhibidor proteínas eucariotas fosfatasa PP1, PP2A y fosfoproteínas fosfatasa PPP4, PPP5.
Nodularinas	Pentapéptidos cíclicos	<i>Nodularia spumigena</i> , <i>Nostoc (symbiotic)</i>	Idem microcistinas, además de leve carcinogenicidad.
Cilindrospermopsina (5 variantes)	Alcaloides de guanidina tricíclicos	<i>Cylindrospermopsis</i> *, <i>Umezakia</i> , <i>Anabaena</i> *, <i>Oscillatoria</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Hepatotóxica. Toxicidad en múltiples órganos, neurotóxica, genotóxica, disruptores endócrinos. inhibidor síntesis proteica.
Anatoxina-a	Alcaloides bicíclicos	<i>Anabaena</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Neurotóxica, se une competitivamente a los receptores de acetilcolina.
Anatoxina-a (S)	N-hidroxiguanina cíclica fosforilada	<i>Anabaena</i> *	Neurotóxica, inhibidor de acetilcolinesterasa.
Saxitoxina	Alcaloides	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> *, <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> *, <i>Planktothrix</i>	Neurotóxica, bloquea canales de sodio dependientes de voltaje.
Lyngbyatoxinas, Aplysiatoxinas	Alcaloides de Indol	<i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Schizothrix</i>	Promotor tumoral, unión a proteína quinasa C eucariota.
BMAA, DAB	Diaminoácidos	Diversos géneros	Neurotóxico, afecta desarrollo, inserción de errores en síntesis de proteínas.
LPS	Lipopolisacáridos	Todos los géneros	Inflamatorio, promueve secreción de citoquinas

No es suficiente con identificar los géneros o especies presentes para saber si una floración es tóxica!

La producción de toxinas es especie (y cepa) específica. En cada cepa (*in vitro* o en la naturaleza) la producción de toxinas varía con el tiempo y las condiciones ambientales.

Comparación de toxicidad de toxinas biológicas (i.p. en ratón)

Toxina	Organismo productor	DL50 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Toxina Botulínica	Bacteria	0,00003
Toxina Tetánica	Bacteria	0,0001
Toxina Diftérica	Bacteria	0,3
Saxitoxina	Cianobacteria/Dinoflagelados	9
Veneno de Cobra	Cobra	20
Anatoxina-a(s)	Cianobacteria	20-40
Nodularina	Cianobacteria	30-50
Microcystinas	Cianobacteria	50-1200
Acido Okadaico	Dinoflagelados	192
Anatoxina-a	Cianobacteria	200
Estricnina	Plantas	200-500
Cianuro de Sodio		6000

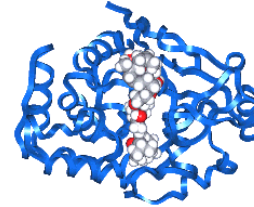
Distintas estrategias para la determinación de cianotoxinas

- Bioensayos



Bioensayos *in vivo* en ratones
Bioensayos *in vitro* en líneas celulares

- Métodos bioquímicos



Ensayo de inhibición de fosfatasa

- Métodos inmunológicos



Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

- Métodos moleculares



Quantitative real-time PCR

- Métodos instrumentales



HPLC-UV o PDA
LC-MS/MS



MALDI-TOF

Los inmunoensayos como herramientas analíticas

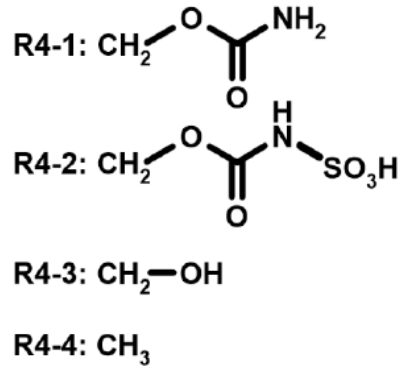
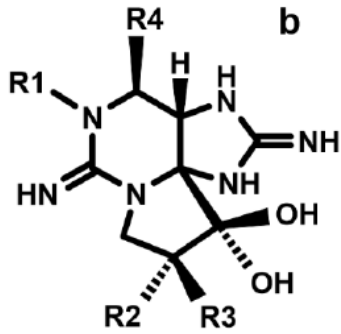
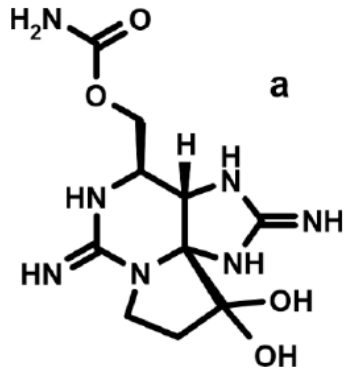
Ventajas

- Elevada sensibilidad y especificidad.
- No requiere pretratamiento de muestra.
- Baratos.
- Adaptable a formatos aplicables “*in situ*”.
- Permite el análisis en paralelo de varias muestras.
- Simples, rápidos y fáciles de implementar.

Desventajas

- Necesidad de estudiar el efecto matriz.
- Contra solamente un analito o grupo de compuestos.

Neurotoxinas: Saxitoxinas



DL50

i.p.: 10 $\mu\text{g/kg}$
o.: 260 $\mu\text{g/kg}$

- Alcaloide carbamato no sulfatado – STX
- Alcaloides carbamatos mono-sulfatados - GTX (gonyautoxins)
- Bi-Sulfatadas - C-toxins
- 57 congéneres

Bloqueo de canales de sodio “voltaje dependientes”

Altera el potencial de acción en neuronas. Inhibiendo la conducción nerviosa.

En general estables en soluciones ácidas diluidas.

Purificación: cartuchos de carbón (AOAC Official Method 2005.06).

Bioacumulación:

Daphnia magna, moluscos bivalvos

Métodos de cuantificación:

- LC-MS

- Enzimático (saxiphilin)

- ELISA

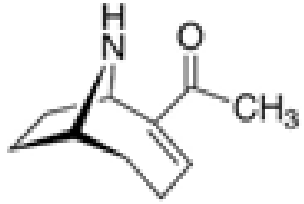
- Ensayo de unión a receptor (AOAC Official Method 2011.27)

Valores guía OMS (basados exposición aguda en infantes, PSP):

- 3 $\mu\text{g/L}$ (agua potable)

- 30 $\mu\text{g/L}$ (recreacional)

Neurotoxinas: Anatoxinas (alcaloides heterocíclicos)



ATX-a (165,2 Da)

DL50

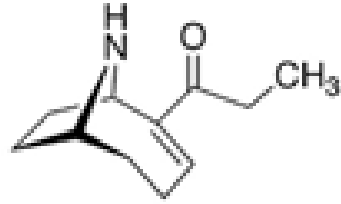
i.p.: 200 - 250 µg/kg

o : 2- 5000 µg/kg

Potente agente despolarizante pre y post - sináptico.

Agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina.

Estimula la contracción de las células musculares, y neuronas del sistema nervioso central .



HTX-a (179,2 Da)

Purificación: cartuchos carbón e Int. Iónico (suave)

Estable a pH ácido y en oscuridad

Fotodegradable t $\frac{1}{2}$: 1-2 h al sol

Vida media en ambiente : 14 días (pH 8-10)

Métodos de cuantificación:

- LC-MS/MS (US EPA Method 545)
- ELISA
- Ensayo de unión a receptor

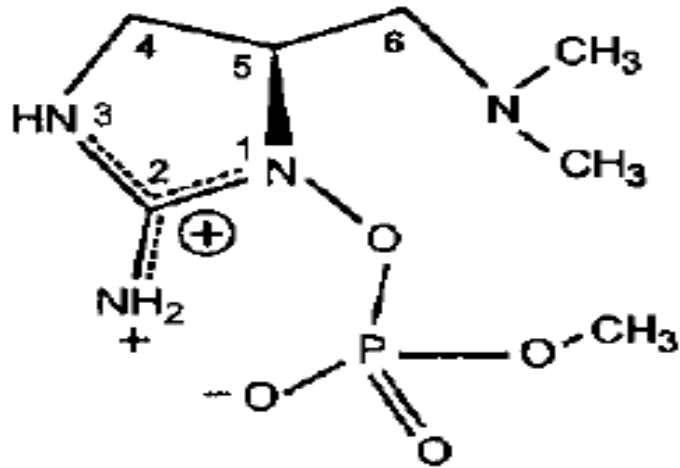
Valores de referencia provisional OMS (adultos)

- 30 ug/L exposición aguda o corto plazo (agua consumo)
- 60 ug/L (exposición recreacional)

Neurotoxinas: Anatoxina-a (S)

Compuesto organo-fosforado natural

Anatoxin-a(S) MW 252; C₇H₁₇N₄O₄P



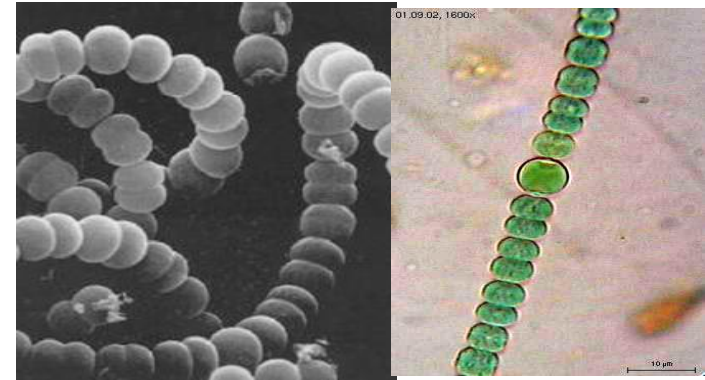
DL50:
i.p.:20 µg/ kg

Termolábil >40°C

Inhibidor de la Acetil colinesterasa

Más estable a pH ácido que en soluciones neutras o alcalinas.

La diferencia de pH estomacal podría explicar la distinta susceptibilidad de diferentes especies animales a sufrir intoxicaciones.



A. flosaquae (NRC 525-17)

A. spiroides

A. lemmermannii

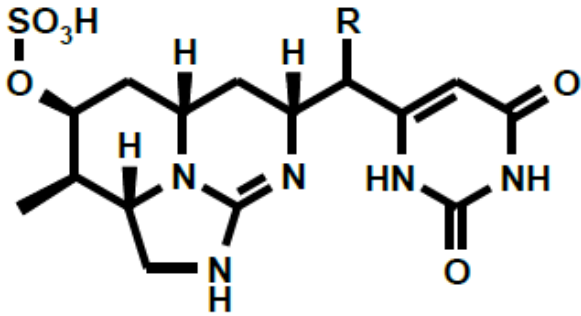
Actualmente: *Dolichospermum*

Actuaría como insecticidas organofosforados y agentes neurotóxicos de guerra.

Métodos de cuantificación:

- LC-MS/MS
- Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (biosensor)

Hepatoxinas: Cilindroespermopsinas



DL50

PM 415

i.p.: 180-200 mg/kg

o.: 4400-6900 mg/kg

Afecta hígado, los riñones y los eritrocitos

Mecanismo de acción de la toxicidad mediada por CYN no se ha dilucidado por completo.

Valores guía provisionales (Basados en estudios en ratones):

- 0.7 µg/L (agua potable, consumo prolongado)
- 3 µg/L (corto plazo)
- 6 µg/L (exposición recreacional)

Alta proporción toxina extracelular

Bioacumulación:

mejillones, cangrejos, peces
(hepatopáncreas, músculos, etc)

Aprox. 1 mg/kg seco (en tejidos)

Estable en oscuridad y baja intensidad de luz

Resiste 15 min ebullición pero comienza a oxidarse

Oxidable por cloro

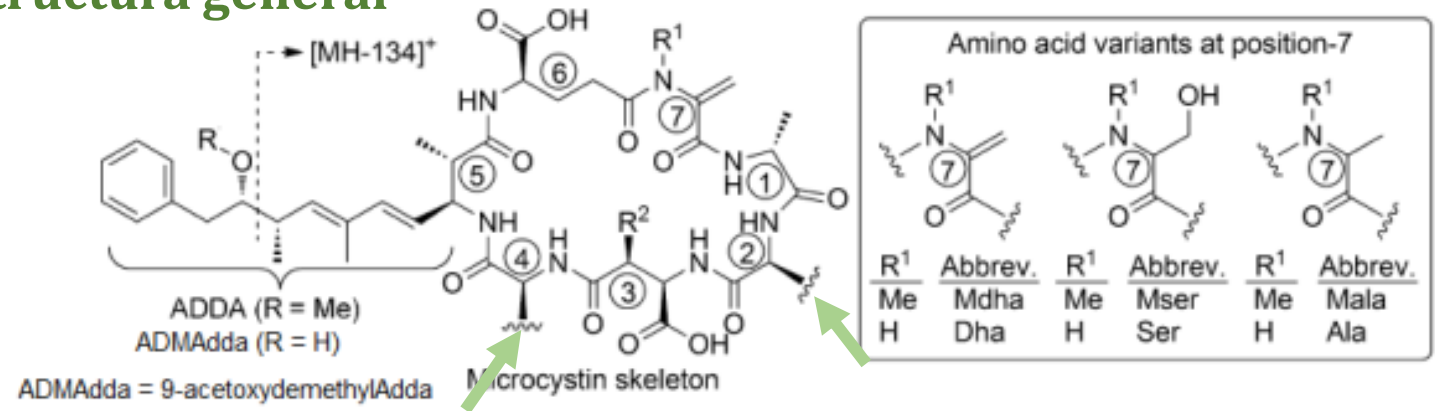
Purificación: con columnas de carbón

Métodos de cuantificación:

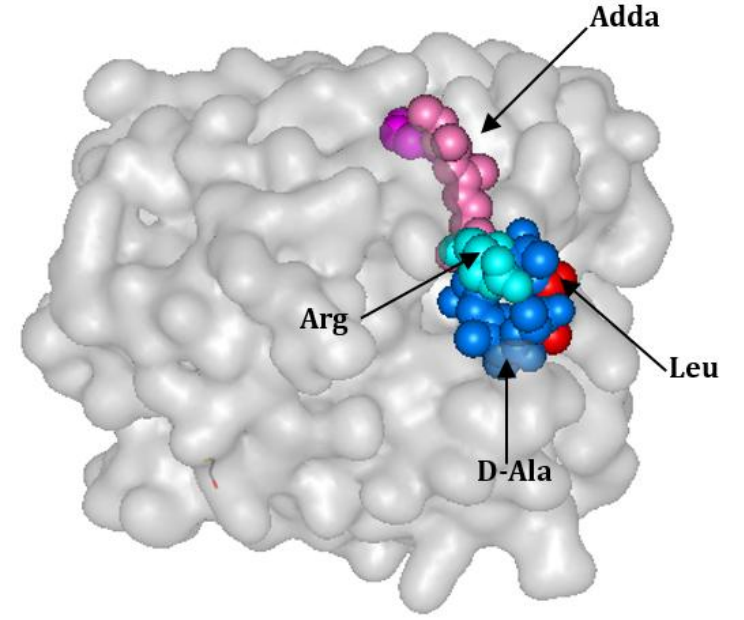
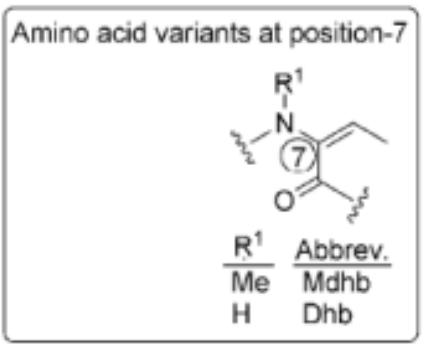
- HPLC-UV o PDA
- LC-MS/MS (US EPA Method 545)
- ELISA

Hepatoxinas: Microcistinas (MCs)

Estructura general



	②	④	⑦	R ¹	R ²	[MH] ⁺ m/z
1 MC-LR	Leu	Arg	Mdha	Me	Me	995.5
2 MC-YR	Tyr	Arg	Mdha	Me	Me	1045.5
3 MC-RR	Arg	Arg	Mdha	Me	Me	1038.5
4 MC-LA	Leu	Ala	Mdha	Me	Me	910.5
5 MC-LF	Leu	Phe	Mdha	Me	Me	986.5
6 MC-LY	Leu	Tyr	Mdha	Me	Me	1002.5
7 MC-LW	Leu	Trp	Mdha	Me	Me	1025.5
8 [Dha ⁷]MC-LR	Leu	Arg	Dha	H	Me	981.5
9 MC-RY	Arg	Tyr	Mdha	Me	Me	1045.5
10 [Asp ³]MC-RY	Arg	Tyr	Mdha	Me	H	1031.5
11 [Asp ³]MC-LY	Leu	Tyr	Mdha	Me	H	988.5
12 [Asp ³]MC-LR	Leu	Arg	Mdha	Me	H	981.5
13 MC-LY(OMe)	Leu	MeOTyr	Mdha	Me	Me	1032.5
14 MC-LL	Leu	Leu	Mdha	Me	Me	952.5
15 [Dha ⁷]MC-YR	Tyr	Arg	Dha	H	Me	1031.5
16 [Asp ³ , Mser ⁷]MC-RY	Arg	Tyr	Mser	Me	H	1049.5



Proteína fosfatasa 1 (PP1) humana unida a MC-LR.
Fuente: Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>).

MCs: > 200 variantes estructurales

Heptapéptidos cíclicos

Hepatotóxicos

Estructura-toxicidad muy variable

Estructura de variantes (congéneres) de MCs. Extraído y adaptado de Miles et al. 2013

Microcistinas (MCs)

El género productor de **MCs** por excelencia, *Microcystis* ha sido reportado en numerosos países alrededor del mundo.



En Uruguay son frecuentes las floraciones con predominancia del género *Microcystis*, usualmente productoras de **elevadas concentraciones de MCs**.

Existen reportes de **intoxicaciones agudas** relacionadas al **uso recreativo** en el río Uruguay y en el Río de la Plata (*Giannuzzi et al, 2011; Vidal et al, 2017*).

Países donde se han reportado al menos una publicación ISI (International Scientific Index) de cianobacterias productoras de microcistinas. Extraído de *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Section I: Cyanobacteria, Cyanotoxins, Their Human Impact, and Risk Management. 2017*.

Microcistinas (MCs)

Los efectos tóxicos de las microcistinas han conducido a la introducción de valores de referencia

- ✓ Toxicidad en humanos: consumo de agua o animales contaminados, y exposición recreacional.



- ✓ Efectos tóxicos en animales domésticos, de producción y fauna nativa.

Resiste 15 min ebullición

Oxidable por cloro

Purificación: con columnas SPE (C18)

Métodos de cuantificación:

- HPLC-UV o PDA (ISO, 2005)
- ELISA
- LC-MS/MS
- Ensayo inhibición fosfatasas

Recomendaciones de la OMS

Agua potable

< 1 µg/L MC-LR

Aguas recreacionales (riesgo)

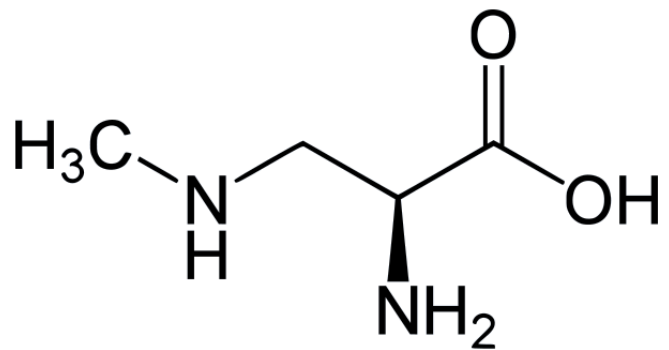
Bajo: 2-4 µg/L (efectos alérgicos).

Moderado: 5-20 µg/L (hepatotoxicidad por ingestión accidental).

Alto: >20 µg/L (espumas).

β -N-methylamino-L-alanine (BMAA)

- Aminoácido neurotóxico producido por diversas cianobacterias . Ej: Nostoc commune (Nostocales).
- Diversos trabajos lo asocian a enfermedades neurodegenerativas.
- BMAA, afecta especialmente neuronas motoras in vitro en concentraciones bajas.
- Hiperexcitación de la actividad neuronal por aumento de niveles de Ca intracelular. Agonista de glutamato en receptores AMPA (transmisión sináptica rápida SNC).



beta-metilamino-L-alanina



Estudios recientes reportan que más del 95% de los géneros de cianobacterias son capaces de producir BMAA.

Preguntas

