



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Maestría en Ciencias Ambientales

Biomarcadores de daño y estrés oxidativo en neutrófilos humanos expuestos a hierro y a cianotoxina microcistina LR/hepatotoxina

Tesis presentada para optar al Título de
Magíster de la Universidad de Buenos Aires en Ciencias Ambientales

Tesista: Chiesa, Iris Maribel

Directora: Prof. Dra. Repetto, Marisa Gabriela

Lugar de Trabajo: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Ciencias Químicas. Cátedra de Química General e Inorgánica, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular Prof. Alberto Boveris (IBIMOL, UBA-CONICET).

Fecha de presentación del ejemplar: 15 de abril de 2024

Fecha de defensa: 19 de noviembre de 2024

Agradecimientos

Quisiera, en principio, agradecer a la Prof. Dra. Marisa Repetto por haberme recibido en su laboratorio. Sus aportes han sido fundamentales para la confección del diseño de los experimentos y su aplicación, como también, para el fortalecimiento de mi desarrollo profesional en las áreas de investigación dentro de las ciencias básicas y aplicadas. Las experiencias y saberes transmitidos me permitieron tener una comprensión y acercamiento, no solo al estudio de las ciencias ambientales, sino también, al conocimiento y experimentación del estrés oxidativo desde una mirada integral. Con especial mención de su ayuda para permitirme obtener una beca de maestría como investigadora en formación, en la Universidad de Buenos Aires en el marco del proyecto financiado con los fondos UBACyT (Programación 2018: 20020170100197BA y 2023: 20020210300142BA).

Me gustaría, destacar la solidaridad y la colaboración del grupo de trabajo que forma parte del laboratorio de la Prof. Dra. Marisa Repetto. Sobre todo, la gran ayuda de la Dra. Fabiana Lairion, quien aportó importantes consejos para orientar la puesta a punto de los experimentos. Un orgullo, para mí, haber sido parte de su laboratorio en donde pude adquirir las experiencias y el conocimiento de las técnicas que hicieron a este trabajo. Además de las gratificantes tardes en las que compartimos el té, buena música y risas. También agradezco al grupo de trabajo del Dr. Christian Saporito Magriñá, que con paciencia e interés me ayudaron a comprender las nociones básicas de la bioquímica.

Un especial saludo al grupo de trabajo del Prof. Dr. Alberto Lazarowski y a todo el personal del Laboratorio de Hematología del Hospital de Clínicas “Jose de San Martín”. En especial al Bioq. Claudio Carbia, quien me transmitió todo su conocimiento en materia de neutrófilos humanos. Este equipo ha sido fundamental para la obtención de las muestras. Por ello, les agradezco la solidaridad y el apoyo que me brindaron.

Van mis reconocimientos a todo el personal de la Cátedra de Química General e Inorgánica del Departamento de Ciencias Químicas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y del Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular Prof. Alberto Boveris (IBIMOL, UBA-CONICET), por la enorme amabilidad con la que me trataron. Siempre me recibieron de forma muy respetuosa. Siento el más sincero orgullo de haber formado parte del Proyecto PICT 2020-001264 que lidera la Prof. Dra. Marisa Repetto, el cual depende de la Agencia Nacional de

promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). A quienes también envío mis sinceros agradecimientos.

Quisiera hacer una destacada mención a la Dra. Inés O'Farrel y a la Dra. Carolina González quienes desde el comienzo me guiaron con valiosos consejos, aportes de información y con la tan indispensable obtención de la toxina microcistina.

Por último y más que importante, le dedico esta tesis a mi Nona Sara, a quien siempre voy a llevar en mi corazón, a mi familia, a mi tan cercano compañero Ariel, y obviamente, a mis queridos michis, Akira I, Akira II y Sabbath, por ser mi sostén emocional.

ÍNDICE

Glosario de abreviaturas.....	7
Resumen.....	10
Abstract.....	13
1. Introducción.....	15
Problema de Investigación. Justificación de la investigación.....	17
1.1. Cianobacterias y cianotoxinas.....	19
1.1.1. Características generales.....	19
1.1.2. Características generales de las Microcistinas LR/hepatotoxina.....	20
1.1.3. Aspectos epidemiológicos de las MC.....	23
1.1.4. Aspectos toxicológicos de las MC.....	25
1.2. Estrés y daño oxidativo.....	27
1.2.1. Evolución del concepto de estrés Oxidativo.....	27
1.2.2. Especies reactivas del oxígeno.....	30
1.2.3. Estados estacionarios y vidas medias de las ROS.....	32
1.2.4. Oxidación de biomoléculas: fosfolípidos y proteínas.....	33
1.2.4.1. Peroxidación de lípidos.....	33
1.2.4.2. Oxidación de proteínas.....	35
1.2.5. Antioxidantes.....	35
1.2.6. Biomarcadores de estrés y daño oxidativo.....	37
1.2.7. Biomarcadores sistémicos.....	38
1.2.8. Biomarcadores de toxicidad de MC-LR. Estudios previos in vivo e in vitro.....	38
1.3.- Rol del hierro en el ambiente y en la salud de los seres vivos.....	41
1.3.1. El hierro como bioelemento.....	41
1.3.2. El hierro en los sistemas acuáticos: Su relevancia para las bacterias y cianobacterias.....	41
1.3.3. Función biológica, homeostasis y efectos tóxicos del hierro en la salud humana.....	43
1.4.- Impacto de las microcistinas en el sistema inmune.....	45
1.4.1. Rol de NADPH oxidasa en PMN.....	46
1.4.2. Fisiopatología asociada a la NADPH oxidasa de los PMN.....	50
1.4.3. Estrés oxidativo y respuesta inflamatoria de los PMN.....	50
1.4.4. Mecanismos de muerte celular en PMN.....	51
a. Apoptosis.....	51

b. Netosis (NET).....	52
1.5.- Propósito de la investigación.....	53
1.6.- Hipótesis de trabajo.....	53
2. Objetivos.....	54
2.1.- Objetivo general.....	55
2.2.- Objetivos específicos.....	55
3. Materiales y Métodos.....	56
3.1.- Metodología de trabajo.....	57
a. Primera etapa: Puesta a punto de los métodos y selección de la concentración óptima de trabajo de PMN y agentes tóxicos.....	59
a1. Obtención de las toxinas MC-LR.....	59
a2. Selección de las concentraciones de Fe^{2+}	61
a3. Obtención de PMN a partir de sangre entera	61
a4. Selección de la concentración óptima de células para la puesta a punto de las metodologías. Preparación de las muestras.....	63
b. Segunda etapa: Determinaciones bioquímicas para la evaluación de estrés y daño oxidativo en PMN.....	65
b1. Ensayo de viabilidad.....	65
b2. Respuesta y activación de PMN medido por Consumo de oxígeno.....	66
b3. Peroxidación lipídica medida por quimioluminiscencia espontánea.....	67
b4. Determinación del contenido de proteínas.....	68
b5. Oxidación de proteínas medida por la cantidad de proteínas carbonilo.....	69
b6. Oxidación de lípidos medida por la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	69
b7. Actividad de la NADPH oxidasa (NOX).....	70
b8. Contenido intracelular de Glutación reducido (GSH).....	70
b9. Índices de estimulación del estallido respiratorio y del daño oxidativo.....	71
3.2. Análisis estadístico.....	72
3.3. Instrumentos.....	72
3.4. Reactivos.....	73
3.3. Financiamiento.....	73

4. Resultados.....	75
4.1. Capítulo 1. Selección de concentración óptima de PMN.....	75
4.1.1. Procesamiento de la muestra.....	76
4.1.2. Ensayo de Viabilidad.....	76
4.1.3. Selección de concentración de PMN para consumo de oxígeno y quimioluminiscencia espontánea.....	76
4.1.4. Selección de concentración de células para evaluar daño oxidativo a biomoléculas.....	79
4.2. Capítulo 2. Daño oxidativo e inflamación en neutrófilos humanos expuestos a MC-LR.....	82
4.2.1.- Marcadores de inflamación.....	82
4.2.1.1. Estallido respiratorio celular. Consumo de oxígeno en PMN.....	82
4.2.1.2. PMN expuestos a MC-LR ($\mu\text{g/L}$) y cianuro.....	84
4.2.1.3. Actividad de NADPH oxidasa (NOX).....	85
4.2.2. Marcadores de daño oxidativo.....	86
4.2.2.1. Quimioluminiscencia espontánea.....	86
4.2.2.2. Oxidación de proteínas: contenido de carbonilos.....	87
4.2.2.3. Oxidación de lípidos: TBARS.....	89
4.2.2.4. Contenido de Glutación intracelular.....	89
4.2.2.5. Índices de estimulación del estallido respiratorio y del daño oxidativo.....	90
4.3. Capítulo 3. Daño oxidativo e inflamación en PMN humanos expuestos a hierro.....	93
4.3.1. Marcadores de inflamación.....	93
4.3.1.1. Estallido respiratorio celular. Consumo de oxígeno en PMN.....	93
4.3.1.2. PMN expuestos a Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$) y cianuro.....	95
4.3.1.3. Actividad de NADPH oxidasa (NOX).....	96
4.3.2. Marcadores de daño oxidativo.....	96
4.3.2.1. Quimioluminiscencia espontánea.....	96
4.3.2.2. Oxidación de proteínas: contenido de carbonilos.....	98
4.3.2.3. Oxidación de lípidos: TBARS.....	100
4.3.2.4. Contenido de Glutación intracelular.....	100
4.3.2.5. Índices de estimulación del estallido respiratorio y del daño oxidativo.....	101
4.4. Capítulo 4. Daño oxidativo e inflamación en neutrófilos humanos expuestos a hierro y MC-LR.....	104
4.4.1. Marcadores de inflamación.....	104
4.4.1.1. Estallido respiratorio celular. Consumo de oxígeno en PMN.....	104
4.4.1.2. PMN expuestos a Fe^{2+} , MC-LR y cianuro.....	107
4.4.1.3. Actividad de NADPH oxidasa (NOX).....	108

4.4.2. Marcadores de daño oxidativo.....	109
4.4.2.1. Quimioluminiscencia espontánea.....	109
4.4.2.2. Oxidación de proteínas: contenido de carbonilos.....	112
4.4.2.3. Oxidación de lípidos: TBARS.....	115
4.4.2.4. Contenido de Glutación intracelular.....	115
4.4.2.5. Índices de estimulación del estallido respiratorio y del daño oxidativo.....	118
 5. Discusión de resultados.....	 125
6. Conclusiones.....	133
7. Referencias bibliográficas.....	135
8. Glosario de palabras.....	153

Glosario de abreviaturas

ANOVA: análisis de la varianza

BHT: 3,5-di-ter-4-butilhidroxitolueno

BSA: seroalbúmina bovina

CAT: enzimas antioxidantes catalasa

CN⁻: cianuro

CO: Proteínas carbonilos

Co: Cobalto

Cu: cobre

DNPH: hidracina 2,4 dinitrofenilhidracina

DO: daño oxidativo

DTNB: ácido (5,5'-ditiobis)-2-nitrobenzoico

EDI: ingesta diaria estimada segura

EGC: enfermedad granulomatosa crónica

EPA: Environmental Protection Agency

ER: estallido respiratorio

FDA: Food Drugs Administration

Fe: hierro

Fe²⁺: hierro inorgánico o hierro reducido

Fe³⁺ : hierro orgánico

Fe-SOD: superóxido dismutasa localizada en el espacio intermembrana mitocondrial que contiene Fe

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión (antioxidante endógeno citosólico)

GSH-Px: Glutatión peroxidasa

GSSG: glutatión oxidado

H: átomo de hidrógeno

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HClO: ácido hipocloroso

HO[•]: radical hidroxilo

IDT: ingesta diaria tolerable

LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level (del inglés, nivel de menor efecto adverso observado)

LPS: lipopolisacáridos
 MC: microcistinas
 MC-LR: microcistina MC-LR/hepatotoxina
 MDA: Malondialdehído
 Mn-SOD: superóxido dismutasa de localización mitocondrial que contiene Mn
 NADPH oxidasa: complejo enzimático nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido oxidasa
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$: ditionito de sodio
 NET: trampas extracelulares de neutrófilos
 NF- κ B: factor de transcripción nuclear
 NO: óxido nítrico
 NOAEL: No Observed Adverse Effect Level (del inglés, nivel de efecto adverso no observable)
 O_2 : oxígeno molecular
 $^1\text{O}_2$: oxígeno singlete o singulete
 O_2^- : anión superóxido
 ΔO_2 : consumo de oxígeno
 OMS: Organización Mundial de la Salud
 ONOO^- : peroxinitrito
 PKC: proteína cinasa C
 PLC: cáncer primario de hígado
 PMA: éster de forbol 12 miristato 13 acetato
 PMN: células polimorfonucleares humanas o neutrófilos
 PP1 y PP2A: enzimas fosfatasas en los hepatocitos tipos 1 y 2A respectivamente
 QL: quimioluminiscencia espontánea de baja intensidad *in situ* que evidencia la oxidación de lípidos
 $\text{R}^\cdot$: átomo de carbono (alquilo) de un ácido graso poliinsaturado (RH)
 RH: ácido graso poliinsaturado
 $\text{ROO}^\cdot$: radicales peroxilo
 ROOH: hidroperóxidos orgánicos o lipohidroperóxidos
 ROS: especies reactivas del oxígeno
 SOD: enzima superóxido dismutasa
 TBA: solución de ácido tiobarbitúrico 0,7% P/V
 TBARS: ácido tiobarbitúrico

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante beta 1

TNB: 5-tio-2-nitrobenzoato

URL: unidades relativas de luminiscencia por min y por mg de proteína

Zn²⁺: zinc



Resumen

Resumen

Las floraciones o *bloom* de cianobacterias en diversos nichos ecológicos y zonas climáticas representan un problema de salud emergente. Estos fenómenos vinculados al cambio climático son temas de creciente importancia, tanto para Argentina como para el resto del mundo, en especial, por las características y el aumento en la frecuencia con que aparecen en cuerpos de aguas continentales. La principal fuente de exposición a las cianobacterias y sus toxinas es a través del agua de bebida o consumo. En Argentina, específicamente en las zonas de Salto Grande (Entre Ríos) y San Roque (Córdoba) las cianobacterias del género *Microcystis* sintetizan y liberan cianotoxinas al ambiente, especialmente en reservorios de agua (Giannuzzi y col., 2011) de consumo humano. La microcistina MC-LR/hepatotoxina (MC-LR) es una de esas cianotoxinas. Un oligopéptido con potente actividad hepatotóxica e inflamatoria con capacidad de aumentar la migración de neutrófilos humanos, la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad fagocítica, como también, es promotora de la formación de tumores. El límite de concentración de MC-LR permitido en aguas de bebida es de 1 µg/L y la ingesta diaria tolerable (IDT) se calcula en 0,04 µg/kg de peso corporal. El objetivo de esta Tesis de Maestría es caracterizar el estrés y daño oxidativo celular y la participación de las especies activas del oxígeno asociados a la respuesta inflamatoria en células polimorfonucleares humanas (PMN), neutrófilos, expuestos a diferentes concentraciones de MC-LR/hepatotoxina y de hierro, el cual, potenciaría la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton/Haber Weiss. En relación a esto se evaluaron los marcadores bioquímicos de daño y estrés oxidativo en un modelo experimental *in vitro* en PMN expuestas a dos agentes tóxicos ambientales, el hierro inorgánico (Fe^{2+}) y la MC-LR. Se utilizaron las dosis de MC-LR definidas en las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para aguas de red calculada en 1 µg MC-LR /L y 25 µg MC-LR/L, considerada en modelos experimentales sub agudos vinculadas con concentraciones 6 µg Fe^{2+} /L y 30 µg Fe^{2+} /L, adecuadas a partir del nivel estándar permitido en aguas de bebida por la OMS. Se empleó, también, una concentración de Fe^{2+} de 300 µg Fe^{2+} /L considerada en la literatura como tóxica. Los fenómenos inflamatorios se infirieron a partir de la determinación del consumo de oxígeno (ΔO_2) celular con un electrodo tipo Clark y la actividad del complejo enzimático nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido oxidasa (NADPH oxidasa) para la evaluación del estallido respiratorio (ER) y respuesta inflamatoria

respectivamente; quimioluminiscencia espontánea de baja intensidad *in situ* (QL) para evaluar la generación de ROS, principalmente oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$); daño oxidativo (DO) a biomoléculas, también medido por cuantificación de productos de oxidación de lípidos de membrana (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS) y de proteínas (carbonilos, CO); como el consumo de glutatión (antioxidante endógeno citosólico, GSH), con el propósito de estudiar la toxicidad de MC-LR en presencia de hierro. Se observó que la concentración de células en las técnicas empleadas para la evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación resultaron más sensibles en una concentración de 8×10^4 PMN/mL para las determinaciones de ΔO_2 y QL y de $1,5 \times 10^5$ PMN/mL a 5×10^6 PMN/mL para las determinaciones espectrofotométricas. Los principales resultados mostraron que en el rango de concentraciones permitidas en agua, el Fe^{2+} no activa el ER, inhibe la actividad de NADPH oxidasa y disminuye el contenido de GSH en PMN, sin embargo, genera DO por oxidación de lípidos (QL), pero no de proteínas (CO), con la mayor concentración permitida. MC-LR activa ER, pero inhibe la actividad de NADPH oxidasa y genera DO con incremento de $^1\text{O}_2$, oxidación de biomoléculas y consumo de GSH, aun en la concentración más baja, lo que sugiere que el DO intracelular está involucrado en los mecanismos de toxicidad. En presencia de ambos agonistas combinados, el Fe^{2+} , en la concentración máxima permitida en agua y en presencia de MC-LR (ambas concentraciones), aumenta el efecto activador del ER de MC-LR. Con la dosis tóxica de Fe^{2+} y subaguda de MC-LR, se inhibe la respuesta de ER de los PMN frente al estímulo, similar al efecto observado por el Fe^{2+} solo. En el rango de concentraciones permitidas la combinación de ambos no permite el aumento de QL que genera la máxima concentración permitida en agua de Fe^{2+} y ambas de MC-LR, debido probablemente a la disminución de la generación de ROS (oxígeno singulete) y del DO a las proteínas de los PMN que genera la combinación de los dos agonistas. La presencia de Fe^{2+} disminuye la oxidación de proteínas generada por MC-LR. La exposición a dosis permitidas de Fe^{2+} o de MC-LR en aguas de consumo y recreativas afecta la homeostasis redox intracelular de PMN, exponiendo a estas células, primera línea de defensa de un organismo a las infecciones, frente a un entorno tóxico y oxidativo que afecta su respuesta.

Title: Biomarkers of damage and oxidative stress in human neutrophils exposed to iron and the cyanotoxin microcystin LR/hepatotoxin.

Abstract

Blooms of cyanobacteria in various ecological niches and climatic zones represent an emerging health problem. These phenomena linked to climate change are issues of growing importance, both for Argentina and the rest of the world, especially due to the characteristics and the increase in the frequency with which they appear in bodies of continental waters. The main source of exposure to cyanobacteria and its toxins is through drinking water. In Argentina, specifically in the areas of Salto Grande (Entre Ríos) and San Roque (Córdoba), cyanobacteria of the *Microcystis* genus synthesize and release cyanotoxins into the environment, especially in water reservoirs. Microcystin MC-LR/hepatotoxin (MC-LR) is one of these cyanotoxins, it is an oligopeptide with potent hepatotoxic and inflammatory activity, as it increases the migration of human neutrophils, the formation of reactive oxygen species (ROS) and the ability phagocytic, as well as promoting tumor formation. The concentration limit of MC-LR allowed in drinking water is 1 µg/L and the tolerable daily intake (TDI) calculated at 0.04 µg/kg body weight. The objective of this Master's Thesis is to characterize cellular oxidative stress and damage and the participation of active oxygen species associated with the inflammatory response in human polymorphonuclear cells (PMN), neutrophils, exposed to different concentrations of MC-LR/hepatotoxin and of iron, which would enhance the formation of free radicals through the Fenton/Haber Weiss reaction. Biochemical markers of damage and oxidative stress were evaluated in an in vitro experimental model in human polymorphonuclear cells (PMN) exposed to two environmental toxic agents, inorganic iron (Fe^{2+}) and MC-LR. The MC-LR doses defined in the World Health Organization (WHO) guidelines for tap water were used (1 µg MC-LR/L and 25 µg MC-LR/L, for sub-acute experimental models) and concentrations of 6 µg Fe^{2+} /L and 30 µg Fe^{2+} /L, considered from the standard level allowed by the WHO, and a Fe^{2+} concentration of 300 µg Fe^{2+} /L, considered toxic, was also used. Cellular oxygen consumption (ΔO_2) was determined with a Clark-type electrode and the activity of the enzyme complex nicotinamide adenine dinucleotide reduced phosphate oxidase (NADPH oxidase) for the evaluation of the respiratory burst (RB) and inflammatory response respectively; in situ low-intensity spontaneous chemiluminescence (CL) to

evaluate the generation of ROS, mainly singlet oxygen ($^1\text{O}_2$); oxidative damage (OD) to biomolecules, also measured by quantification of oxidation products of membrane lipids (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) and proteins (carbonyls, CO); as well as the consumption of glutathione (endogenous cytosolic antioxidant, GSH), with the purpose of studying the toxicity of MC-LR in the presence of iron. It was observed that the concentration of cells at which the techniques used for the evaluation of biomarkers of oxidative stress and inflammation were most sensitive were 8×10^4 PMN/mL for the determinations of ΔO_2 and CL and from $1,5 \times 10^5$ PMN/mL to 5×10^6 PMN/mL for spectrophotometric determinations. The main results showed that in the range of concentrations allowed in water, Fe^{2+} does not activate the ER, inhibits the activity of NADPH oxidase and decreases the GSH content in PMN, however it generates OD by lipid oxidation (CL), but not by proteins (CO), with the highest concentration allowed. MC-LR activates RB and generates OD with an increase in $^1\text{O}_2$, oxidation of biomolecules and consumption of GSH, even at the lowest concentration, suggesting that DO is involved in the toxicity mechanisms. In the presence of both agonists combined, Fe^{2+} , at the maximum concentration allowed in water and in the presence of MC-LR (both concentrations), increases the RB-activating effect of MC-LR. With the toxic dose of Fe^{2+} and subacute dose of MC-LR, the ER response of PMNs to the stimulus is inhibited, similar to the effect observed by Fe^{2+} alone. In the range of permitted concentrations, the combination of both does not allow the increase in CL that generates the maximum concentration allowed in water of Fe^{2+} and both of MC-LR, probably due to the decrease in the generation of ROS (singlet oxygen) and OD to the PMN proteins generated by the combination of both agonists. Exposure to permitted doses of Fe^{2+} or MC-LR in drinking and recreational waters affects the intracellular redox homeostasis of PMN, exposing these cells, the first line of defense of an organism to infections, to a toxic and oxidative environment that decreases its response.



1. Introducción

1. Introducción

En los inicios de la vida en la Tierra, el oxígeno molecular (O_2) no estaba presente en la atmósfera. Ésta era esencialmente reductora, con predominio de hierro (Fe) y gases en su composición. Tanto la abundancia natural de este elemento como sus propiedades redox lo predispusieron a desempeñar un papel crucial en las primeras etapas de la vida terrestre. Sin embargo, hace mil millones de años, a partir de la aparición de las cianobacterias, organismos procariontes fotosintéticos, se generó el O_2 , con la consecuente modificación de la composición de la atmósfera terrestre (Crichton, 1991). Para que el O_2 alcanzara una concentración significativa en la atmósfera (21%) se necesitaron alrededor de 200 a 300 millones de años, un tiempo relativamente corto en una escala temporal geológica.

En este contexto se iniciaron los procesos oxidativos, mediante la reacción entre el O_2 producido por la fotosíntesis bacteriana y los iones ferrosos presentes en los océanos, con generación de hidróxidos de hierro insolubles que precipitaron en medios acuosos (Crichton, 1991).

Entrando en el período Antropoceno, nueva época geológica caracterizada por el impacto humano sobre la Tierra, los ecosistemas terrestres se vieron afectados (Steffen, y col., 2011; Allan y Watts, 2018). Los cambios provocados en la naturaleza por la erosión o las actividades humanas, así como por los desechos agrícolas y urbanos, aumentan el flujo de nutrientes y sustancias orgánicas en el sistema acuático con consecuencias en las características cuali y cuantitativas de los cuerpos de agua (Bauzá y Giannuzzi, 2017). Por estar sujetos a la contaminación antropogénica, se convierten en ecosistemas eutrofizados, asociados a frecuentes brotes de cianobacterias.

La eutrofización cultural, artificial o antropogénica es causada por el vertido de efluentes domésticos y/o industriales y de la descarga de fertilizantes utilizados en la agricultura, que acelera el proceso de enriquecimiento tanto de las aguas superficiales como subterráneas (Pearson y Neila, 2008).

Dicho contexto, el exceso de nitrógeno, fósforo, hierro, dióxido de carbono, temperaturas elevadas, luz y cambios de pH, agravados por el cambio climático, favorecen el desarrollo de las masas de cianobacterias como grupo competitivamente exitoso contra el resto del fitoplancton (Pearson y col., 2010; Aguilera y col., 2017).

Problema de Investigación. Justificación de la investigación

La exposición humana a las microcistinas representa un riesgo para la salud. En gran parte se da a través del agua de consumo humano con floraciones de cianobacterias, aunque también pueden ser incorporadas por la ingesta de peces, moluscos y mariscos, presentes en los cuerpos de agua en las que proliferan las cianobacterias (Neilan y col., 2012). Otras fuentes de exposición pueden ser la ingesta de alimentos como verduras y suplementos dietéticos de algas en contacto con las aguas contaminadas, así como la exposición a través de actividades recreativas (Codd y col., 1999; Backer, 2008; Rastogi, 2014; Xiang y col., 2019).

Las cianobacterias pueden alcanzar concentraciones potencialmente peligrosas para la salud humana, sobre todo cuando se produce una alta densidad celular por una proliferación excesiva, lo que se conoce como «floraciones» (OMS, 2006). Significativamente, los cuerpos de agua en los que ocurre el fenómeno se utilizan con fines recreativos o como fuentes de agua potable, por ello las personas y los animales pueden estar expuestos a las cianobacterias y sus toxinas a través de varias vías: inhalatoria, oral o por contacto (Vidal y col., 2017) y sufrir daños en la salud a corto o largo plazo.

Las floraciones o *blooms* de cianobacterias en diversos nichos ecológicos y zonas climáticas representan un problema de salud emergente (Kujbida y col., 2008; Sedan y Andrinolo, 2017). En la Argentina, en los últimos años, se reportaron la presencia de cianobacterias en las costas del Río de La Plata, a la altura de Berisso y Ensenada; en el municipio de Tigre; en la laguna bonaerense Gómez, en Junín; en el lago San Roque (Figura 1) de la provincia de Córdoba; en lagunas de Santa Fe como Juan de Garay, en Santo Tomé, y Setubal, en la capital; y en el Río Uruguay a la altura de la provincia de Entre Ríos (Ministerio de Salud, 2022).

En la Figura 1 se muestra una foto del Lago San Roque en la que se puede observar el cambio de color del agua y la presencia de cianobacterias que la contaminan, junto al paredón del dique, a unos pocos cientos de metros donde se toma el fluido para llevar agua potable a la Ciudad de Córdoba.



Figura 1. Agua del lago San Roque junto al paredón del Dique, a pocos cientos de metros donde Aguas Cordobesas toma el fluido para llevar agua potable a la ciudad. (Tomado de Medardo Avila Vazquez. (16 de enero de 2019). *Cianotoxinas en aguas de consumo humano*. Red Universitaria de Ambiente y Salud/Médicos de Pueblos Fumigados. Página web: <https://reduas.com.ar/cianotoxinas-en-aguas-de-consumo-humano/>)

Entre las tantas toxinas de cianobacterias, las microcistinas son el grupo mejor investigado y probablemente que se encuentra con mayor frecuencia en aguas dulces (Stewart, 2006, US EPA, 2006). Las cepas de cianobacterias productoras de toxinas microcistinas (MC), como *Microcystis aeruginosa*, tienen una distribución cosmopolita y prosperan en una variedad de climas, lo que convierte a estos organismos en una amenaza global para la salud de los seres vivos y el ambiente (Pearson y col., 2010). En las zonas de clima templado, la proliferación de cianobacterias se produce más a menudo en verano y a principios de otoño, cuando hace mucho calor, la exposición al sol es mayor y la temperatura del agua es superior a los 20 °C. En la cuenca del Plata, una de las cianobacterias más tóxicas y más frecuente es *Microcystis* sp., que a menudo produce MC-LR y [D-Leu1] MC-LR (Codd y col., 1999; Andrinolo y col., 2007; Backer, 2008; Rastogi, 2014; Xiang y col., 2019).

Por ello, la falta de agua dulce de buena calidad es uno de los problemas más serios de la actualidad. La OMS, en su tercera edición de Guías de Calidad del Agua de Bebida, aborda las formas en las que se puede garantizar la inocuidad microbiana del agua de consumo por medio de la protección de las fuentes, el control de los procesos de tratamiento, la adecuada distribución y el manejo a nivel de los domicilios (Aguilera y col., 2017).

En la presente tesis se busca alcanzar conclusiones a partir de determinaciones y diversos biomarcadores estudiados en modelos *in vitro*. Los estudios *in vitro* constituyen una herramienta adecuada e importante que permite profundizar en el conocimiento de la inmunotoxicidad de las MC. Hasta el momento se han empleado diferentes modelos celulares para investigar la inmunotoxicidad de MC-LR, entre los que se destacan, el efecto sobre los leucocitos humanos (Mankiewicz y col., 2001; Lankoff, 2004; Kujbida y col., 2006; Mankiewicz-Boczek, J, 2011). Las PMN se seleccionaron como modelo celular bioquímico para este estudio porque son células humanas accesibles que permiten investigar la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por el complejo multiproteico sistema oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH oxidasa, NOX). La comprensión de los mecanismos fisiopatológicos asociados al estrés oxidativo en PMN permite hacer evidentes y cuantificables los efectos y daños, es decir la inmunotoxicidad, que causa la exposición a los dos contaminantes ambientales, MC-LR y Fe^{2+} .

1.1. Cianobacterias y cianotoxinas

1.1.1. Características generales

Las cianobacterias, que surgieron en los inicios de la atmósfera y mantienen su existencia hasta nuestros tiempos, proliferan principalmente en lagos, embalses, lagunas y ríos con poca corriente (OMS, 2006; Aguilera y col., 2017). Sin embargo, su desarrollo natural se ha visto modificado por la acción humana, en gran parte por el aporte desmedido de nutrientes de las descargas cloacales a los cuerpos de agua dulce, el uso creciente de fertilizantes y el endicamiento de los ríos (formación de diques en los cauces de los ríos debido a deslizamientos de las laderas del valle por el cual corre el río) (Aguilera y col., 2017).

Son varios los géneros de cianobacterias que producen Microcistina MC-LR. Las especies reconocidas que sintetizan este tipo de cianotoxina se encuentran dentro del género *Microcystis* sp., *Anabaena* sp., *Cylindrospermopsis* sp., *Pseudanabaena* sp., *Planktothrix* sp., *Planktolyngbya* sp., y *Merismopedia* sp. (Figura 2). Las cianobacterias toxigénicas generan distintas clases de cianotoxinas: neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas y toxinas irritantes (Pearson y Neila, 2008; Huang y Zimba, 2019). Existe una gran cantidad de afecciones gastrointestinales y hepáticas relacionadas con la liberación de las cianotoxinas al agua, ya sea natural o artificialmente (Sedan y

Andrinolo, 2017). De todas ellas, las hepatotoxinas (microcistinas y nodularina) y las neurotoxinas (anatoxina, saxitoxina y cilindrospemosina) son las más peligrosas para la salud de los seres vivos y el ambiente (Andrinolo y col., 2007; Pearson y Neila, 2008).

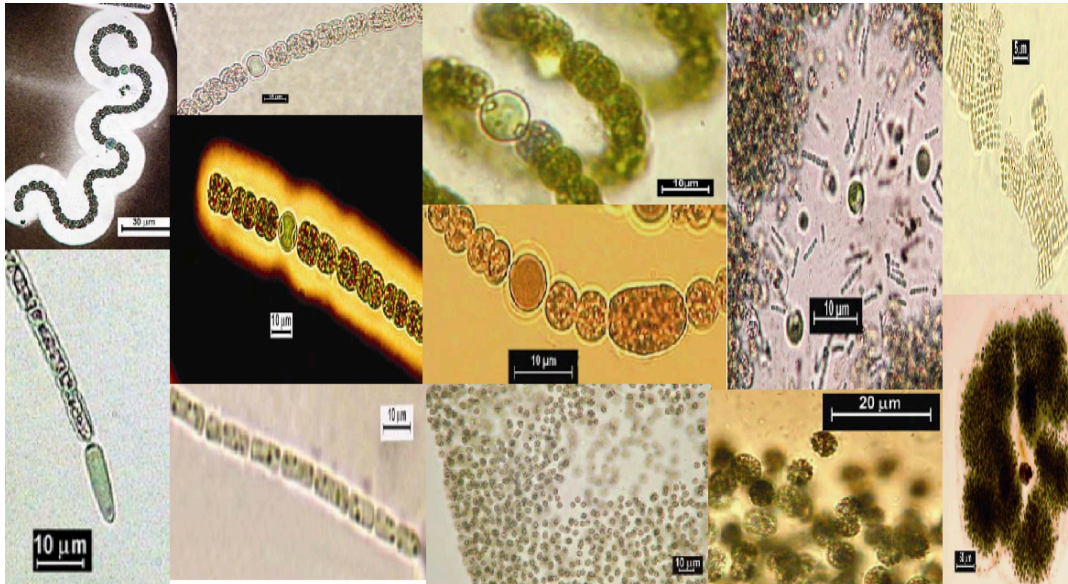


Figura 2. Distintos géneros de cianobacterias producen Microcistina MC-LR. Las especies reconocidas que sintetizan este tipo de cianotoxina se encuentran dentro del género *Microcystis* sp., *Anabaena* sp., *Cylindrospermopsis* sp., *Pseudanabaena* sp., *Planktothrix* sp., *Planktolyngbya* sp., y *Merismopedia* sp. (Tomado de UNESCO. (2009). *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. Sylvia Bonilla (editora). Documento Técnico PHI-LAC, N° 16

1.1.2. Características generales de las Microcistinas LR/hepatotoxina

Las microcistinas (MC) constituyen el grupo más común de cianotoxinas, presentes en estuarios, estanques y reservorios de agua. Tienen la capacidad de generar daño hepático agudo, incluso letal, por su abundancia, resistencia y toxicidad en varias especies de animales domésticos, vida silvestre y humanos expuestos (Vidal y col., 2017). Sus células diana son principalmente los hepatocitos y macrófagos, a partir de las cuales provocan el colapso de la organización tisular, necrosis y hemorragia intra-hepática (Ruiz y col., 2008).

La estructura química de las MC consiste en un heptapéptido cíclico, formada por siete aminoácidos: D-alanina, D-eritro- β -Metil-Aspártico, 3- amino-9-metoxi-2, 6, 8-trimetil-10-fenildeca-4, 6-ácido dienoico, D-glutámico, N-metildehidro-Alanina, con la formula química de “Cyclo (-D-Ala-L-X-D-eritro- β -Me-Asp-L-Y-ADDA-D-Glu-Mdha)” (Pérez-Vázquez, y col., 2018) (Figura 3).

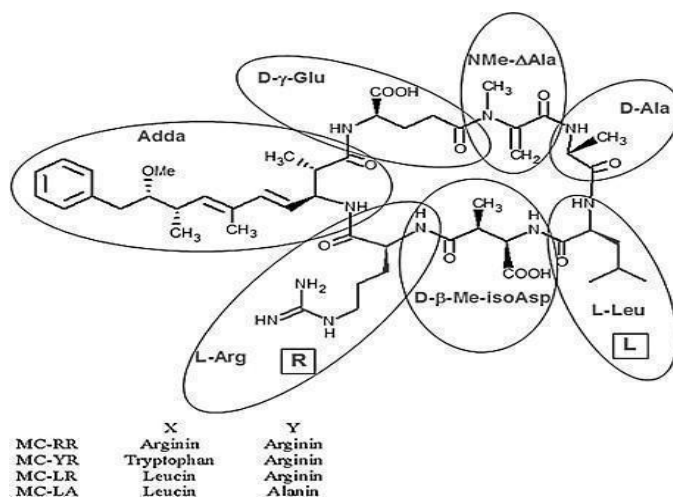


Figura 3.- Estructura cíclica de las MC formada por siete aminoácidos: D-alanina, D-eritro- β -Metil-Aspártico, 3- amino-9-metoxi-2, 6, 8-trimetil-10-fenildeca-4, 6-ácido dienoico, D-glutámico, N-metildehidro-Alanina, con la fórmula química de “Cyclo (-D-Ala-L-X-D-eritro- β -Me- Asp-L-Y-ADDA-D-Glu-Mdha)”. Fuente: Recuperada y modificada de De Luca y col. (2010) y publicada en Pérez-Vázquez y col. (2018)

En la estructura cíclica molecular de la MC-LR el grupo R consiste en un grupo metilo ($R = CH_3$) en la fórmula cyclo y en la $[\Delta Asp^3]$ -MC-LR, el grupo R es un átomo de hidrógeno ($R = H$) (Kujbida y col., 2006) (Figura 4).

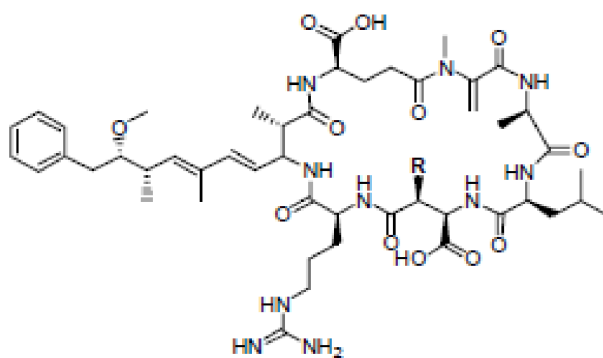


Figura 4.- Estructura molecular de MC-LR ($R = CH_3$) y $[\Delta Asp^3]$ -MC-LR ($R = H$). Tomada de Kujbida y col., 2006

En cuanto al metabolismo y mecanismo de toxicidad en el organismo de MC-LR se sabe que la principal ruta de exposición a las MC es a través del agua de bebida. MC-LR se absorbe inicialmente en el estómago (Sedan y col., 2010), sin embargo, la principal vía de absorción de esta toxina es el intestino delgado. En un estudio realizado en ratones expuestos a MC-LR se reportó que las vellosidades del intestino delgado de estos animales contenían una gran cantidad de MC-LR tanto en las células epiteliales superficiales como en la lámina propia. La MC-LR absorbida pasa al plasma sanguíneo, y se distribuye al hígado, al pulmón y al corazón, y finalmente llega a los capilares de todo el cuerpo. La excreción de MC-LR se realiza en la mucosa de las células caliciformes tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso (Ito y col., 2000).

En cuanto a sus efectos tóxicos, las MC presentan una potente hepatotoxicidad y actividad promotora de tumores. Se les asocia un papel importante como reguladoras del desarrollo del cáncer y de la tumorigénesis espontánea (Moreno y col., 2005; Kujbida y col., 2008). El mecanismo de acción más reconocido consiste en la inactivación de las enzimas fosfatasa en los hepatocitos, especialmente los tipos 1 y 2A (PP1 y PP2A respectivamente) efecto que genera en consecuencia cambios morfológicos de estas células, proliferación celular y cáncer, o apoptosis, necrosis y muerte celular con abundante infiltrado inflamatorio de células polimorfonucleares (PMN) (Mankiewicz y col., 2001; De Visser y col., 2006; Zhong y col., 2020).

En varios estudios se demuestra que MC-LR y [Asp3]-MC-LR aumentan la migración de neutrófilos humanos, la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad de destrucción de microorganismos por fagocitosis (Kujbida y col., 2006). Existe evidencia que la infiltración de leucocitos (neutrófilos) en el hígado causa la lesión hepática inducida por la intoxicación aguda con MC (Kujbida y col., 2008; US EPA, 2015). Si bien los mecanismos de hepatotoxicidad aún no están claros, la infiltración de neutrófilos en el hígado puede desempeñar un papel importante en el desencadenamiento de la lesión tóxica y el desarrollo de tumores (Kujbida y col., 2006). Los neutrófilos pueden contribuir significativamente a la patogénesis de la lesión hepática. Así es que la migración de PMN al hígado incrementa la toxicidad de MC-LR mediante la activación de procesos inflamatorios, aumento de la actividad de sistemas enzimáticos que generan diversas sustancias químicas tóxicas, entre ellas el anión hipoclorito y ROS (principalmente anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singulete (1O_2) (Jaeschke y col., 2002).

En consecuencia, se reconoce que la toxicidad de las MC en humanos está asociada a hepatotoxicosis, evidenciado por un significativo aumento de biomarcadores de daño hepático (Gianuzzi y col., 2011). Sin embargo, los primeros métodos de diagnósticos de cianobacterias tóxicas resultan complicados de interpretar porque los rasgos fisiológicos y las características morfológicas (tamaño y forma de las células) no se correlacionan bien con la toxicidad, por ello, la baja sensibilidad, las cuestiones éticas y los altos costos asociados han impulsado la búsqueda de métodos de prueba alternativos (Pearson y Neila, 2008).

1.1.3. Aspectos epidemiológicos de las MC

Tanto la intoxicación aguda como crónica con MC-LR causa efectos nocivos sobre la salud humana y en la vida de plantas y animales. Afectan la agricultura, pesca y ganadería, los alimentos y el ecosistema. La OMS predice el riesgo de la toxicidad aguda de MC-LR. Clasifica la probabilidad de los efectos agudos en la salud en relación a la concentración de cianobacterias y de MC-LR en el agua (Tabla 1). Sin embargo, esta clasificación no contempla el daño por exposición crónica y efectos de carácter genotóxico, mutagénico y teratogénico, que pueden suscitarse mediante una exposición prolongada a bajas concentraciones de la toxina, durante largos periodos de tiempo. Prolongados estados de inflamación agudos o crónicos incrementan el daño tisular, como una respuesta fisiológica que desencadena efectos tóxicos por la exposición sostenida a la toxina (Pérez-Vázquez y col., 2018).

Tabla 1. Valores guía de la OMS para la Probabilidad Relativa de Efectos Agudos para la Salud, durante la exposición a cianobacterias y MC-LR en aguas destinadas para el consumo humano y recreación. Fuente: Recuperado y modificado de Chorus y Bartram, 1999. (Pérez-Vázquez y col., 2018).

Probabilidad Relativa de Efectos Agudos a la Salud	Cianobacterias (microorganismos/mL)	MC-LR (µg/L)
Baja	<20.000	<10
Moderada	20.000 – 100.000	10 – 20
Alta	100.000 – 10.000.000	20 – 2.000
Muy Alta	>10.000.000	>2.000

Respecto a la toxicidad aguda, uno de los hechos epidemiológicos más significativos asociados a la contaminación con cianobacterias en el agua potable ocurrió en 1996 en Brasil, donde 60 pacientes en diálisis murieron por insuficiencia hepática aguda resultante de la contaminación por MC (MC-LR, -YR y -AR) (Figura 3) del agua utilizada para hemodiálisis y 131 resultaron con intoxicación severa (Kujbida y col., 2008).

Algunos de los efectos agudos que se pueden presentar tras una única exposición a elevadas concentraciones de MC-LR son la irritación de la piel, ojos, oídos y boca, que suele involucrar descamación, erupciones y aparición de ampollas. Por ingesta accidental, algunos de los síntomas más comunes incluyen: daño en el hígado (hepatoenteritis con hepatomegalia, dolor abdominal y elevación de enzimas hepáticas séricas como γ -glutamyltransferasa), daño renal (acompañado de pérdida de electrolitos, glucosa, cetonas y sangre en la orina), afecciones en el tracto digestivo (gastroenteritis aguda, dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarreas), en el tracto respiratorio (dolor de garganta, tos seca y neumonía atípica) y otras afecciones como episodios alérgicos, síntomas de asma, fiebre, cefaleas, fatiga y mareos (Falconer, 1999; Carmichael, 2001; Moreno, 2002; Chorus y Bartram, 2021).

Los niveles crónicos y subcrónicos de MCs en agua de bebida y baño son poco contemplados en las normativas internacionales.

En cuanto a los estudios epidemiológicos relacionados con la toxicidad crónica con MC-LR uno de los factores responsables del daño a la salud humana es el desarrollo de carcinogénesis. Los resultados de algunos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que las floraciones de cianobacterias, asociadas a otros factores de riesgo, pueden causar una mayor incidencia de algunos tipos de cáncer (cáncer primario de hígado, cáncer cerebral, cáncer de corazón, mediastino y pleural, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer retroperitoneal y peritoneal, leucemia y melanoma maligno de pie) (Svirčev y col., 2019). La exposición crónica a concentraciones subletales de MC es la intoxicación más común en animales salvajes, domésticos y en humanos (Ueno y col., 1996; Zhao y col., 2009).

En un estudio realizado en el municipio de Poncitlán, Jalisco, México, las concentraciones de MC-LR y MC-RR encontradas en el agua del Lago de Chapala oscilaron entre 0,6 y 0,013 $\mu\text{g/L}$.

Estos niveles alertan sobre una posible exposición crónica de la toxina por parte de la población de esta área, aunque se encuentran por debajo del límite provisional de 1 µg/L sugerido por la OMS (Pérez Vázquez y col., 2018).

Las afecciones crónicas de carácter genotóxico, mutagénico y teratogénico, que pueden suscitarse mediante una exposición prolongada a bajas concentraciones de la toxina, durante largos periodos de tiempo, son el cáncer primario de hígado (PLC) reconocido como la principal patología (OMS, 1998; y Ruiz y col., 2010), seguido por afecciones maternas, embrionarias y fetales, dadas por la capacidad de las MC para traspasar la barrera placentaria, y provocar desde la disminución de peso corporal y daño hepático, hasta la muerte embrionaria, malformaciones y retardo en el crecimiento fetal (Moreno y col., 2003; Bu y col., 2006; Pérez y col., 2008).

1.1.4. Aspectos toxicológicos de las MC

Dada la elevada toxicidad que representan las MC y su capacidad para bioacumularse y biomagnificarse a través de la cadena alimenticia, algunos países occidentales las consideran como uno de los principales compuestos contaminantes de las aguas dulces, hasta llegar a superar en importancia a los metales pesados y plaguicidas (Ward y Beattie, 1999).

Las guías de la OMS definen los requisitos de inocuidad y desarrollan pautas de seguridad del agua con límites umbrales permitidos en agua de bebida para MC-LR total (libre y unida a célula) en 1 µg/L e Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de 0,4 µg/kg (OMS, 2006). Sobre esta directriz, se estima que la IDT es de 0,04 µg/kg para el MC-LR y la ingesta diaria estimada segura (EDI) para un adulto de 60 kg es de 2,4 µg/día.

A partir de ello, múltiples estudios indican que los valores de EDI de MC pueden exceder el IDT después del consumo de agua, pescado y vegetales contaminados. Por ejemplo, en las poblaciones que consumieron pescado y agua contaminados de lagos en América del Norte y África, se estimó que todas las poblaciones, menos una, excedían el IDT, con una población que tenía un EDI de 180 µg/día (Poste y col., 2011). Otro estudio calculó un EDI de 4,7 µg/día para las personas que consumieron 300 g de pescado de granjas acuícolas del sudeste asiático (Greer y col., 2017; Arman y Clarke, 2021).

Se informó que el riego de cultivos a partir de fuentes de agua contaminadas introducía microcistinas en los vegetales (Massey y col., 2018). Un estudio realizado en el sur de China informó altas concentraciones de MC-LR, MC-RR y MC-YR (Figura 3) en vegetales, con casi el 60% de los vegetales que representan un riesgo para la salud de moderado a alto después del consumo. Otro estudio cuantificó MC-LR en cuatro variedades de hortalizas de hoja después de la aplicación de cianobacterias y calculó un EDI que oscilaba entre 0,18 y 1,32 µg/día (Xiang y col., 2019; Xiang y col., 2020).

Estos datos ilustran el riesgo de exposición humana a MC en múltiples niveles tróficos de la red trófica causado, en parte, por la bioacumulación en pescados, mariscos y vegetales (Rohrlack, 2001; Smith y Haney, 2006; Miller y col., 2010; Rastogi, 2014; Svirčev, 2019; Xiang y col., 2019).

La exposición a MC a través del agua potable y los informes de estrés hepático y gastrointestinal han sido documentados por varios grupos de investigación (McCarty y col., 2016). La exposición crónica a la MC a través del agua potable, también, se ha relacionado con varios efectos adversos para la salud, como una mayor incidencia de cáncer de hígado y otras dolencias hepáticas crónicas (Svirčev y col., 2019).

Según refiere el texto de Giannuzzi y col. (2018), *Toxicología general y aplicada*, en relación a los diversos estudios que se han desarrollado es importante destacar que la mayoría de ellos centran sus objetivos en determinar los niveles NOAEL, “No Observed Adverse Effect Level” (del inglés, nivel de efecto adverso no observable). Estos niveles se asocian a la mayor dosis de sustancia en experimentación o en observación que causa alteración no detectable en la morfología, capacidad funcional o en el desarrollo del organismo blanco. Es decir, que el daño no resulta distinguishable en el crecimiento del organismo blanco en condiciones definidas de exposición. Se expresa en mg/kg de peso corporal/día (Giannuzzi y col., 2018).

Por otro lado, el LOAEL, “Lowest Observed Adverse Effect Level” (del inglés, nivel de menor efecto adverso observado), es la menor concentración o cantidad de sustancia empleada en experimentación que causa una alteración adversa en la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo de la vida en el organismo blanco. Se expresa en mg/kg peso corporal/día (Giannuzzi y col., 2018).

En relación a los estudios subcrónicos, los mismos se desarrollaron durante un período de 90 días y se realizaron en dos especies (perro, rata para Food Drugs Administration (FDA) rata y ratón para Environmental Protection Agency (EPA) y por

la vía de exposición prevista (Giannuzzi y col., 2018). Para los estudios que involucran la evaluación toxicológica de especies contaminantes se emplean al menos tres dosis:

- ❖ Una dosis alta que produce toxicidad, pero con nivel de mortalidad menor al 10%,
- ❖ Una dosis baja que no produce efectos tóxicos evidentes y
- ❖ Una dosis intermedia.

En cuanto a la célula diana empleada, los estudios realizados por Kujbida y col. (2006) con MC-LR en PMN mostraron que el mecanismo de toxicidad de MC-LR involucra dos pasos iniciales: la toxina aumenta la adherencia espontánea de los neutrófilos y migración al hígado, siendo ambos importantes para la generación de los procesos inflamatorios que acompañan la toxicidad de MC-LR. El primer paso consiste en el movimiento de PMN desde el torrente sanguíneo hacia el sitio de acumulación de la toxina, el hígado. El efecto quimiotáctico de MC-LR puede causar un incremento del flujo de células inflamatorias en respuesta al efecto tóxico, que en consecuencia daña al citoplasma de los hepatocitos, generan necrosis, hemorragia hepática y fibrosis. Este daño celular promueve la migración de PMN y el efecto se ve amplificado por la actividad quimiotáctica de MC-LR. La extravasación de PMN activa la liberación de ROS, causa estrés oxidativo y daño tisular, que puede visualizarse por emisión de luz (quimioluminiscencia) en menos de una hora de la exposición (Kujbida y col., 2006).

1.2. Estrés y daño oxidativo

1.2.1. Evolución del concepto de Estrés oxidativo

El término "estrés oxidativo" fue introducido originalmente por Helmut Sies en 1985, para denotar "una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor del primero" que afecta el estado estacionario de las células. Por eso, el concepto de estrés oxidativo describe un desequilibrio entre la tasa fisiológica de producción de oxidantes y la velocidad del sistema de defensa antioxidante que permite mantener el daño oxidativo biológico en un mínimo (Sies 1991a; Boveris y col., 2008; Repetto y col., 2010). Ya en el año 1954, la científica argentina Rebeca Gerschman hacía referencia a la toxicidad del oxígeno en los sistemas biológicos (Gerschman y col., 1954), donde postulaba que los productos de la reducción parcial del oxígeno, anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO^\bullet$) son las especies químicas responsables de la toxicidad del oxígeno y la irradiación X, que muestran un efecto

sinérgico entre el oxígeno hiperbárico y la radiación X en la supervivencia de los ratones expuestos. Un aumento de la radiación X o una disminución en la defensa antioxidante celular (un concepto nuevo en ese momento) conduciría igualmente al daño celular.

Las especies químicas que resultan de la reducción parcial del oxígeno, el O_2^- , H_2O_2 y $HO^\bullet$, fueron descritos tempranamente por Michaelis en 1946 (Michaelis, 1946). En ese momento, Mann y Quastel reconocieron los efectos tóxicos del oxígeno y el H_2O_2 en el metabolismo del cerebro (Mann y Quastel, 1946). La confirmación de la visión de Gerschman sobre la toxicidad del O_2^- y del H_2O_2 fue establecida por el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en 1969, que demostraba la existencia biológica del O_2^- (McCord y Fridovich, 1969) y por el establecimiento del “dogma de Fridovich” en 1975, en el que la SOD y la catalasa fueron reconocidas como enzimas necesarias para la vida aeróbica en las bacterias (McCord y col., 1971).

Posteriormente, Seim (1982) introdujo el concepto de especies reactivas del oxígeno (ROS) para describir la quimioluminiscencia del luminol de los monocitos humanos activados. Originalmente, ROS significaba O_2^- , H_2O_2 y $HO^\bullet$ extracelulares (Seim, 1982). Posteriormente el concepto se amplió a la situación intracelular y la lista de ROS creció con el tiempo. Hoy en día se acepta que incluye, además de estas especies, algunos intermediarios de la peroxidación lipídica mediada por radicales libres, tales como $ROO^\bullet$ (radical peroxilo) y 1O_2 (oxígeno singlete o singulete) y también peroxinitrito ($ONOO^-$), este último es el producto de la reacción entre el NO (óxido nítrico) y el O_2^- (Chance y col., 1979; Boveris y col., 2008).

Desde el año 2008 se ha empezado a diferenciar el estrés oxidativo, como situación reversible, del daño oxidativo como situación irreversible, pero el límite no está claro. Sin embargo, la diferencia podría definirse como análoga a la que existe entre una lesión celular reversible y una lesión irreversible en la patología celular clásica (necrosis) (Boveris y col., 2008).

El estrés oxidativo, desde el punto de vista químico, implica un aumento de la velocidad de las reacciones bioquímicas en cadena mediadas por radicales libres endógenos. Un radical libre es una especie química que posee uno o más electrones desapareados y, por lo tanto, son muy reactivos. El aumento en las velocidades de reacción va acompañado de incrementos de las concentraciones en estado estacionario de intermediarios oxidativos (Boveris y Repetto, 2020), en la velocidad de

incorporación de O₂ en las reacciones de radicales libres y en el contenido de productos finales de oxidación (Gonzalez Flecha y col., 1993).

Por otro lado, D.P. Jones (2006) introdujo desde un punto de vista mecanicista el nuevo concepto de estrés oxidativo, al definirlo como una interrupción en la señalización y el control redox. La adopción de tal definición podría redirigir la investigación para identificar perturbaciones claves de la señalización y la homeostasis redox y conducir a nuevos tratamientos para los procesos patológicos relacionados con el estrés oxidativo (Jones, 2006, 2008). La implicación central del estado redox del glutatión (GSH) reducido y glutatión oxidado (GSSG) fue establecida por la hipótesis redox (Sies, 2007; Kemp y col., 2008), que amplió el concepto clásico de estrés oxidativo definido por Sies en 1991. Esta hipótesis plantea que el estrés oxidativo es un proceso que altera el equilibrio (dinámico) redox de los grupos tioles, en los compuestos moleculares de bajo peso molecular como el GSH, o en pequeñas proteínas implicadas en vías de señalización y regulación de funciones fisiológicas. Hoy en día, las especies reactivas de oxígeno (oxidantes) y la defensa celular antioxidante (antioxidantes) y el equilibrio redox GSH/GSSG constituyen las dos características principales y diferenciales del estrés oxidativo (Boveris y Repetto, 2020).

El estrés oxidativo implica procesos bioquímicos reversibles que involucran el aumento de especies oxidantes o la disminución de los antioxidantes, en un proceso progresivo y continuo que incluye una respuesta adaptativa, mediante la síntesis y activación de antioxidantes y la regulación positiva de la síntesis o activación de enzimas o mecanismos de señalización para controlar la homeostasis redox en sistemas biológicos (Boveris y col., 2008). Este proceso reversible se define como *eustress* (Sies, 2020; Sies, 2021), incluyendo bajos niveles de estrés fisiológico, esenciales para los procesos de señalización redox y las acciones horméticas que dependen de la dosis y concentración de especies oxidantes, donde una menor concentración de estos induce efectos de señalización beneficiosos, mientras que niveles más altos producen daño oxidativo celular, definido como *distress*, un nivel de estrés oxidativo que puede causar daño a biomoléculas y promover el origen y progreso de enfermedades (Sies, 2020). El daño oxidativo se caracteriza por el incremento intra y/o extracelular de biomoléculas oxidadas, como consecuencia de la oxidación de lípidos y proteínas, lo que implica irreversibilidad de la toxicidad y muerte celular (Boveris y col., 2008).

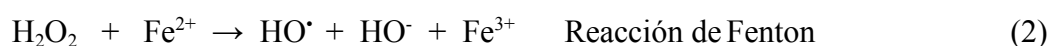
La situación de *eustress* puede alcanzarse como respuesta a dos fenómenos diferentes: la hormesis o la acción de “agentes reguladores” del estrés.

En cuanto a la hormesis, que se aplica en toxicología, representa una respuesta bifásica del organismo a un agente estresor o factor del ambiente que a bajas concentraciones genera un efecto óptimo o beneficioso para la salud (*eustress*) y a altas dosis genera un efecto tóxico o inhibitorio (Lairion y col., 2022). Cuando el estrés es intenso, prolongado o sostenido en el tiempo, excede al *eustress* y conduce a la acumulación de daño oxidativo, como en los procesos crónicos, y al *distress*. Por lo tanto, el *eustress* funcionaría como un fenómeno positivo que regula y mejora los efectos biológicos del *distress*, mediante la participación de especies reguladoras o buffers del estrés.

Si bien el daño oxidativo es irreversible y puede llevar a la muerte celular (Boveris y col., 2008), la producción incrementada de especies oxidantes como el H_2O_2 en concentraciones subletales, puede activar vías de señalización que modulen procesos celulares mediante ciclos de fosforilación/desfosforilación en proteínas redox sensibles (Sies, 2017).

1.2.2. Especies reactivas del oxígeno

Alrededor del 1-2 % del oxígeno molecular consumido durante la respiración normal en los tejidos se convierte en O_2^- , el cual participa en procesos oxidativos mediados por radicales libres. De esta manera, esta especie química es la precursora de la mayoría de las especies reactivas de oxígeno. El O_2^- no es un buen oxidante, más bien es un reductor de sí mismo y del citocromo c de la cadena respiratoria mitocondrial. Su importancia reside en que es capaz de dismutar (se reduce y se oxida) para formar H_2O_2 y O_2 , y también puede reducir los iones de metales de transición citosólicos, como el Fe^{3+} y Cu^{2+} . Estos iones, a través de la reacción de Haber-Weiss, producen la ruptura por homólisis de H_2O_2 y ROOH que conduce a la producción de radicales muy reactivos, el $\text{HO}^\bullet$ (radical hidroxilo) y el $\text{RO}^\bullet$ (radical alcoxilo) (Repetto y Boveris, 2012) (Ecuaciones 1-3):



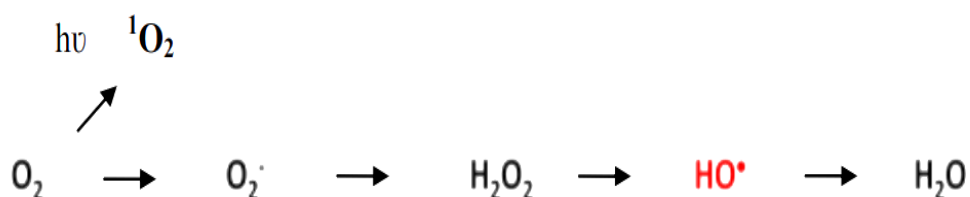
El H_2O_2 se genera de manera endógena por las células como co-producto de la respiración aeróbica y otras fuentes como los sistemas enzimáticos monoamino oxidasa (Chance y col., 1979) o NOX (Babior, 1992; Arruda y Barja-Fidalgo, 2009).

Los estímulos que incrementan la producción de esta especie pueden alterar el balance redox de la célula y provocar daño oxidativo (Saporito Magriñá y col., 2022). Si bien el H_2O_2 posee baja reactividad, esta molécula puede ser escindida por los iones Fe(II) y Cu(I) para dar origen al radical $\text{HO}^\bullet$, una especie altamente reactiva que es muy eficiente en abstraer el hidrógeno en posición alfa a un doble enlace en un ácido graso insaturado, lo cual inicia la cadena de peroxidación lipídica y promueve la lipoperoxidación. En consecuencia, los fosfolípidos que forman parte de las membranas lipídicas sufren modificaciones estructurales y funcionales, y se generan subproductos que poseen cierta reactividad como el 4-hidroxinonenal o el malondialdehído (Repetto y col., 2010).

La producción de $\text{HO}^\bullet$ a partir de H_2O_2 y Fe^{2+} por la reacción de Fenton fue considerada durante mucho tiempo como el paso limitante de la velocidad de la reacción de peroxidación de lípidos a nivel fisiológico (Chance y col., 1979; Cadenas y col., 1994; Boveris y col., 2008; Repetto y Boveris, 2012). El Fe forma parte de los grupos prostéticos esenciales de proteínas y enzimas en mamíferos. Este elemento tiene un papel activo en las reacciones catalizadas con movilización de electrones de iones metálicos durante la catálisis de reacciones químicas. El Fe se encuentra en los centros activos de la hemoglobina, la mioglobina y la enzima citocromo oxidasa. Las reacciones de tipo Haber-Weiss mediadas por Fe citosólico inician las reacciones de radicales libres que pueden visualizarse mediante la emisión de luz por quimioluminiscencia espontánea de órganos, tejidos y células vivas. El aumento de la quimioluminiscencia espontánea *in situ* indica la existencia de estrés oxidativo generado por reacciones químicas en las que participan radicales libres, y éstas favorecen la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas (Boveris y Repetto, 2020).

Como ya fue mencionado, en 1946 Leonor Michaelis describió la reducción univalente secuencial del oxígeno como mecanismo molecular de cuatro pasos de transferencia de un electrón, con formación de radical anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\text{HO}^\bullet$), como intermediarios de la reducción parcial del oxígeno y con formación de agua como producto final y reducción total.

En el siguiente esquema se representa la reducción parcial del oxígeno:



Esquema de la reducción parcial del O₂

El principal mecanismo de toxicidad mediado por las especies reactivas del oxígeno involucra al radical HO[•], ya que el anión O₂^{•-} y el H₂O₂ son poco reactivos. El radical HO[•] se forma a partir del H₂O₂ en presencia de metales de transición que actúan como catalizadores de la reacción.

1.2.3. Estados estacionarios y vidas media de las ROS

Chance, Sies y Boveris resumieron las evidencias experimentales que indican que los productos de la reducción parcial del O₂ (O₂^{•-}, H₂O₂ y HO[•]) son metabolitos que se producen en la respiración fisiológica normal de las células aeróbicas, y que incrementan en situaciones de estrés oxidativo y patológicas. Un entorno intracelular oxidante conduce al incremento de la generación del radical HO[•] a través de la reacción de Fenton/Haber-Weiss (Chance y col., 1979) y contribuye al daño oxidativo tisular, por ejemplo, el daño al cerebro y progreso de las enfermedades neurodegenerativas (Bonda y col., 2011).

Las especies químicas altamente reactivas constituidas por los intermediarios de la reducción parcial del O₂ y de las reacciones en cadena mediadas por radicales libres en células de mamíferos se mantienen en estados estacionarios (la velocidad de formación es igual a la velocidad de degradación, manteniéndose en niveles relativamente constantes, en equilibrio dinámico). En la Tabla 2 se indican los niveles de las concentraciones en estado estacionario y vida media de las especies químicas consideradas. En general, estas especies químicas se mantienen en concentraciones bajas o muy bajas y exhiben un recambio rápido con vida media cortas (Boveris y Repetto, 2020).

La vida media de una especie química indica el tiempo necesario en condiciones fisiológicas que se requiere para disminuir al 50% su concentración en estado estacionario.

Tabla 2. *Concentraciones en estado estacionario y vida media de intermediarios de la reducción parcial de oxígeno y de intermediarios de reacciones en cadena mediadas por radicales libres en células de mamíferos. Modificado de Boveris y col, 2008.*

Especie química	Estado estacionario (M)	Vida media ($t_{1/2}$) (s)
O_2^- (intramitocondrial)	10^{-10}	10^{-4}
O_2^- (citoplasmático)	10^{-11}	10^{-3}
H_2O_2	10^{-7}	0,1
$HO^\bullet$	10^{-16}	10^{-9}
NO	10^{-7}	10^{-2}
$ONOO^-$	10^{-8}	0,5
$UQH^\bullet$	10^{-7}	0,2
$R^\bullet$	10^{-10}	10^{-7}
$ROO^\bullet$	10^{-9}	10^{-5}
1O_2	10^{-15}	10^{-6}

De acuerdo a estos datos puede observarse que la concentración en estado estacionaria del O_2^- intramitocondrial es diez veces mayor que la citoplasmática, menor a la de H_2O_2 , pero mucho mayor a la del radical $HO^\bullet$. Sin embargo, la vida media del radical $HO^\bullet$ es mucho menor que la del O_2^- y del H_2O_2 , con la consecuente evidencia de que es muy reactivo (Boveris y col., 2008; Repetto y col., 2010).

1.2.4. Oxidación de biomoléculas: fosfolípidos y proteínas

1.2.4.1. Peroxidación de lípidos

Los radicales libres, que son especies químicas que contienen al menos un electrón desapareado, son muy reactivos y participan en reacciones químicas en cadena, como la peroxidación (o autooxidación) de lípidos. La peroxidación de lípidos incluye tres etapas:

a. Etapa de iniciación: en la que se generan radicales lipídicos centrados en un átomo de carbono (alquilo, R[•]) a partir de la reacción del radical HO[•] con un ácido graso poliinsaturado (RH), que comienza con la abstracción de un átomo de hidrógeno (H) del RH (Ecuación 4).



b. Etapa de propagación: en esta etapa los radicales R[•] incorporan O₂ para formar radicales peroxilo (ROO[•]), la reacción en cadena se propaga sucesivas veces y se generan como producto de estas reacciones los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) (Ecuaciones 5 y 6).



c. Etapa de terminación: en esta etapa la reacción en cadena termina cuando dos radicales ROO[•] reaccionan entre sí o con otros radicales para finalmente generar productos inactivos en la llamada etapa de terminación de la reacción de peroxidación en cadena. En esta etapa, partir de ROO[•] se forma un producto electrónicamente excitado, el oxígeno singulete (¹O₂), como también aldehídos (RHO) y cetonas (R=O) con grupos carbonilos excitados (-CO*) (Repetto y col., 2012) (Ecuaciones 7 y 8).



Las ROS se producen *in vivo* como un evento fisiológico en el marco del metabolismo oxidativo. Sin embargo, con frecuencia, se asocian a alteraciones patológicas. En condiciones fisiológicas, la generación de O₂⁻ y H₂O₂ involucra la producción de otras ROS, como el radical HO[•] y el ¹O₂. Las concentraciones en estado estacionario intracelulares de estas especies en condiciones fisiológicas son muy bajas y se las considera indispensables para las células por los efectos biológicos que generan (Repetto y col., 2012).

Tanto H₂O₂, ROOH (especialmente ROOH de cadena corta), ¹O₂, y especies reactivas derivadas de la peroxidación de lípidos (sustancias reactivas al ácido

tiobarbitúrico (TBARS), malondialdehído (MDA), 4-HO-nonenal y otros aldehídos de bajo peso molecular) pueden atravesar las membranas biológicas y difundir fuera de las células, por lo tanto, pueden ser detectadas a nivel sistémico (Repetto y Boveris, 2016).

La emisión de luz en forma fotones correspondiente a la reacción de desexcitación del $^1\text{O}_2$ puede determinarse por quimioluminiscencia espontánea, a través de la medida de la velocidad de la reacción en cadena de peroxidación lipídica en condiciones fisiológicas (Boveris, 1985) (Ecuación 9):



1.2.4.2. Oxidación de proteínas

El H_2O_2 y los productos secundarios o finales de la peroxidación de lípidos y proteínas son responsables de la oxidación de grupos tioles (-SH) redox-sensibles (Sies y Jones, 2007), los cuales pertenecen fundamentalmente a proteínas o al GSH. Estas especies y productos de oxidación se generan en condiciones fisiológicas y sus niveles aumentados alteran el estado redox celular (Sies y Jones, 2007). Por ello, la concentración intracelular de H_2O_2 debe ser estrictamente controlada por las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Gaetani y col., 1989; Bjorkman y Ekholm, 1995).

La oxidación de proteínas por la reacción con especies radicalarias se puede dar a nivel del carbono α o de las cadenas laterales tanto de aminoácidos alifáticos (valina, leucina) como aromáticos (tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Esto genera radicales $\text{RO}^\bullet$ y $\text{ROO}^\bullet$ y grupos carbonilos como producto final. También en las reacciones de oxidación en cadena se generan hidroperóxidos que reaccionan con los metales de transición para dar nuevos radicales $\text{HO}^\bullet$. Algunos aldehídos productos del proceso de peroxidación de fosfolípidos, tales como malondialdehído y 4-hidroxinonenal, pueden generar daño a las proteínas probablemente por la formación de bases de Schiff (Dean y col., 1997). La oxidación de proteínas involucra también a las enzimas antioxidantes, con la consiguiente pérdida de la función biológica y química como la de catalizadores de las reacciones de detoxificación de ROS.

1.2.5. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que en bajas concentraciones protegen de la oxidación a un sustrato. Su función es la de mantener en niveles de estado estacionario

bajas las especies reactivas del oxígeno a nivel intra y extracelular mediante diferentes mecanismos: remoción de O_2 , atrapan especies reactivas o precursores de reacciones químicas en cadena, o inhiben su formación, reaccionan con metales de transición o regulan la actividad de enzimas antioxidantes.

Las defensas antioxidantes celulares pueden ser enzimáticas o no enzimáticas. Las enzimáticas son: las superóxido dismutasas (SOD). Existen tres isoenzimas de SOD, una citosólica que contiene Cu y Zn en el sitio activo (Cu,Zn-SOD), otra, de localización mitocondrial (Mn-SOD), que contiene Mn en el sitio activo y una tercera, cuantitativamente menos importante que contiene Fe, ubicada en el espacio intermembrana mitocondrial (Fe-SOD). La función de este grupo de isoenzimas de SOD es de detoxificar a las células del O_2^- , a partir de lo cual generan por dismutación, H_2O_2 y O_2 ; la catalasa, con su locación peroxisomal y microperoxisomal, cataliza la descomposición del H_2O_2 ; y las glutatión peroxidasas, con dos tipos principales, la Se-dependiente, que catalizan la descomposición del H_2O_2 y ROOH, y la Se-noddependiente, que solamente es activa frente a ROOH. Otras enzimas antioxidantes son la tioredoxina (Trx) y la glutatión reductasa (GR) (Sies, 1991b).

Los antioxidantes no enzimáticos más importantes y abundantes que se determinan con mayor frecuencia en sistemas biológicos son el glutatión reducido (GSH) y el α -tocoferol. En ambos casos existen sólidas razones químicas, basadas en las concentraciones de estas moléculas y constantes de reacción, para pensar que son los antioxidantes fisiológicos más importantes.

El GSH es el principal antioxidante intracelular hidrosoluble. Se encuentra en el rango de 0,5 a 4 mM en el citosol de las células. El α -tocoferol, es un antioxidante de membrana e hidrofóbico (lipofílico), que desempeña un doble papel como antioxidante celular y sistémico. Otros antioxidantes son el ácido úrico, ácido ascórbico, albúmina, bilirrubina, carotenos, proteínas séricas como transferrina, ferritina y ceruloplasmina, que tienen la capacidad de quelar los metales de transición (Fe y Cu) reduciendo las posibilidades de generar ROS, y los oligoelementos (Sies, 1991a y b; Boveris y Repetto, 2008).

El GSH tiene varias funciones, entre ellas se incluyen su rol como antioxidante, protege a las biomoléculas del daño oxidativo causado por ROS, generadas durante el metabolismo normal de las células, por vía no enzimática o enzimática. *In vitro*, el GSH puede reaccionar con el radical $HO^\bullet$, el $HOCl$, el radical $RO^\bullet$, el radical $ROO^\bullet$ y el 1O_2 ;

en el metabolismo celular, transporte, catálisis (pues actúa como cofactor para la familia de enzimas de tipo peroxidasa), está involucrado en el metabolismo del ácido ascórbico, la comunicación intercelular, previniendo la oxidación y el entrecruzamiento de los grupos SH de las proteínas, de la cisteína, y coenzima A.

También parece participar en el transporte intracelular de cobre. Permite quelar los iones Cu^{2+} y disminuir su disponibilidad para generar radicales libres. Es un agente radioprotector y cofactor para varias enzimas en diferentes rutas metabólicas, incluyendo las enzimas involucradas en la síntesis de los leucotrienos. Interviene también en vías enzimáticas (GSH-S-transferasas) y no enzimáticas de detoxificación de xenobióticos. También es importante en la degradación de proteínas que contienen puentes disulfuro, como la insulina (Sies, 1991b; Boveris y col., 2008).

1.2.6. Biomarcadores de estrés y daño oxidativo

El daño oxidativo implica un aumento de los productos de oxidación (de fosfolípidos, proteínas o ADN) o una disminución de los antioxidantes (Sies, 1991a). Los productos de oxidación que indican estrés y daño oxidativo son: TBARS, casi equivalente al malonaldehído, 4-hidroxi-nonenal, grupos carbonilo de proteínas, 8-isoprostano, óxidos de colesterol y 8-HO-desoxiguanosina (8-HO-dG). Los niveles de TBARS, representan cerca del 6 al 9 % del O_2 consumido durante la peroxidación de ácidos grasos insaturados, y el 4-HO-nonenal es un excelente indicador de la peroxidación lipídica.

Los carbonilos de proteínas representan un indicador sensible del daño oxidativo celular. La quimioluminiscencia inducida por hidroperóxido (CL-BOOH) es un ensayo muy sensible que indica los niveles de α -tocoferol y la quimioluminiscencia espontánea de órgano un indicador de estrés oxidativo y producción de $^1\text{O}_2$ (Leutner y col., 2005; Repetto, 2008; Repetto y Boveris, 2016). El ΔO_2 medido con un electrodo tipo Clark permite estimar los niveles de O_2^- generados en la respiración celular, tanto intramitocondrial como extramitocondrial (en citosol por la NOX). Estos metabolitos y productos de oxidación pueden ser utilizados como biomarcadores de estrés y daño oxidativo, siendo un biomarcador una sustancia elaborada por un tejido específico que puede ser detectada en la circulación, que asocia a un proceso fisiológico o patológico y según sus niveles puede ser indicador de salud o enfermedad.

1.2.7. Biomarcadores sistémicos

La relación entre los factores de riesgo, los biomarcadores y los síntomas clínicos se analizó cuidadosamente en los últimos años, pero no se llegó a una conclusión clara. La sangre es la muestra biológica más comúnmente analizada en busca de marcadores bioquímicos en diferentes patologías. La sangre es muy compleja y refleja la actividad fisiológica y la patología de los órganos y sistemas del cuerpo.

Un aumento en los marcadores bioquímicos circulantes periféricos de estrés oxidativo permitiría establecer un estado preclínico de la enfermedad, muchos años antes del diagnóstico clínico, en un momento en el que los futuros pacientes parecen normales y sin síntomas.

1.2.8. Biomarcadores de toxicidad de MC-LR. Estudios previos *in vivo* e *in vitro* sobre estrés oxidativo y MC-LR

Como se ha señalado, antes del desarrollo de métodos analíticos y moleculares de detección para estos microorganismos, los investigadores emplearon bioensayos en animales, para evaluar la toxicidad de las floraciones, y en todos ellos se ha podido relacionar el efecto tóxico con el estrés y/o daño oxidativo (Lawton y col., 1999).

Los estudios realizados en ratones indican que la toxicidad aguda, subcrónica y crónica de MC-LR en células eucariotas se vincula con la generación de ROS y, en consecuencia, al daño oxidativo. La exposición aguda genera cambios estructurales de los hepatocitos, hemorragia intrahepática y muerte a las pocas horas (Moreno y col., 2005); la toxicidad subcrónica, estrés oxidativo reversible en hígado y riñón, lipoperoxidación y alteración de la homeostasis redox (Andriolo y col., 2008; Sedan y col., 2010), y la crónica, aun con bajas dosis, genera necrosis, vacuolización citosólica, apoptosis, fibrosis y proliferación tumoral en hígado e intestino (Andriolo y col., 2008).

Se ha descrito también el efecto de la exposición aguda a MC-LR de ratas que recibieron por vía intraperitoneal dosis altas de MC-LR (100, 150 y 230 mg/kg de peso corporal). Se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes y la peroxidación de lípidos en hígado y riñón de las ratas y se observó que las actividades de glutatión peroxidasa (GSH-Px), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en el hígado disminuyen significativamente (Andriolo y col., 2008).

Al mismo tiempo, se observaron aumentos en los niveles de peroxidación lipídica en hígado y riñón de las ratas tratadas, lo que sugiere que el estrés oxidativo es

un importante factor en la patogenia de MC-LR para inducir toxicidad (Moreno y col., 2005).

Los efectos de MC-LR a dosis subletales, fueron estudiados en ratones, sobre el sistema antioxidante de hígado y riñón, y sus efectos en la composición lipídica del hígado después de una exposición prolongada. Los resultados obtenidos mostraron una clara dependencia de los sistemas de defensa enzimáticos, con reducción en la disponibilidad de GSH y α -tocoferol, y aumento en la producción de NO (Sedán y col., 2010).

Otros experimentos evidencian que la exposición de linfocitos de sangre periférica humana a concentraciones de MC-LR de 0,1 a 10 $\mu\text{g/mL}$, inducen daño oxidativo en el ADN tanto *in vitro* como *in vivo*, pero los mecanismos de su actividad genotóxica aún no están claros (Zegura y col., 2011). Además del hígado y el riñón, se afectan otros órganos como el cerebro, el pulmón, el corazón, el timo, y el sistema inmune (Sedan y col., 2015).

La exposición de eritrocitos humanos a diferentes concentraciones de MC-LR (1 a 1000 nM durante, 1, 6, 12 y 24 h) induce un aumento significativo del nivel de TBARS, indicador de peroxidación de lípidos y daño oxidativo. Como consecuencia de la alteración de los lípidos de la membrana plasmática de los eritrocitos, se observaron cambios estructurales como la formación de equinocitos, hemólisis, conversión de oxihemoglobina en metahemoglobina, disminución de la fluidez de la membrana, como así también, cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes: catalasa, SOD y GR; y formación de ROS (Sicinska y col., 2006).

Por otro lado, y siguiendo la línea de estudios *in vitro*, los estudios realizados con MC, MC-LR y [Asp3]-MC-LR en neutrófilos humanos (PMN) mostraron que incluso a concentraciones inferiores a las recomendadas por la OMS para la exposición crónica (0,1 nM), las MC afectan y generan daño oxidativo en los PMN humanos, cuyo efecto puede explicar la lesión hepática y la promoción de tumores (Kujbida y col., 2006). En un estudio realizado por Kujbida y col. (2006) se reportó que concentraciones bajas de MC-LR (1 nM) incrementan en un 70% la fagocitosis, sin embargo, una concentración de 1000 nM no causó un mayor incremento de la fagocitosis ni de la eficiencia bactericida de los PMN. La concentración segura de esta toxina en el agua de bebida propuesta por la OMS es 0,1 nM, pero puede representar un riesgo significativo en la salud y el ambiente, ya que parte de efecto tóxico se asocia a la actividad de las

fosfatasa que podrían causar alteraciones en los procesos de señalización y en consecuencia generar la promoción de tumores.

La activación de los PMN incluye la activación de la enzima protein quinasa C, estimulación del estallido respiratorio con incremento de la generación de ROS, dependientes de procesos de fosforilación y desfosforilación, organización del citoesqueleto y procesos de degranulación de la enzima mieloperoxidasa en PMN (Kujbida y col., 2006).

MC-LR incrementa la emisión de luz de PMN medida por quimioluminiscencia del luminol en forma rápida (segundos) y dosis dependiente. Esta señal se mantiene elevada durante 20 minutos en forma similar a la respuesta observada por el activador del estallido respiratorio forbol miristato acetato (PMA). Los resultados indicaron que MC-LR induce en forma directa la generación de ROS, principalmente 1O_2 , producto final de la lipoperoxidación. Como la producción de este radical libre es muy rápida y en este trabajo no fueron detectados cambios en los niveles de TBARS, se puede concluir que el daño oxidativo que genera MC-LR involucra únicamente la peroxidación de lípidos de membrana de PMN. Seguido de ello, si bien se puede suponer que la oxidación de estas biomoléculas no es tan importante, esto también, puede deberse al aumento de la permeabilidad de poros de transición de la membrana y al colapso del potencial de membrana de las mitocondrias. El aumento de ROS y las alteraciones mitocondriales activan al factor nuclear de transcripción NFkB y los procesos inflamatorios (Kujbida y col., 2006).

Una amplia variedad de enfermedades está asociada con el estrés oxidativo (Rosso y Giannuzzi, 2017). La formación de radicales libres mediada por metales provoca diversas modificaciones en las bases del ADN, la peroxidación de lípidos y alteración de la homeostasis del calcio y grupos tioles. Los peróxidos de lípidos, formados por el ataque de radicales sobre residuos de fosfolípidos de ácidos grasos poliinsaturados, pueden reaccionar con metales produciendo finalmente malondialdehído (MDA) mutagénico y cancerígeno, 4-hidroxinonenal y otros aductos de ADN exocíclicos (aductos de etileno y/o propano).

Las ROS aumentan la peroxidación lipídica y el daño orgánico, lo que conduce a la muerte celular y a la fibrogénesis mediada por el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1). Las ROS también dañan el ADN, con el consiguiente riesgo de inestabilidad genómica, mutagénesis y muerte celular o neoplasia.

Estas especies activan directamente las caspasas y aceleran la muerte apoptótica (Kozlowski y col., 2009). Paradójicamente, las ROS pueden tener efectos antiapoptóticos y activa el NF- κ B, lo que contribuiría a la neoplasia mediada por Fe, como la hepatopatía mediada por Fe (hepatoma) (Porter y Garbowski, 2014).

1.3. Rol del hierro en el ambiente y en la salud de los seres vivos

1.3.1. El hierro como bioelemento

El Fe es el elemento 26 de la tabla periódica y es el más abundante en la Tierra. Forma los núcleos exterior e interior del planeta. Este elemento se encuentra en ambientes con bajos niveles de O₂ y H₂O (como en los meteoritos). La superficie del metal es de color gris plateado metálico y se oxida en el aire transformado en óxidos de Fe hidratados, conocidos como óxidos. En tiempos prehistóricos, se utilizó para fabricar armas y herramientas en la Edad del Hierro (1200-1000 a.C). Después de muchos siglos, en el siglo XIX, protagonizó una revolución en la ingeniería y la construcción, con la fabricación y utilización del acero, elaborado con Fe y 0,02-2,1% de carbono. Los aceros son hasta 1000 veces más duros que el Fe y muestran resistencia, rigidez y plasticidad (Enghag, 2008). Químicamente, el Fe se encuentra en compuestos con varios estados de oxidación (-2 a +7), pero +2 y +3 son los más comunes.

El Fe representa aproximadamente el 0,7% del peso del cuerpo humano, su contenido corporal es de alrededor de 3,5 g en los hombres y 2,9 g en las mujeres, con una ingesta diaria de 13 mg de Fe. Un 60% del Fe corporal se encuentra en la hemoglobina (Hb), 10% en mioglobina muscular (Mb) y el resto se almacena en hepatocitos y células retículo-endoteliales (Dev y Babbitt, 2017).

Este bioelemento se encuentra en los sistemas biológicos en forma de iones o conformando enlaces covalentes con grupos prostéticos de enzimas. Es esencial para la vida. En los mamíferos, el Fe se encuentra en los centros activos de la Hb, Mb y la enzima citocromo oxidasa, y es un constituyente de la enzima catalasa (Boveris y Repetto, 2020).

1.3.2. El hierro en los sistemas acuáticos: Su relevancia para las bacterias y cianobacterias

En relación a los aspectos ambientales, el Fe es un elemento que actúa como limitante en ecosistemas acuáticos, dado que aunque es muy abundante en la naturaleza,

es poco soluble y por este motivo se producen deficiencias que, en muchos casos, incrementa fuertemente la biomasa (Rosso y Giannuzzi, 2017). Este oligoelemento es un importante micronutriente utilizado por las bacterias. La relación entre el aporte de Fe y el crecimiento de bacterias en modelos animales se conoce desde los primeros estudios en el área (Weinberg, 1978; Wooldridge y Williams, 1993; Palmer y Skaar, 2016).

La supervivencia de muchas bacterias patógenas está limitada por el este elemento disponible, y la expresión de algunos factores de virulencia y toxinas está mediada por Fur, un regulón presente en los procariotas. Algunos de estos sistemas de captación de Fe de alta afinidad son importantes factores de virulencia en las bacterias que infectan los fluidos y tejidos de animales porque pueden formar quelatos con el metal unido a proteínas del huésped (Escolar y col., 1999). Un quelato es una estructura química que resulta de la unión de uno o más ligandos (átomos o moléculas) que forman un anillo de átomos que encierran al átomo metálico central.

Asimismo, las cianobacterias presentan mecanismos de adquisición de Fe muy importantes, lo cual les confiere una gran ventaja en cuanto a competencia con otros organismos debido a la producción de sideróforos (compuesto quelante de Fe secretado por microorganismos). El sistema de toma de Fe resulta ser más eficiente para las cepas tóxicas productoras de MC que para extractos no tóxicos (Rosso y Giannuzzi, 2017).

Tanto a nivel del ecosistema como dentro del huésped existe un delicado mecanismo de regulación de la concentración de Fe, un equilibrio dinámico a nivel celular y sistémico, para mantener la concentración de Fe en un rango estrecho, porque la perturbación de esta homeostasis entre ROS de un lado y el Fe con actividad redox por el otro, conduce inevitablemente a efectos deletéreos específicos (Galaris y Pantopoulos, 2008).

Los patógenos bacterianos requieren hierro para procesos esenciales, incluida la vía de las pentosas fosfato, la replicación del ADN, la transcripción y la biosíntesis de cofactores (Palmer y Skaar, 2016).

Sin embargo, este elemento traza no está fácilmente disponible para los microorganismos en ambientes aeróbicos. Mientras que en condiciones anaeróbicas el Fe^{2+} es soluble a pH fisiológico y las células obtienen Fe sin mucha dificultad del medio externo, el ion se convierte rápidamente en Fe^{3+} al exponerse al O_2 y forman hidróxidos insolubles a pH neutro, haciendo muy escaso el metal disponible (Crichton, 1991).

De hecho, los bajos niveles ambientales de Fe disponible a menudo actúan como una señal para la inducción de genes de virulencia en bacterias patógenas (Wackett y Orme, 1989; Franklin y Costello, 2009).

Para adquirir Fe del medio extracelular todas las bacterias aeróbicas producen y secretan compuestos de bajo peso molecular denominados sideróforos (transportadores de hierro). Estos compuestos quelan Fe^{2+} con alta afinidad y especificidad (Neilands, 1989; Winterbourn, 1995).

La capacidad de adquirir Fe es una característica indispensable de los patógenos bacterianos en el establecimiento exitoso de la enfermedad. Con pocas excepciones, la participación del Fe en una serie de funciones metabólicas esenciales y reacciones enzimáticas lo convierte en un requisito absoluto para casi todos los sistemas biológicos. Estos sistemas de captación de Fe de alta afinidad, en su mayoría, son importantes factores de virulencia en las bacterias que infectan los fluidos y los tejidos animales, porque pueden quelar el metal unido a proteínas huésped (Litwin y Calderwood, 1993; Bearden y Perry, 1999).

Además, debido a que el Fe disponible es generalmente limitante del crecimiento de las bacterias que prosperan en un medio animal, la falta del metal es una importante señal del ambiente para desencadenar la expresión de determinantes de virulencia (Litwin y Calderwood, 1993).

Sin embargo, aún en las células procariotas, un exceso de Fe es tóxico debido a su capacidad para catalizar las reacciones de Fenton y la formación de ROS. La absorción de Fe requiere de sistemas de regulación para mantener la concentración intracelular del metal entre los límites deseables. Los mecanismos de excreción para el Fe no se conocen en las bacterias, los microorganismos parecen controlar la homeostasis de este elemento y regular su transporte a través de la membrana (Bullen y col., 1978; Brennan y col., 1986; Bagg y 1987; Crosa, 1997).

1.3.3. Función biológica, homeostasis y efectos tóxicos del hierro en la salud humana

Los metales de transición, como el Fe, el cobre (Cu) y el cobalto (Co), son parte integral de importantes enzimas involucradas en procesos biológicos vitales. Cumplen con el concepto de hormesis, en concentraciones bajas son necesarios para cumplir funciones biológicas y bioquímicas, sin embargo, se vuelven tóxicos para las células a concentraciones tisulares elevadas. Aunque se ha reconocido la toxicidad de los metales

de transición, los mecanismos de su acción tóxica aún siguen siendo poco entendidos (Repetto y col., 2010).

Se reconoce que el Fe es el elemento de transición más abundante en los organismos vivos (Wooldridge y Williams, 1993; Brock, 1989). También, es esencial para el metabolismo celular de plantas y animales, pues se requiere como cofactor para un gran número de enzimas. En humanos, la deficiencia de Fe afecta a un estimado 30% de la población mundial, particularmente en los países en desarrollo, en los que se reportan alrededor de 0,8 millones muertes anuales (OMS, 2003). Es un componente constitutivo de varias proteínas implicadas en el transporte de O₂ y su metabolismo, cuya capacidad para sufrir oxidación y reducción cíclica es un aspecto importante de su función (Wooldridge y Williams, 1993; Winterbourn, 1995).

Los niveles celulares y tisulares del Fe están determinados de manera homeostática por proteínas reguladoras que controlan la captura, el transporte y el almacenamiento del metal. La hormona peptídica hepcidina sería el principal regulador del metabolismo del Fe en humanos (Camaschella, 2005).

Este oligoelemento esencial, debe transportarse por el cuerpo, almacenarse y estar disponible para la síntesis de proteínas que contienen o transportan hierro. Es el cofactor de la enzima ribonucleótido reductasa, la ARN polimerasa III, varias hidroxilasas y dioxigenasas de aminoácidos, y de las enzimas de microbios y células de mamíferos que participan en el metabolismo del O₂, como la SOD, la catalasa y la peroxidasa.

El Fe también es necesario para la función biológica de los citocromos, la hidrogenasa, la ferredoxina y la succinato deshidrogenasa implicada en la transferencia de electrones, y en vertebrados, la función de neutrófilos, la actividad de linfocitos T y B y las células natural killer son todas dependientes del Fe (Neilands, 1981; Wooldridge y Williams, 1993).

En los seres humanos, el Fe, es transportado desde el intestino delgado a otros órganos del cuerpo, almacenado y puesto a disposición para la síntesis de proteínas que lo contienen. La capacidad de este metal para sufrir oxidación y reducción es un aspecto importante de su función. Sin embargo, tal actividad redox puede generar radicales libres y otras especies fuertemente oxidantes capaces de causar una amplia gama de lesiones biológicas, efecto que puede ocurrir a través de una variedad de mecanismos (Winterbourn, 1995).

Casi todos los sistemas biológicos requieren de una concentración de hierro en el rango 0,4-4,0 µg/mL para cubrir las necesidades fisiológicas (Weinberg, 1978; Wooldridge y Williams, 1993).

Diariamente, en condiciones fisiológicas, los humanos adultos absorben 1 a 2 mg de Fe de la dieta para compensar las pérdidas inespecíficas de este elemento, por ejemplo, debido a la descamación o pérdida de sangre, así es que en condiciones normales, más del 70% de esta cantidad se utiliza para la síntesis de hemo en células eritropoyéticas, el resto se distribuye principalmente en el hígado, los músculos y, en menor medida, otros tejidos, como el retículo endotelial, desde el cual es reciclado por los macrófagos (Galaris y Pantopoulos, 2008).

Importantes estudios han confirmado que los metales de transición activan vías de señalización y el efecto carcinogénico de los metales se ha relacionado con la activación de factores de transcripción principalmente sensibles a redox, que involucran a NF-kappaB, AP-1 y p53 (Valko y col., 2005).

La acumulación en los tejidos de iones metálicos de transición es extremadamente tóxica, lo que lleva a muchas condiciones patológicas asociadas con daño oxidativo en las membranas y moléculas biológicas (Halliwell y Gutteridge, 1989; Sies, 1991a; Winterbourn, 1995). El Fe puede promover la formación de radicales libres a partir de compuestos fisiológicos o xenobióticos al catalizar la autooxidación, como así también, puede iniciar la peroxidación lipídica y reaccionar con el peróxido de hidrógeno para producir especies altamente reactivas y tóxicas mediante las reacciones de Fenton/Haber-Weiss (Winterbourn, 1995; Repetto y col., 2010).

1.4. Impacto de las microcistinas en el sistema inmune

La inmunotoxicidad podría definirse como "cualquier efecto adverso sobre los componentes y/o la función del sistema inmunitario por parte de un agente biológico, químico o físico resultante de acciones directas o indirectas y que refleje una toxicidad permanente o reversible" (Diez-Quijada, 2000; De Visser y col., 2006).

Los neutrófilos son células inmunitarias innatas fagocíticas esenciales para eliminar bacterias mediante la activación de una amplia variedad de respuestas efectoras y la generación de grandes cantidades de ROS. La mayoría de los ROS de los neutrófilos se generan por la activación de la enzima NOX. Independientemente de su función antimicrobiana, las ROS derivadas de la NOX se han revelado como

reguladores clave de las respuestas inmunitarias del huésped y de la inflamación neutrófila (Zeng y col., 2019).

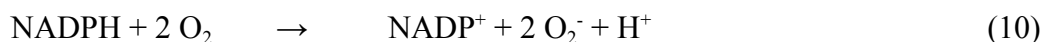
Aunque las MC se clasifican principalmente como hepatotoxinas, se ha demostrado que inducen efectos nocivos en una amplia gama de órganos. Sin embargo, sus efectos sobre el sistema inmunitario aún no se han investigado. Así, se considera de interés conocer el impacto de las cianotoxinas en el sistema inmune, debido a su importancia en la homeostasis de los organismos (Diez-Quijada, 2000) y porque existe una creciente evidencia de que pueden tener un potencial inmunomodulador que actúa de manera dualista, induciendo respuestas inmunoestimulantes e inmunosupresoras en el sistema inmunológico (Diez-Quijada y Sierosławska, 2010; Mankiewicz-Boczek y col., 2011).

1.4.1. Rol de NADPH oxidasa (NOX) en PMN

La fagocitosis y la producción de las ROS son mecanismos fundamentales para la eliminación de microbios en los neutrófilos. Varios estudios han indicado la interacción dinámica entre la autofagia y la fagocitosis en la defensa del huésped en los macrófagos (Kujbida y col., 2006; Kujbida y col., 2008). Existen muchas fuentes celulares de ROS, como el sistema xantina oxidasa, la actividad lipo y ciclooxigenasa y en la cadena mitocondrial de transporte de electrones (Kamata y Hirata, 1999; Arruda y Barja-Fidalgo, 2009). Sin embargo, el único sistema especializado en esta función es el complejo NADPH oxidasa o NOX, a diferencia de las otras fuentes mencionadas que generan especies reactivas como subproductos, tiene como función primaria la producción de anión superóxido (Chanock y col., 1994; Bedard y Krause, 2007). El sistema enzimático NOX, responsable de la reducción parcial del oxígeno molecular (O_2), es común a todas las células capaces de fagocitar partículas (eosinófilos, monocitos, neutrófilos). También está presente en las células “asesinas” naturales (NK), que son linfocitos responsables de eliminar las células tumorales. La NOX es un complejo multiproteico compuesto por subunidades de membrana y citosólicas que se acoplan cuando la enzima se activa (Lalucque y Sila, 2003; Lardy y col., 2005; Arruda y Barja-Fidalgo, 2009).

El complejo enzimático NOX produce ROS en diferentes células y tejidos, es de gran importancia en las células fagocíticas (principalmente neutrófilos y macrófagos) porque participa en la destrucción de microorganismos patógenos, mediante la

fagocitosis y la producción de O_2^- (Finkel, 2000). Este complejo, a diferencia de otras fuentes que generan especies reactivas como subproductos, cataliza la reducción monovalente del O_2 y tiene como función primaria la producción de O_2^- (Bedard y Krause, 2007) (Ecuación 10).



La NOX de fagocitos y neutrófilos normalmente está inactiva. Sin embargo, cuando se activa, ocurre el proceso denominado estallido respiratorio, en el que el complejo utiliza NADPH como sustrato para la reducción de oxígeno y generación de O_2^- . Así, una molécula de NADPH produce dos iones O_2^- mediante una transferencia gradual de dos electrones a dos moléculas de oxígeno (ecuación 10) (Geiszt, 2006). Para crear una fuerza energéticamente favorable es necesario que el O_2 esté unido al hemo externo, así recibe el electrón y forma O_2^- en el borde externo de la membrana. A partir del O_2^- generado, por dismutación o por acción de la SOD, se genera H_2O_2 . La mieloperoxidasa, uno de los principales constituyentes de los gránulos de los neutrófilos, puede utilizar el H_2O_2 para oxidar los haluros y convertirlos en compuestos reactivos tóxicos, como el HClO y las cloraminas (Bedard y Krause, 2007).

En cuanto a su estructura química, este complejo multienzimático comprende un citocromo b558, formado por gp91phox y p22phox, y dos componentes citosólicos disociados, p47phox y p67phox. Además, una proteína G de bajo peso molecular Rac participa en el ensamblaje de la célula activa complejo. El complejo NOX está inactivo en los neutrófilos en reposo, pero la activación de estas células resulta en la fosforilación de la subunidad NOX p47phox mediada por la proteína cinasa C (PKC) u otras cinasas como p38 MAPK y Akt, entre otras (Figura 5) (Kamata y Hirata, 1999).

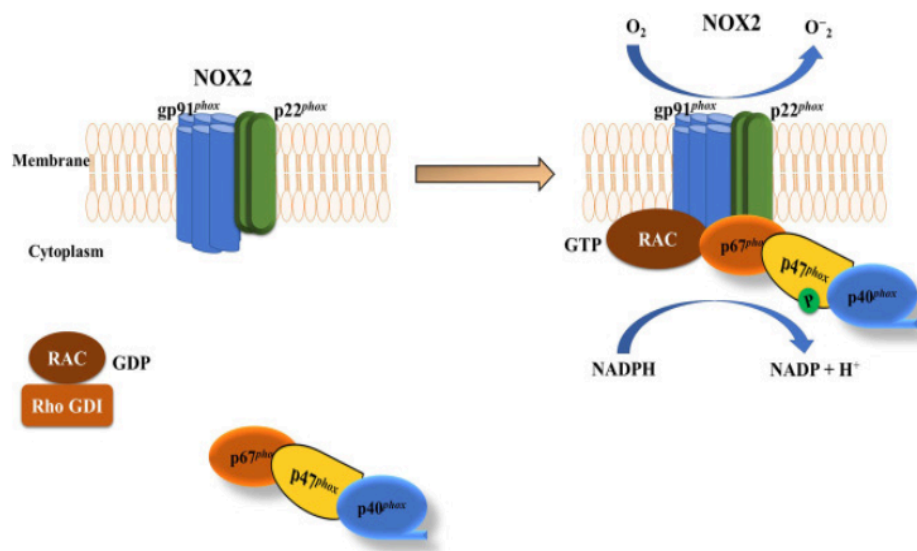


Figura 5. Estructura química y activación de la NOX: la NOX clásica está constituida por tres proteínas citosólicas (cytoplasm): p47Phox, p40Phox y p67Phox, Rac y dos subunidades de membrana (gp91Phox también conocido como NOX2 y p22Phox). Cuando se activa (activated) la NOX, las subunidades citosólicas se translocan a la membrana (membrane) plasmática e interactúan con las subunidades de la membrana. Esta enzima multisubunidad produce O₂⁻ después de que los electrones se transfieren de NADPH. (Tomado de Begum, R., y col., 2022).

El siguiente paso de la activación comprende la translocación de las subunidades citosólicas a la membrana plasmática y la asociación a las subunidades unidas a la membrana, que comprenden la NOX catalíticamente activa, que puede entonces generar altas cantidades de O₂⁻ y enviarlas al medio extracelular o fagosomal. La mayoría de los estudios realizados para la función de las ROS en la vida útil de los neutrófilos presentan la visión clásica que señala a estas especies como moléculas citotóxicas deletéreas. En particular, las generadas por la NOX. Las pruebas más sólidas que apoyan esta afirmación se basan en el estudio de los neutrófilos en la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) (Chanock, y col., 1994).

La NOX posee un papel fundamental en regular diversas funciones celulares, como la modulación de múltiples vías de señalización intracelular heterogénea sensibles al estado redox de la célula, incluyendo la inhibición de fosfatasa de tirosina, la activación de factores de transcripción y la modulación de la actividad de canales iónicos. Además, las ROS que genera, el O₂⁻ y el H₂O₂ funcionan como moléculas de señalización que median la síntesis y liberación de mediadores de respuesta inflamatoria relacionados con procesos de proliferación y migración celular, como también de

expresión de genes (Ushio-Fukai y Nakamura, 2008). En los procesos inflamatorios el H_2O_2 actúa como segundo mensajero en la activación del factor de transcripción nuclear (NF- κ B) y en presencia de óxido nítrico (NO) en la generación de $ONOO^-$ como agente citotóxico en presencia de O_2^- (Finkel, 2000).

Los leucocitos pueden llegar a producir hasta 100 nmoles de O_2^- por millón de células, cuando se estimulan con 10 ng del éster de forbol 12 miristato 13 acetato (PMA), con aumento en el consumo de oxígeno intracelular y de la generación de O_2^- , H_2O_2 y NO, mediados por la proteína quinasa C en PMN (Carreras y col., 1997) y en células mononucleares (Valdez y Boveris, 2001).

Se han encontrado varias isoformas de NOX. La más estudiada y activa es la NOX2 (Figuras 5 y 6), presente en neutrófilos, monocitos y macrófagos, con función fagocítica y responsable del estallido respiratorio. En la Figura 6 se ilustra el mecanismo de activación de NOX2 como respuesta inflamatoria de los neutrófilos mediada por procesos de óxido-reducción: la oxidación del NADPH y reducción del oxígeno para la liberación de anión superóxido (Berard y Krause, 2007).

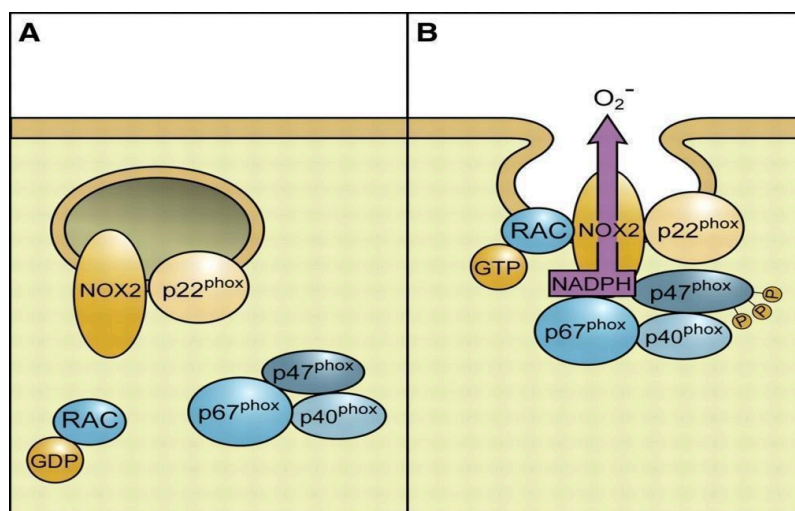


Figura 6. Mecanismo de activación de NOX2 en neutrófilos. A: en estado de reposo, B: ensamble de subunidades de NOX2 como respuesta inflamatoria de neutrófilos mediada por procesos de óxido-reducción: la oxidación del NADPH y reducción del oxígeno para la liberación de anión superóxido (Tomado de Berard y Krause, 2007).

Además de su existencia en leucocitos existe la evidencia de un complejo NOX unido a la membrana de células no leucocitarias incluyendo fibroblastos, células musculares lisas, epiteliales y endoteliales entre otras, denominados homólogos

humanos de gp91phox en células no fagocíticas, ellas son NOX1, NOX3, NOX4 y NOX5. La NOX5, estructuralmente muy relacionada con NOX2, pero funcionalmente tienen ciertas diferencias, generan bajos niveles de intracelulares de O_2^- , incluso en células no estimuladas; pero de menor actividad que la NOX de neutrófilos activados. La NOX 1 se expresa principalmente en células epiteliales de colon (Bedard y Krause, 2007).

Se ha observado también que la NOX se puede activar por factores químicos, físicos, ambientales y biológicos. Algunos de estos estímulos pueden incrementar la función de la NOX con aumento en su expresión génica, mientras que otros pueden también activar directa o indirectamente el sistema enzimático sin modificar su transcripción (Lalucque y Silar, 2003; Lardy y col., 2005)

1.4.2. Fisiopatología asociada a la NADPH oxidasa de los PMN

Los datos obtenidos de pacientes con defectos hereditarios en los alelos de la subunidad de la NOX que anulan su función enzimática, así como los modelos de ratón, demuestran una profunda desregulación de las respuestas inflamatorias del huésped, la hiperactivación de los neutrófilos y el daño tisular en respuesta a ligandos microbianos o traumatismos tisulares. Una gran cantidad de literatura demuestra ahora cómo los oxidantes funcionan como moléculas de señalización esenciales para la regulación de las respuestas de los neutrófilos durante el cebado, la degranulación, la formación de trampas extracelulares de neutrófilos y la apoptosis, independientemente de su papel en la eliminación microbiana (Zeng, y col., 2019).

1.4.3. Estrés oxidativo y respuesta inflamatoria de los PMN

Las ROS, como el O_2^- y el H_2O_2 , son componentes integrales de múltiples vías celulares, aunque el exceso de estas especies o su localización inadecuada dañan las células. En las vías relacionadas con la inmunidad, las ROS pueden funcionar como moléculas efectoras antimicrobianas y como moléculas de señalización que regulan procesos como la actividad transcripcional del factor nuclear-kB (NF-kB) y la producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) basadas en el ADN (Andrinolo y col., 2008; Kujbida y col., 2008; Aguilera y col., 2017).

Las ROS también participan en vías que regulan la autofagia dentro y fuera del contexto de la inmunidad (Kujbida y col., 2008; Bieczynski y col., 2016). La fagocitosis

y la producción de ROS son mecanismos fundamentales para la eliminación de microbios en los neutrófilos. Varios estudios han indicado la interacción dinámica entre la autofagia y la fagocitosis en la defensa del huésped en los macrófagos (Kujbida y col., 2006; Andrinolo y col., 2008; Kujbida y col., 2008; Aguilera y col., 2017).

Se ha demostrado que la formación de NET requiere tanto la generación de ROS como la inducción de autofagia (Kujbida y col., 2008).

1.4.4. Mecanismos de muerte celular en PMN

a. Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular programada, en la que las células experimentan un “suicidio celular” cuando reciben ciertas señales, no involucra procesos inflamatorios, pero requiere de energía. Es diferente de la necrosis, en la cual las células mueren debido a lesiones. Histológicamente la apoptosis se caracteriza por la condensación o encogimiento de los componentes del citoplasma, con grandes brotes en la membrana celular y condensación de la cromatina que llevan a la formación de cuerpos apoptóticos. Este fenómeno se produce en células aisladas dentro de un tejido. El ADN es fragmentado en trozos de 185 pares de bases o múltiplos, mientras la membrana celular permanece intacta. Luego el cuerpo apoptótico es fagocitado por células vecinas sin generar proceso inflamatorio, ya que no se vuelca contenido intracelular al espacio extracelular (Mankiewicz y col., 2001; Pengxu y col., 2019).

El control de la apoptosis espontánea de los neutrófilos es un proceso exquisito y sofisticado regulado por un número de rutas de señalización. Sin duda, el campo de conocimiento y una mejor comprensión de cómo estas vías de señalización redox sensibles son activadas por ROS, así como la definición de los eventos biológicos acoplados a dicha activación, puede conducir al desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias crónicas (Arruda y Barja-Fidalgo, 2009).

Un tipo particular de apoptosis es la *ferroptosis*, una forma de muerte celular asociada a procesos oxidativos dependiente de la concentración de hierro. Un ejemplo de efecto positivo de la ferroptosis reside en el incremento de la vulnerabilidad de las células cancerosas hacia la muerte, ya que algunas vías oncogénicas están relacionadas con la ferroptosis (Zhang y col., 2023). Si bien el hierro es uno de los principales bioelementos en el organismo y es vital en el transporte de oxígeno a los tejidos, ya que compone la hemoglobina de la sangre, su acumulación en los espacios extracelulares o

intracelulares puede generar efectos tóxicos, mediados por estrés y daño oxidativo (Repetto y Boveris, 2012).

La acumulación de lipohidroperóxidos (ROOH) estimula la ferroptosis (Zhang y col., 2023). El H_2O_2 generado a partir del O_2^- por procesos bioquímicos redox intracelulares en mitocondria (en la cadena de transporte de electrones), retículo endoplásmico (por oxidación de grupos tioles de proteínas) o peroxisomas (por oxidación de ácidos grasos poliinsaturados), como por la actividad de la NOX en la membrana plasmática celular, difunde al citosol celular y en presencia de Fe^{2+} a través de la generación del radical $HO^\bullet$, esta especie muy reactiva oxida a los lípidos mediante la reacción en cadena de la peroxidación lipídica, y en consecuencia, los productos de esta reacción, los lipohidroperóxidos, se acumulan en el citoplasma e inducen la ferroptosis (Zhang y col., 2023).

b. Netosis (NET)

Las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) son estructuras extracelulares compuestas de cromatina y proteínas granulares que se unen a microorganismos y los eliminan. Las NET se liberan al medio extracelular al romperse la membrana celular. Esta estructura basada en el ADN, liberada por los neutrófilos durante un tipo de muerte celular denominada Netosis, ayuda a atrapar bacterias en la circulación sanguínea y en el interior de los tejidos y a aumentar la concentración local de enzimas antimicrobianas alrededor de las bacterias atrapadas. Este proceso de muerte celular es distinto de la apoptosis y la necrosis y depende de la generación de ROS por activación de la NOX.

La formación de NET se induce de forma dependiente de la NOX (Aguilera y col., 2017). Los neutrófilos de ratones KO (*knock out*) (gp91Phox) no muestran formación de NET en respuesta a los estimulantes activadores de la NOX (Kujbida y col., 2008), sin embargo, mostraron formación de NET después de la estimulación con A23187, pero no después de la estimulación con PMA. Esto indica que la formación de NET se produce a través de mecanismos independientes de la NOX en estos ratones. Además, la inhibición de la producción de ROS mitocondriales disminuyó la formación de NET inducida a través de mecanismos dependientes e independientes de la NOX lo que sugiere que ambos mecanismos involucran la generación de ROS mitocondriales. La señalización mitocondrial es esencial para la formación de NET independientes de la NOX (Kujbida y col., 2008).

Los pacientes que presentan enfermedad granulomatosa crónica poseen mutaciones en la NOX y no pueden activar esta vía de muerte celular ni producir NET. Esta nueva muerte dependiente de ROS permite a los neutrófilos cumplir su función antimicrobiana, incluso más allá de su esperanza de vida (Kujbida y col., 2008).

1.5. Propósito de la investigación

El propósito de esta tesis reside en considerar que aún en las concentraciones permitidas y no permitidas de MC-LR y/o de Fe^{2+} en el agua de bebida y recreativas, estos agentes contaminantes pueden generar efectos tóxicos. Conocer los daños que causan las toxinas MC al activar vías de estrés y daño oxidativo, en combinación con concentraciones variables de Fe, en un modelo biológico *in vitro*, a fin de comprender los efectos sinérgicos de ambos agentes tóxicos ambientales, brindará información para ser tenida en cuenta respecto al cuidado de las fuentes de agua de consumo, el ambiente y el ecosistema.

1.6. Hipótesis de trabajo

La hipótesis central de esta Tesis de Maestría es considerar que la exposición de células polimorfonucleares humanas (PMN), neutrófilos, a diferentes concentraciones de MC-LR/hepatotoxina genera una situación de estrés y daño oxidativo celular como mecanismos de toxicidad, que involucra la participación de las especies activas del oxígeno asociada a la respuesta inflamatoria y la misma es afectada o potenciada por la presencia de hierro y que participa en la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton/Haber Weiss.

Tanto el ión Fe^{2+} en solución acuosa como la MC-LR generan daño celular mediante mecanismos de estrés oxidativo, por ello se postula que la combinación de este agente ambiental tóxico, en las concentraciones ensayadas (1 μg MC-LR /L y 25 μg MC-LR/L), serían más graves y dañinas para la salud humana si se combina con el Fe^{2+} presente en aguas de bebida y recreacionales. Los agentes tóxicos evaluados se seleccionaron y se determinaron de acuerdo a las concentraciones permitidas y tóxicas para exponer a los PMN en modelos *in vitro*.



2. Objetivo

2.1. Objetivo General

El objetivo general de esta Tesis de Maestría es caracterizar el estrés y daño oxidativo celular y la participación de las especies activas del oxígeno asociados a la respuesta inflamatoria en células polimorfonucleares humanas (PMN), neutrófilos, expuestos a diferentes concentraciones de MC-LR/hepatotoxina y de hierro, el cual, potenciaría la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton/Haber Weiss.

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta Tesis de Maestría son:

1. Evaluar para cada biomarcador de daño oxidativo y de inflamación, el número óptimo de células que permita garantizar la sensibilidad y reproducibilidad de los métodos a aplicar.
2. Demostrar el daño oxidativo en PMN humanos expuestos a concentraciones permitidas y tóxicas de MC-LR/hepatotoxina mediante la evaluación de marcadores de estrés y daño oxidativo;
3. Demostrar el daño oxidativo en PMN humanos expuestos a concentraciones permitidas de hierro mediante la evaluación de marcadores de estrés y daño oxidativo;
4. Evaluar la sinergia entre MC-LR/hepatotoxina y el hierro en la generación de especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo;
5. Identificar biomarcadores de estrés oxidativo e inflamatorios, y su asociación con marcadores de hipoxia en PMN humanos expuestos a concentraciones permitidas y tóxicas de MC-LR/hepatotoxina, y a niveles permitidos de hierro;
6. Caracterizar la inocuidad en la salud humana de los valores estandarizados de hierro y MC-LR para preservar la calidad de las aguas domiciliarias y recreativas, como así también, caracterizar los efectos tóxicos asociados a la sobrecarga de los mismos;
7. Proponer los mecanismos de la interacción entre hierro y MC-LR/hepatotoxina en neutrófilos humanos teniendo en cuenta el rango de concentraciones presentes en aguas contaminadas.



3. Materiales y Métodos

3.1. Metodología de trabajo

La metodología se divide en **dos etapas**. En la **Primer Etapa (sección a de la metodología)**, se explican los pasos realizados para el **diseño** del modelo experimental *in-vitro* de exposición aguda en células PMN. Allí se describen, en los puntos **a1** y **a2**, las cantidades de xenobióticos a emplear, determinadas de acuerdo a las concentraciones permitidas y tóxicas definidas por la OMS y en base a experimentos previos. Los agentes de contaminación seleccionados, que se encuentran en agua de bebida y recreativas, como la microcistina MC-LR y el Fe^{2+} , se analizaron en la literatura. Además, en los puntos **a1** y **a2**, se describen los procedimientos implementados para obtener la MC-LR y para determinar la concentración de este xenobiótico y del Fe^{2+} .

Luego se explica, en los puntos **a3** y **a4**, la metodología empleada para evaluar y obtener el número óptimo de células necesarias para el estudio de cada biomarcador de estrés, daño oxidativo e inflamación, que permita garantizar la sensibilidad y reproducibilidad de los métodos a aplicar en ciertas condiciones de trabajo. En estos **experimentos iniciales**, además, se estudió la relación de microcistina **MC-LR** y Fe^{2+} , comparados, en principio, con los efectos que causan otros agentes tóxicos ambientales, conocidos y aplicados en experimentos anteriores, como el **PMA** y el Zn^{2+} . También, se trabajó sobre la aplicación de ciertas técnicas de las que no se tenía antecedentes. Los resultados de esta serie de experimentos se presentan en el **Capítulo 1**, del apartado **Resultados**. Allí se puede observar, previo a evaluar los biomarcadores planteados en los objetivos, los resultados de la serie de experimentos realizados para seleccionar la **concentración apropiada de PMN** que permita deducir los **mecanismos de acción** ante la exposición a los **contaminantes ambientales** a estudiar.

En este sentido, se considera fundamental remarcar esta **Primera Etapa** porque es la primera vez que se utiliza este modelo de exposición a microcistina MC-LR y Fe^{2+} en PMN para la evaluación de marcadores de inflamación y estrés oxidativo. La selección de PMN como modelo celular bioquímico para este estudio se justifica porque son células humanas accesibles que permiten estudiar la generación de especies reactivas del oxígeno por el complejo multiproteico NOX, sistema de gran importancia en las células fagocíticas (principalmente neutrófilos y macrófagos). Los PMN participan en la destrucción de microorganismos patógenos, mediante la fagocitosis, consumo de oxígeno y la producción de anión superóxido (O_2^-) (Escobar y col., 1999; Falcone, 1999). Pero, también, se reconoce que los PMN juegan un papel fundamental

como reguladores del desarrollo de cáncer y tumorigénesis espontánea (Halliwell y Gutteridge, 1989). Recientemente, se los ha implicado en la lesión hepática inducida por MC (Ito y col., 2000), como así también, se ha demostrado que MC-LR y [Asp3]-MC-LR aumentan la migración de neutrófilos humanos, la formación de ROS y la capacidad de destrucción de microorganismos (Jaeschke y col., 2002).

La **Segunda Etapa (sección b)**, describe la **metodología** aplicada para alcanzar los **objetivos específicos** que proponen evaluar los **efectos inflamatorios y oxidativos** en PMN, ante la exposición a **MC-LR y Fe²⁺**. Allí se estudian y explican los métodos para la determinación de biomarcadores de daño oxidativo e inflamación, empleados para evaluar el efecto aislado y sinérgico de ambos agentes. Los resultados se presentan desde el **Capítulo 2 hasta el 4**, en la parte **Resultados**, de esta Tesis.

Estos datos pueden observarse a la luz de la teoría introducida. Para comprender, de forma detallada, la evaluación de los xenobióticos en asociación con la inmunotoxicología, la funcionalidad de estas células en modelos *in-vitro* y el conocimiento sobre la oxidación de biomoléculas. En cumplimiento con los objetivos específicos planteados, tanto la MC-LR (Kujbida y col., 2006) como el ion Fe²⁺ (Saporito Magriñá y col., 2022) en solución acuosa, generarían daño celular mediante mecanismos de estrés oxidativo. A su vez, se postula que la combinación de este agente ambiental tóxico, en las concentraciones ensayadas (1 µg MC-LR /L y 25 µg MC-LR/L) serían más graves y dañinas para la salud humana si se combina con el Fe²⁺ presente en aguas de bebida y recreacionales.

a. Primera Etapa: Puesta a punto de los métodos y selección de la concentración óptima de trabajo de PMN y agentes tóxicos

Con respecto a la primera etapa del desarrollo experimental de esta tesis la selección de las condiciones óptimas de trabajo involucró los siguientes pasos:

- a1.** Obtención de las toxinas MC-LR
- a2.** Selección de las concentraciones de Fe^{2+}
- a3.** Obtención de PMN a partir de sangre entera
- a4.** Selección de la concentración óptima de células para la puesta a punto de las técnicas para la evaluación de estrés y daño oxidativo

Con respecto al **punto a4.**, los resultados se presentan en el **Capítulo 1** (parte **4.1. Resultados**), de la presente tesis.

a1. Obtención de las toxinas MC-LR

La purificación de las MC-LR se llevó a cabo en el Laboratorio de la Dra. Carolina Gonzalez a partir de floraciones naturales de *Microcystis aeruginosa* recolectadas en la cuenca del Río de la Plata mediante métodos establecidos con ligeras modificaciones. Para ello las células se lisaron mediante 3 ciclos de congelación-descongelación y el extracto orgánico se extrajo con una mezcla cloroformo / metanol (50:50; V: V). La fracción acuosa se concentró en un rotavapor (Decalab, R-23, Buenos Aires, Argentina). Finalmente, la purificación se realizó con una cromatografía líquida semipreparativa de alta resolución. Para ello se empleó un cromatógrafo Hewlett-Packard (HP 1100, EE. UU.) con un módulo desgasificado y un sistema de detección de diodos. La columna preparativa utilizada fue TERMO Hyperprep HS C18 (250 10 mm) y la fase móvil fue tampón fosfato (pH 7,0) con acetonitrilo al 30%, corrido en condiciones isocráticas a 5 mL/min. La detección se realizó a 238 nm. El pico correspondiente a MC-LR se recogió por separado, se concentró y se desaló con un cartucho C18, previamente activado. Se eluyó MC-LR puro con una solución de metanol-agua (90:10, V: V) y se evaporó el metanol. La toxina se obtiene mediante el método HPLC-MS. La identificación y concentración finales de MC-LR se lograron por comparación con un estándar de toxina de Sigma Chemical Inc. (St. Louis, MO). Esta metodología fue descrita previamente por la Dra. González (Bieczynski y col., 2016).

En la Figura 7 se incluye la foto de un cromatograma realizado para evaluar la pureza de la muestra y obtener la concentración de MC-LR en la misma, se muestran las condiciones de trabajo, curva de calibración y el pico del cromatograma correspondiente a MC-LR.

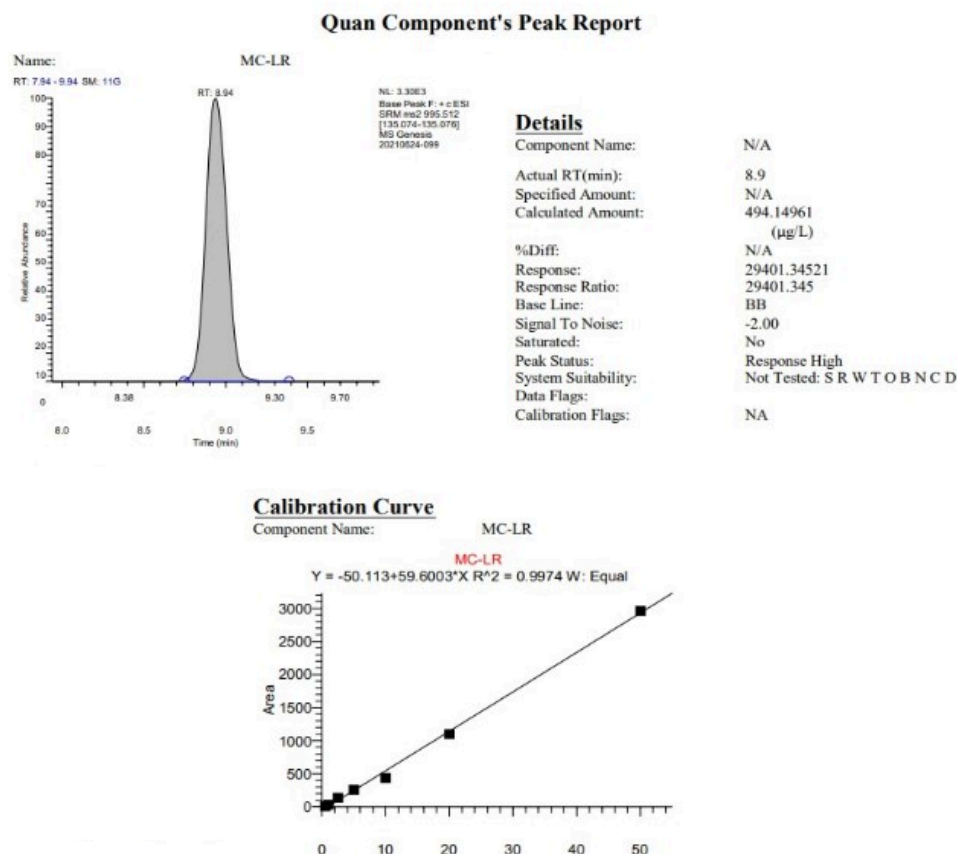


Figura 7. Análisis cromatográfico de la toxina Microcistina (MC-LR) proveniente de la Cuenca del Plata mediante HPLC UV y HPLCMS. Información compartida por la Dra. Carolina González

Se utilizó la toxina MC-LR por ser una de las más frecuentes y tóxicas entre los congéneres de MC y porque se dispone de datos toxicológicos suficientes como para derivar un valor de referencia provisional. El límite de concentración de MC-LR permitido en aguas de bebida es de 1 µg/L y la ingesta diaria tolerable (IDT) calculada en 0.04 µg/kg de peso corporal, basada en el daño hepático observado en un estudio de 13 semanas en ratones (US EPA, 2015).

Las concentraciones de MC-LR utilizadas para este estudio se definieron a partir de:

a) el límite que informan las guías de la OMS como valor provisional para aguas de red, estimado en 1 µg MC-LR /L

b) la concentración que se emplea en modelos experimentales subagudos, 25 µg MC-LR/L (OMS, 2018).

a2. Selección de las concentraciones de Fe²⁺

En cuanto a la selección del oligoelemento estudiado, se conoce que el hierro se encuentra presente en aguas de bebida y recreacionales. También es potencialmente tóxico, ya que puede participar en reacciones redox, involucrado en el estrés oxidativo de numerosas condiciones patológicas.

Se seleccionaron tres concentraciones de hierro inorgánico:

a) 6 µg Fe²⁺/L, b) 30 µg Fe²⁺/L, c) 300 µg Fe²⁺/L

Las dos primeras concentraciones seleccionadas, se calcularon a partir del valor recomendado por la OMS (nivel estándar permitido) y de acuerdo a la capacidad de absorción intestinal humana. Si bien la OMS no propone ningún valor de referencia para el hierro en el agua de consumo humano, en su “*Guía de agua provisional para aguas de red: cuarta edición que incorpora la primera adenda*” define para el agua potable un valor recomendado en 0,3 mg/L para evitar cambios en las propiedades organolépticas del agua de bebida. La capacidad de absorción intestinal humana se estima entre 2% y 10% del total ingerido, por lo tanto, las concentraciones consideradas para este estudio son 6 µg Fe²⁺/L y 30 µg Fe²⁺/L. Es en base a estas consideraciones, estas concentraciones del elemento traza, son reconocidas como “normales” y la mayor (300 µg Fe²⁺/L) se considera como un valor tóxico de sobrecarga en condiciones agudas, posiblemente vinculado a los fenómenos de apoptosis desencadenado por el hierro, la *ferroptosis* (Pengxu y col., 2019).

a3. Obtención de PMN a partir de sangre entera

La obtención de las muestras de estas células se realizó en el Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital de Clínicas José de San Martín a partir de sangre venosa de 6 donantes voluntarios aparentemente sanos, para cada uno de los experimentos se obtuvo un pool de células PMN. El desarrollo experimental de la tesis

se realizó sobre PMN aislados a partir de muestras de sangre fresca anticoaguladas con heparina, y obtenidas para realización del Hemograma en el laboratorio de Hematología del Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital de Clínicas José de San Martín, y/o de donantes voluntarios de sangre que asisten al Servicio de Hemoterapia del mismo Hospital, y todos con resultados normales en los parámetros hematimétricos. Los experimentos no requerían gran cantidad de muestras, sino simplemente el uso de algunas de ellas debidamente seleccionadas por sus resultados dentro de los parámetros normales, y sin vínculo de identidad con el paciente o donante, dado que no implica ningún estudio relacionado a posibles situaciones clínico-patológicas. El plan de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (Res (CD) 343/18) y renovada su aprobación en el año 2021 por dicho Comité de Ética.

Las muestras de sangre fueron procesadas, en el día, en el Laboratorio de Hematología del Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital de Clínicas José de San Martín, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, donde se realizó el fraccionamiento celular y el conteo de células.

El objetivo fue obtener una concentración óptima de células, es decir un pool de células, que permitan reproducir los experimentos deseados de acuerdo a la sensibilidad de cada método. Una vez que se seleccionaron las muestras de los pacientes se evaluó su fórmula leucocitaria y se dejó sedimentar la muestra de sangre para separar el plasma que luego se centrifugó durante 10 minutos (min) a 600 g. Se separaron del suero los granulocitos y algunos restos de glóbulos rojos que quedan en un pellet posterior al procedimiento.

Para poder aislar las células PMN, se expuso secuencialmente el pellet resultante, que contiene células granulocitos y restos de eritrocitos, a dos concentraciones de una solución de cloruro de sodio (NaCl), 0,2 % P/V y 1,6% P/V, para inducir el shock hipotónico en las células anucleadas y la resuspensión de los PMN en una solución final isotónica (medio fisiológico). El conteo de las células se realizó con un autoanalizador hematológico Sysmex XN-550.

Estas fracciones enriquecidas en PMN fueron posteriormente remitidas al Laboratorio de la Cátedra de Química General e Inorgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica para la realización de los experimentos y la evaluación de los marcadores de estrés y daño oxidativo en cumplimiento de los objetivos específicos planteados.

Los PMN así obtenidos se separaron en alícuotas resuspendidos en solución salina reguladora (buffer fosfato pH 7,40) y finalmente, estos pooles de células frescas fueron utilizados en el día de su extracción para las determinaciones de ΔO_2 , quimioluminiscencia espontánea y las determinaciones bioquímicas de marcadores de estrés y daño oxidativo.

a4. Selección de la concentración óptima de células para la puesta a punto de las metodologías.

Las condiciones estandarizadas de los experimentos se ajustaron fundamentalmente a partir de la determinación de la concentración de células PMN por mL. Las mismas son necesarias para manipular y adecuar las muestras obtenidas, así como también, para optimizar las condiciones de trabajo y la sensibilidad de las metodologías que se emplearon.

En cuanto a la **determinación del consumo de oxígeno**, el objetivo de este experimento fue estudiar el número de células óptimo que debe ser empleado para estandarizar los métodos y los resultados y hacer una lectura más precisa del electrodo de oxígeno tipo Clark, sensible al oxígeno para medir el estallido celular respiratorio (Ito y col., 2000). Los PMN aislados se dividieron en varios tubos cuya concentración final de PMN se ajustó con solución reguladora de consumo (100 mM, pH 7,40, suplementado con 0,9 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$ y 7,5 mM de glucosa) desde 5×10^6 a 8×10^4 células/mL en cada tubo. Con el objetivo de seleccionar la concentración óptima de células para la evaluación del ΔO_2 , los PMN se incubaron durante 15 minutos, a 37 °C en ausencia y en presencia de un activador de la actividad de PMN, el forbol miristato acetato (12-miristato 13-acetato forbol, PMA; concentración de 0,2 $\mu g/mL$) (Valdez y Boveris, 2001), o con un inhibidor, el Zn^{2+} (4 mM) (Franklin y Costello, 2009), y se midió el ΔO_2 de los PMN con un oxígrafo Hansatech, el cual cuenta con un electrodo tipo Clark sensible al oxígeno. Se realizaron tres experimentos con todos los grupos de muestras y cada medición del ΔO_2 se realizó por triplicado.

Para la determinación de la **quimioluminiscencia espontánea de PMN**, con el objetivo de seleccionar la concentración óptima de células para medir la quimioluminiscencia espontánea se evaluaron las mismas concentraciones de las suspensiones de PMN que en el experimento anterior, en buffer fosfato 100 mM, pH 7,40 suplementado con 0,9 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$ y 7,5 mM de glucosa: 6, 8 y 20×10^4 células/mL, para mantener las células vivas. Cada suspensión de PMN se evaluó en

ausencia o presencia de PMA (0,2 µg/mL), o de Zn²⁺ (4 mM), incubados durante 15 minutos, a 37 °C con la solución reguladora sola o con cada uno de los agentes utilizados como control positivo y negativo respectivamente. Inmediatamente se midió la quimioluminiscencia espontánea en un contador de fotones (Boveris y col., 1980; Cadenas y col, 1994; Repetto, 2008). Se realizaron tres experimentos con todos los grupos de muestras y cada medición de la quimioluminiscencia se realizó por triplicado.

Por último a fin de ajustar la determinación de los **marcadores bioquímicos de estrés y daño oxidativo en PMN** se establecieron las concentraciones óptimas de células, necesaria para la determinación de proteínas carbonilo, lípidos oxidados, la NOX y GSH en las muestras de PMN resuspendidos en buffer fosfato (pH 7,40). Se concluye en la presente tesis que las mismas se encuentran en un rango de concentración de PMN comprendido entre 8 x 10⁴ PMN/mL y 5 x 10⁶ PMN/mL. En los primeros ensayos fue necesario determinar la concentración de proteínas en la muestra para posteriormente detectar los analitos. La concentración de proteínas se midió mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Para el caso particular de la determinación de carbonilos la cantidad de células debía ser suficiente para permitir sedimentar las proteínas durante el ensayo y evitar que estos sedimentos se pierdan en los diversos pasos del procesamiento, sucesivos lavados de la muestra, que se requieren para su procesamiento.

b. Segunda etapa: Determinaciones bioquímicas para la evaluación de inflamación, estrés y daño oxidativo en PMN expuestos a MC-LR y Fe²⁺

En todos los casos, se expusieron concentraciones crecientes de PMN a los agentes tóxicos, MC-LR y Fe²⁺ y se realizaron las determinaciones correspondientes a cada ensayo.

Las determinaciones bioquímicas que se realizaron para evaluar el efecto del Fe²⁺ y de MC-LR en PMN en cumplimiento de los objetivos específicos que buscan *“demostrar el daño oxidativo e identificar biomarcadores de estrés y daño oxidativo e inflamatorios en PMN humanos expuestos a concentraciones permitidas y tóxicas de MC-LR/hepatotoxina y de hierro mediante la evaluación de marcadores de estrés y daño oxidativo, caracterizar la inocuidad en la salud humana de los valores estandarizados de hierro y MC-LR para preservar la calidad de las aguas domiciliarias y recreativas, como así también caracterizar los efectos tóxicos asociados a la sobrecarga de los mismos y proponer los mecanismos de la interacción entre hierro y MC-LR/hepatotoxina en el rango de concentraciones presentes en aguas contaminadas”* fueron:

- b1.** Ensayo de viabilidad
- b2.** Respuesta y activación de PMN medido por Consumo de oxígeno
- b3.** Peroxidación lipídica medida por quimioluminiscencia espontánea
- b4.** Determinación del contenido de proteínas
- b5.** Oxidación de proteínas medida por la cantidad de proteínas carbonilo
- b6.** Oxidación de lípidos medida por la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)
- b7.** Actividad de la NADPH oxidasa (NOX)
- b8.** Contenido intracelular de Glutación reducido (GSH)
- b9.** Índices de estimulación del estallido respiratorio y del estrés oxidativo

b1. Ensayo de viabilidad

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra y puede evaluarse con ensayos que permitan determinar la actividad enzimática, la integridad de la membrana celular y la producción de ATP, entre otros indicadores. Es un indicador vital para comprender los mecanismos en acción de ciertos genes,

proteínas y vías involucradas de supervivencia celular o muerte después de la exposición a agentes tóxicos (Adan y col., 2016).

La prueba de exclusión de colorante se utiliza para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular. Este método evalúa la integridad de la membrana y se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos colorantes, como el azul de tripano, mientras que las células muertas no lo hacen. En esta prueba, una suspensión celular se mezcla con tinte y luego se examina en un microscopio para determinar si las células absorben o excluyen el tinte.

Técnica: Para la evaluación del porcentaje de PMN viables se utilizó una pequeña fracción del pool de células PMN que resultó del procesamiento de las muestras de los pacientes aparentemente sanos para ser mezclada con una solución al 0,4% de azul tripán antes de ser observada bajo el microscopio en una cámara de Neubauer. Se usó una mezcla isovolumétrica de azul tripán y una suspensión celular de PMN, 10 μ L de suspensión celular y 10 μ L de azul tripán.

b2. Respuesta y activación de PMN medido por consumo de oxígeno

La activación de las células fagocíticas por un estímulo proinflamatorio conduce a la producción de intermediarios reactivos del oxígeno. Ellos cumplen un papel relevante no sólo en la destrucción de microorganismos invasores sino también en la generación de lesiones tisulares asociadas a manifestaciones autoinmunes. Los intermediarios reactivos del oxígeno incluyen radicales oxidantes, halógenos oxidados y el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). Son generados por reducción parcial del oxígeno molecular a través de un proceso denominado estallido celular respiratorio. El mismo se caracteriza por un incremento abrupto en el consumo de oxígeno (ΔO_2) y la activación de la vía metabólica denominada desviación de las hexosas monofosfato, generadora de potencial de reducción bajo la forma de NADPH (Boveris y col., 1980; Babior, 1992).

Técnica: Preparación de la muestra y medida del ΔO_2

El estallido celular respiratorio se evaluó como el ΔO_2 en PMN aislados y resuspendidos en un buffer de consumo, que consiste en una solución de buffer fosfato 100 mM, pH 7,40, suplementado con 0,9 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 y 7,5 mM de glucosa. El ΔO_2 se determinó polarográficamente mediante respirometría de alta resolución, con la utilización de un electrodo tipo Clark (Hasantech Oxygraph System DW1). Se realizó la calibración previa del equipo, siguiendo las instrucciones del

software, para ello la cámara de medición se llenó con el buffer de consumo y la ganancia se ajustó al 100% de ΔO_2 con agitación ya que la solubilidad del oxígeno es 0,22 mM a 25 °C, luego se añadió un exceso de ditionito de sodio ($Na_2S_2O_4$) para establecer el 0% de consumo. Luego la cámara del oxígrafo se lavó cuidadosamente con agua destilada hasta alcanzar el valor inicial de concentración de O_2 . Para el ensayo, se colocó en la cámara 1 mL del buffer de consumo y se dejó estabilizar, y se agregó el volumen de la suspensión de muestra necesario para alcanzar la concentración de PMN a evaluar en la cámara del electrodo. Se registró la pendiente de la curva de consumo correspondiente a 1 minuto de respiración (expresada como nmol O_2 /min mL). Los resultados se expresaron en nmol O_2 /min/ 10^6 células (Musacco Sebio, 2016). El efecto sobre la activación de los PMN con la exposición a MC-LR y Fe^{2+} fue evaluado mediante el ΔO_2 con un electrodo tipo Clark a 37 °C.

b3. Peroxidación lipídica medida por quimioluminiscencia espontánea

La quimioluminiscencia espontánea (QL) es un marcador de daño y estrés oxidativo. Su determinación se realiza mediante el uso de un contador de fotones, como una medida de la emisión de luz por la desexcitación del oxígeno singlete (1O_2), producto final del proceso de lipoperoxidación (Chance y col., 1979; Boveris y col., 1980; Cadenas y col., 1994; Repetto, 2008). Este método permite estimar en forma cuantitativa la concentración en estado estacionario de ROS, específicamente de 1O_2 mediante la emisión de luz generada por la desexcitación de estas especies generadas durante la oxidación de los lípidos.

La determinación de la QL se fundamenta en la medida de la emisión de luz asociada a la transición del estado excitado del 1O_2 y de los radicales $ROO^{\bullet}$ al nivel fundamental. El mecanismo molecular de la quimioluminiscencia involucra la reacción entre dos radicales $ROO^{\bullet}$ producidos en la etapa de terminación de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, mediante la reacción de Russel. A su vez, dos moléculas de 1O_2 reaccionan entre sí y emiten fotones a una longitud de onda en un rango de 640 y 710 nm (Boveris y col., 1980).

Es un ensayo indirecto, no invasivo y no destructivo para el sistema biológico específico (célula, tejido, órgano) que permite evaluar *in vivo* la peroxidación de fosfolípidos en condiciones fisiológicas y/o fisiopatológicas.

La lectura de la QL se realizó con un contador de fotones (Johnson Research Foundation) (Boveris y col., 1980). Este equipo consta de:

a) una fuente de alto voltaje para el fotomultiplicador; b) un tubo fotomultiplicador (EMI 9658) sensibilidad extendida en el rojo y con un sistema adecuado de enfriamiento para mantener al fototubo a 35 °C por debajo de la temperatura ambiente (enfriador Fact Mark (II), EMI Gencom. Inc.) que permite mantener la corriente oscura en valores del orden de 200-400 cps (cuentas por segundo); c) un amplificador-discriminador (Princeton Applied Research, Modelo 1121); d) un registrador ó un contador de pulsos (Hathkit, Modelo MI-4100) y e) compartimiento oscuro y termostatzado para la muestra (caja de madera de 22 cm x 15 cm x 50 cm, pintada de negro y con una trampa de luz en la tapa), está equipada con un obturador y en una de las paredes posee una espira de cobre para termostatzar la caja completa a la temperatura de trabajo. El equipo cuenta también con una barra de lucita (polimetilacrilato) de 15 cm de longitud y 5 cm de diámetro con sus caras ópticas pulidas y forrada lateralmente con papel de aluminio y cinta negra (para que no pase la luz) que separa la muestra del fototubo, permitiendo un aislamiento térmico con acoplamiento óptico entre la muestra y el fotomultiplicador (Boveris y col., 1980).

Técnica: *Preparación de la muestra y medida de la emisión de luz.* La suspensión de PMN en la misma solución salina equilibrada utilizada para la determinación del ΔO_2 se colocó en un pesafiltro de vidrio cubierto con papel de aluminio, en el que se deja una ventana de 1 cm² para exponer la suspensión de PMN al fototubo del contador fotones. Se realizó una lectura inicial durante 20 segundos con el obturador del aparato cerrado (emisión basal), y posteriormente durante 30 segundos con el obturador abierto. Los resultados se expresaron en cps/cm² o cps/10⁶ células.

b4. Determinación del contenido de proteínas

Para conocer la concentración de PMN necesaria para la evaluación de los marcadores de estrés y daño oxidativo se evaluó previamente el contenido de proteínas presente en la muestra, mediante el método de Lowry, empleando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar (Lowry y col., 1951).

Técnica: Este método consiste en la reacción de las proteínas de la muestra con sulfato de cobre en medio alcalino durante 10 minutos a temperatura ambiente. Como resultado de esta reacción, se forma un complejo de cobre tetradentado entre cuatro enlaces peptídicos y un átomo de cobre (reacción de Biuret). Posteriormente al agregado de una solución reactivo de fenol-Folin (ácido fosfomolibdénico-fosfotúngstico) se observa un color azul intenso debido a la transferencia de electrones desde el complejo

tetradentado del cobre hacia el ácido fosfomolibdénico-fosfotúngstico. El color azul se intensifica durante los primeros 30 minutos a temperatura ambiente y absorbe luz visible a 625 nm, medida en un espectrofotómetro (Jasco, modelo 7850). Se realizó una curva de calibración con albúmina para posteriormente expresar los resultados de biomarcadores por miligramo de proteínas.

b5. Oxidación de proteínas medida por la cantidad de proteínas carbonilo (CO)

La formación de carbonilos en los aminoácidos de las proteínas es uno de los marcadores tempranos de daño oxidativo y se utiliza como la medida de la oxidación de proteínas mediados por H_2O_2 y O_2^- . Este método se basa en la reacción del grupo carbonilo con una hidracina 2,4 dinitrofenilhidracina (DNPH) disuelta en ácido clorhídrico (HCl) para dar como producto estable una hidrazona ligada a la proteína. (Levine, y col., 1990; Reznick y Packer, 1994).

Técnica: El contenido de carbonilos proteicos se utilizó como la medida de la oxidación de proteínas (Levine y col., 1990). Las muestras se incubaron con 2,4 DNPH, durante una hora en oscuridad con agitación cada 15 min, luego se precipitaron las proteínas con TCA 20 % P/V, y se incubaron durante 10 min en hielo y posteriormente se centrifugaron y descartaron los sobrenadantes. Estos lavados se repitieron cuatro veces con el empleo de TCA 10 % P/V, se descartaron los sobrenadantes y los precipitados obtenidos se lavaron con una solución de etanol-acetato de etilo 1:1 (V/V) para remover el exceso de 2,4-DNPH y contaminantes lipídicos, hasta obtener un color blanquecino (Reznick y Packer, 1994). La determinación del contenido de carbonilos proteicos se realizó por espectrofotometría en un lector de placa modelo Anthos 2020. Los resultados se expresan como nmoles de proteínas carboniladas/ mg de proteína o nmoles de proteínas carboniladas/ 10^6 PMN (Reznick y Packer, 1994).

b6. Oxidación de lípidos medida por la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La oxidación de fosfolípidos se evaluó a partir de la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por medio de una técnica colorimétrica. Estas especies son indicadores de la producción de malondialdehído (MDA) (Yagi, 1998).

Técnica: Las suspensiones de PMN se mezclaron en una proporción 1:1 con ácido tricloroacético (TCA) 20% P/V para precipitar las proteínas, y se centrifugaron durante 10 min a 600 g. Se extrajo el sobrenadante al que se le añadió

3,5-di-ter-4-butilhidroxitolueno (BHT) 4% P/V en etanol para interrumpir la reacción de peroxidación de los fosfolípidos. Luego se le agregó el ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,7% P/V y la mezcla se incubó a 100 °C durante 1 h hasta la formación del complejo color rosado por la reacción entre el TBA y el MDA que absorbe a una longitud de onda de 535 nm. La determinación se realizó con un espectrofotómetro UV-visible Jasco 7850. Los resultados se expresaron como nmoles TBARS (equivalentes de MDA) /10⁶ PMN (Yagi, 1976).

b7. Actividad de la NADPH oxidasa (NOX)

Este método permite detectar en forma indirecta la producción de anión superóxido en células intactas, midiendo la luminiscencia de la lucigenina en células PMN no activadas (Li y col., 1998).

Técnica: Las muestras se incubaron en presencia y ausencia de lucigenina (1 o 5 µM), y se midió continuamente la luminiscencia en un luminómetro (lector de placa modelo Anthos 2020) durante 30 minutos a 37 °C. El catión radicalario de la lucigenina reacciona con el anión superóxido generado en componentes citosólicos o en la membrana de PMN, que dan lugar a derivados dioxetano excitados como producto de la reacción, que al volver a su estado basal emiten luz en forma de luminiscencia. Los resultados se expresaron en unidades relativas de luminiscencia (URL) por min y por mg de proteína (Liy col., 1998).

b8. Contenido intracelular de Glutación reducido (GSH)

El glutatión reducido (GSH) constituye la mayor parte de los niveles de glutatión total (GSH + GSSG). Los compuestos no proteicos con grupos SH reaccionan con DTNB para formar TNB, compuesto coloreado que absorbe a 412 nm. La reacción de oxidación del GSH se lleva a cabo con ácido (5,5'-ditiobis)-2-nitrobenzoico (DTNB), que se transforma en 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) (Akerboon y Sies, 1981) según la siguiente ecuación:



La formación de TNB se midió espectrofotométricamente a 412 nm.

Técnica: La mezcla de reacción consiste en 100 mM de buffer fosfato, pH: 7,20; el reactivo de color es el ácido 5-5' di-tio-bis-nitrobenzoico (DTNB) 0,1 mM en solución amortiguadora fosfato de sodio y potasio; y 30 μ L de la muestra. Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro UV-visible Jasco 7850. El contenido de GSH se calculó con un $\epsilon_{412} = 13,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y se expresó en μ M por mL, mM, o μ moles de GSH/ 10^6 PMN (Akerboon y Sies, 1981).

b9. Índices de estimulación del estallido respiratorio y del daño oxidativo

A partir de los resultados obtenidos se calcularon los **indicadores de estimulación o inhibición del estallido respiratorio y la activación de NOX**, de lo que resulta el **índice de inflamación**, y la **relación de la QL, CO y GSH**, que permiten calcular el **daño oxidativo** a biomoléculas. El uso de estos índices alcanza a relacionar los valores obtenidos de cada uno de los parámetros evaluados en PMN expuestos a distintas concentraciones de MC-LR y de Fe^{2+} , entre sí y respecto al valor basal de células vivas sin exposición a ambos agentes tóxicos (control).

b9.1. Cálculo del índice de inflamación

El **índice de respuesta inflamatoria** se calculó para evaluar si la exposición al agente contaminante genera cambios en cada uno de los biomarcadores en estudio. Se estimó a partir de los valores hallados de ΔO_2 para PMN expuestos a cada agonista con respecto a los PMN control (sin exposición, en estado basal) como un indicador de respuesta, del estallido celular respiratorio, como $\Delta\text{O}_2\text{tratado}/\Delta\text{O}_2\text{control}$.

También se estimó el **índice de inflamación** mediante la combinación de dos indicadores: ΔO_2 , y NOX. Este índice permite evaluar en forma cuantitativa la respuesta inflamatoria en los PMN. Se calculó a partir de la **relación $[(\Delta\text{O}_2 \text{ tratado}/\Delta\text{O}_2 \text{ control}) + (\text{NOX tratado}/\text{NOX control})]/2$** para cada punto de las curvas de dosis respuesta de los PMN expuestos a cada agonista estudiado (tratados) y sus correspondientes controles. Resultados mayores a 1 indican estimulación, igual a 1 que no genera cambios y menores a 1 que el agonista presenta un efecto inhibitorio.

b9.2. Cálculo del índice de daño oxidativo

El **índice de daño oxidativo**, calculado para evaluar si la exposición al agente contaminante genera cambios en cada uno de los biomarcadores en estudio, se estimó a partir de los valores hallados de QL para PMN expuestos a cada agonista con respecto a los PMN control (sin exposición, en estado basal) como QLtratado/QLcontrol.

También se estimó el **índice de daño oxidativo** mediante la combinación de tres indicadores, teniendo en cuenta los procesos asociados de oxidación y protección antioxidante, ellos son, QL, CO y GSH. Este índice permite evaluar en forma cuantitativa el daño oxidativo en células, tejidos y órganos mediado por radicales libres. Se calculó a partir de la relación $[(\text{QL tratado}/\text{QL control}) + (\text{carbonilos tratado}/\text{carbonilos control}) + (\text{GSH tratado}/\text{GSH control})]/3$ para cada punto de las curvas de dosis respuesta de los PMN expuestos a cada agonista estudiado (tratados) y sus correspondientes controles (Boveris y col., 2012). Resultados mayores a 1 indican estimulación, igual a 1 que no genera cambios y menores a 1 que el agonista presenta un efecto inhibitorio.

3.2. Análisis estadístico

Los datos en el texto, en las figuras y en las tablas están expresados como media $\pm$ ESM de 3 a 4 experimentos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron con el test de análisis de la varianza (ANOVA, con software Prism 7.0, GraphPad Instat, San Diego, CA,USA) . Los post-tests estadísticos utilizados fueron el test de Tukey y Student-Newman-Keuls. Los resultados fueron considerados significativos con un $p < 0,05$ (*), muy significativos con un $p < 0,01$ (**) y extremadamente significativos con un $p < 0,001$ (***).

3.3. Instrumentos

El instrumental empleado para el desarrollo de esta tesis incluye:

a. Para las determinaciones espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Jasco 7850, espectrofotómetro termostatzado UV-visible Beckman Coulter DU 7400, espectrofluorómetro Hitachi F-301, lector de placas Anthos 2020, baño termostático Vicking Modelo Dubnoff.

b. Para la determinación de ΔO_2 se utilizó un oxígrafo Marca Hansatech con electrodo sensible a oxígenos tipo Clark, modelo DW1-S1, Hansatech Instruments Ltd.

c. Para las determinaciones de quimioluminiscencia espontánea de PMN se utilizó un contador de fotones, luminómetro Johnson Research Foundation, Filadelfia, USA.

d. Para la determinación de la luminescencia de la lucigenina en la evaluación de la actividad de la NOX se empleó un Lector de placas Anthos 2020.

e. Para la preparación de las muestras se utilizó un sonicador Branson 250 Sonifier (ultrasonidos Branson, Danbury, CT, USA), granizadora de hielo Scotsman AF-20, pHmetro Vega VI Parsec S.A, balanzas Mettler Type H6 y Mettler PM 480, microscopio óptico, y agitador magnético FAC (AMC 20).

3.4. Reactivos

Los siguientes reactivos utilizados en este trabajo de tesis fueron adquiridos en SIGMA-ALDRICH: BHT, BSA, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CDNB, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,4-DNPH, DTNB, EDTA, FeCl_2 , GSH, HClO_4 , KH_2PO_4 , KCl, NaCl, NADPH, sacarosa, TBA, TCA. Otros reactivos fueron adquiridos en la compañía Merck KGaA, Darmstadt, Alemania: acetato de etilo, ácido fosfórico, etanol, HCl, K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCN.

3.5. Financiamiento

El desarrollo de esta tesis de Maestría fue financiado con fondos de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT Programación 2018: UBACYT 20020170100197BA y UBACyT Programación 2023: 20020210300142BA) y de la Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PICT 2016-02077 y PICT 2020-01264), con la dirección de la Dra. Marisa Repetto, y se llevó a cabo en la Cátedra de Química General e Inorgánica, Departamento de Ciencias Químicas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires e Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular Prof. Alberto Boveris (IBIMOL, UBA-CONICET).



4. Resultados

4.1. Capítulo 1. Selección de concentración óptima de PMN

Con el objetivo de optimizar las condiciones de trabajo, como se ha señalado en la Primera Parte de la metodología, para el diseño del modelo experimental de este trabajo de tesis se evaluaron diferentes concentraciones de suspensión de PMN y se midieron los biomarcadores de inflamación y daño oxidativo para PMN en estado basal (controles) o en presencia de agentes estimulantes o inhibidores de la actividad de estas células.

El rango de concentraciones evaluado se seleccionó a partir de resultados previos realizados con concentraciones crecientes de PMN a las que se les midió el ΔO_2 basal y luego de la exposición a concentraciones fijas de lipopolisacáridos (LPS) y *12-miristato 13-acetato forbol* (PMA), ambos estimulantes de actividad de los PMN (Lairion y col., 2023) y con Zn^{2+} , un inhibidor del estallido respiratorio.

4.1.1 Procesamiento de la muestra

En la Figura 8 se puede ver el resultado del análisis realizado en una de las muestras de sangre de un paciente voluntario sano, con el autoanalizador hematológico Sysmex XN-550 en el Laboratorio de Hematología del Hospital de Clínicas José de San Martín. A partir de este hematograma se conoce el número total de PMN presentes en la muestra y la concentración expresada en cantidad de PMN en un mililitro de muestra (PMN/mL) que van a ser fraccionados.

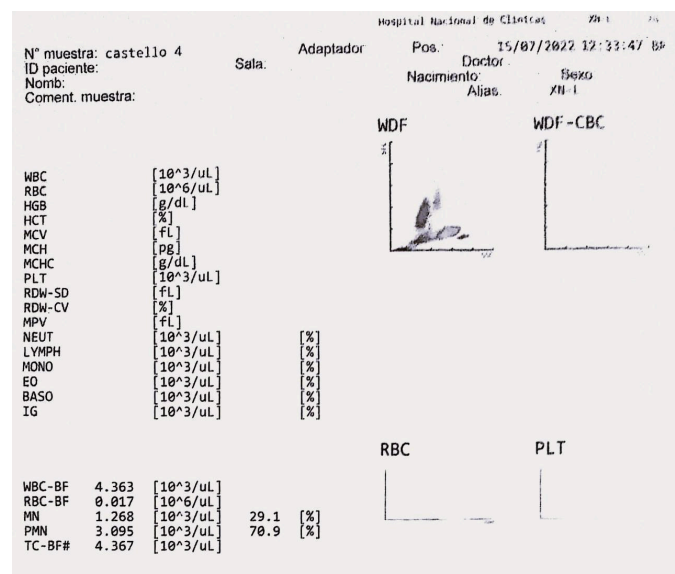


Figura 8. Ejemplo de un hematograma obtenido con el autoanalizador hematológico Sysmex XN-550.

Una vez realizado el fraccionamiento de las muestras según el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos de esta Tesis de Maestría, se realizó el ensayo de viabilidad para conocer el total de células vivas que se obtuvieron.

4.1.2. Ensayo de Viabilidad

Para la evaluación de los biomarcadores de inflamación y daño oxidativo, medidos por ΔO_2 y quimioluminiscencia espontánea, respectivamente, como indicadores de la respuesta inmediata de los PMN a la exposición aguda de los dos agentes de contaminación propuestos, se necesita que las células se encuentren vivas. Por ello es de suma importancia determinar la viabilidad de los PMN que se deben utilizar en los experimentos, tanto para conocer el estado de las células como para ajustar el número de células activas que participan en el fenómeno del estallido celular respiratorio como en la quimioluminiscencia.

El valor promedio de células PMN viables que resultó del procesamiento de las muestras de los pacientes aparentemente sanos fue del $98\% \pm 2$ células. También se calculó la viabilidad de las células, posterior a la incubación con MC-LR y Fe^{2+} a distintas concentraciones. El resultado de células viables mantuvo el nivel en $98\% \pm 2$ células en todos los casos.

4.1.3 Selección de concentración de PMN para consumo de oxígeno y quimioluminiscencia espontánea

Las muestras de PMN aislados se fraccionaron hasta obtener distintas concentraciones de PMN, cuya concentración final de PMN se ajustó en 2, 6, 8 y 20×10^4 células/mL, 1×10^5 , $1,5 \times 10^5$, 1×10^6 y 5×10^6 células/mL en cada tubo. El objetivo fue estudiar el número de células óptimo que debe ser empleado para estandarizar los resultados y hacer una lectura más precisa con los instrumentos de medición, el electrodo tipo Clark sensible al oxígeno para medir el estallido celular respiratorio y el contador de fotones para medir la quimioluminiscencia, resultado de la peroxidación lipídica de la membrana celular de PMN.

El rango de concentraciones de células a las que se les midió el ΔO_2 basal y luego de la exposición a concentraciones fijas de lipopolisacáridos (LPS) y *12-miristato 13-acetato forbol* (PMA), ambos estimulantes de actividad de los PMN (Lairi3n y col.,

2023) y con Zn^{2+} , un inhibidor del estallido respiratorio, estaban comprendidas en un rango de 2×10^4 a 5×10^6 PMN/mL.

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de células para la evaluación del ΔO_2 en PMN incubados previamente durante 15 minutos a $37^\circ C$ con PMA ($0,2 \mu g/mL$) o Zn^{2+} ($4 mM$) se utilizó un oxígrafo Hansatech el cual cuenta con un electrodo tipo Clark sensible al oxígeno (Tabla 3).

En la tabla 3 se muestran los resultados del ΔO_2 medidos de PMN expuestos a un activador y a un inhibidor del estallido respiratorio. Se puede observar que cuando se exponen 2×10^4 PMN/mL ($p < 0,05$), 6×10^4 PMN/mL ($p < 0,001$), 8×10^4 PMN/mL ($p < 0,01$) o 20×10^4 PMN/mL ($p < 0,01$) a PMA ($0,2 \mu g/mL$) el ΔO_2 aumenta con respecto al control (PMN sin exponer). Por el contrario, cuando los PMN son expuestos a Zn^{2+} ($4 mM$) se inhibe totalmente (100% , $p < 0,01$) el estallido celular respiratorio con las concentraciones menores de PMN, con las mayores concentraciones de PMN la inhibición fue menor (80% , $p < 0,05$, 20×10^4 PMN/mL) (Tabla 3).

Tabla 3. Consumo de oxígeno de distintas concentraciones de PMN en estado basal (control) o expuestos a PMA ($0,2 \mu g/mL$) y Zn^{2+} ($4 mM$).

Consumo de oxígeno (nmol O_2 /min/ 10^6 PMN)			
PMN(células/mL)	Control	+ PMA	+ Zn^{2+}
2×10^4	55 ± 10	$82 \pm 1^{**}$	0 **
6×10^4	47 ± 2	$225 \pm 10^{**}$	0 **
8×10^4	96 ± 6	$167 \pm 6^{**}$	0 **
20×10^4	32 ± 5	$62 \pm 5^*$	$6 \pm 1^*$
$1,0 \times 10^5$	$7,2 \pm 0,9$	$10 \pm 1^*$	nd
$1,5 \times 10^6$	$5,4 \pm 0,1$	7 ± 1	5 ± 1

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ respecto al control; nd: no determinado

El criterio de selección de la concentración óptima de células se basó en los efectos que causaban la exposición de PMN a PMA y Zn^{2+} con las diversas concentraciones de PMN en estado basal. El ΔO_2 en células PMN expuestas al activador

PMA disminuyó con el aumento de la concentración de las células expuestas a partir de 6×10^4 PMN/mL, sin embargo, con respecto a las células sin activar (control) incrementó más de 4 veces ($p < 0,01$) en la fracción de células cuya concentración era de 6×10^4 PMN/mL y un 74 % ($p < 0,01$) en las muestras cuya concentración de células era 8×10^4 PMN/mL. Respecto a la concentración menor evaluada (2×10^4 PMN/mL) no se observaron diferencias significativas con respecto a la de 6×10^4 PMN/mL en estado basal (control), sin embargo, el efecto activador del PMA fue mucho menor (50%). Concentraciones mayores de células (20×10^4 PMN/mL) mostraron un ΔO_2 basal menor que las muestras menos concentradas en células, pero respecto al estado basal (control) con esta concentración de PMN el ΔO_2 incrementó un 100% ($p < 0,05$) en presencia de PMA. A partir de estos resultados se seleccionó la concentración de 8×10^4 PMN/mL ya que con ella se obtuvieron buenos resultados, un incremento del ΔO_2 en presencia del activador PMA e inhibición total del mismo en presencia del inhibidor Zn^{2+} . Con concentraciones de PMN mayores a 1×10^5 PMN/mL el ΔO_2 basal disminuye mucho, y se pierde sensibilidad en el método de detección, ya que se observó que a mayor concentración de células no se detecta el efecto activador del PMA, ni el inhibitorio del Zn^{2+} , del ΔO_2 (Tabla 4).

Tabla 4. Quimioluminiscencia (cps/ 10^6 células) para distintas concentraciones de PMN en estado basal (control) o expuestas a PMA ($0,2 \mu\text{g/mL}$) y Zn^{2+} (4 mM).

PMN (células/mL)	Quimioluminiscencia (cps/ 10^6 células)		
	Control	+ PMA	+ Zn^{2+}
2×10^4	47 ± 4	$120 \pm 4^{**}$	44 ± 7
6×10^4	50 ± 4	$147 \pm 12^{**}$	57 ± 6
8×10^4	72 ± 13	$158 \pm 15^{**}$	75 ± 5
20×10^4	36 ± 8	$136 \pm 8^{**}$	34 ± 6
$1,5 \times 10^6$	46 ± 1	$150 \pm 15^{**}$	44 ± 2

$^{**}p < 0,01$ respecto al control

Los resultados indicaron que la QL de PMN en estado basal (sin exponer a agonistas) no cambia significativamente con el incremento de la concentración de células (Tabla 4). Cuando 8×10^4 PMN/mL se expusieron a PMA, la QL se incrementó un 100% en todo el rango de concentraciones evaluado y con Zn^{+2} (4 mM) no se

observaron cambios significativos con respecto al control. Lo que indicó un aumento de la oxidación de lípidos y del daño oxidativo como consecuencia de la activación de los PMN y la estimulación de la generación de ROS por la acción del PMA (Tabla 4).

En síntesis, a partir de estos resultados se seleccionó 8×10^4 PMN/mL como concentración óptima de células, tanto para las determinaciones de ΔO_2 como de QL, ya que mostró una mejor respuesta al PMA y Zn^{2+} .

En base a esto, con el reconocimiento de experiencias previas y la evidencia de este ajuste se definió la necesidad de evaluar para cada biomarcador de estrés y daño oxidativo y de inflamación el número óptimo de células que permita garantizar la sensibilidad y reproducibilidad de los métodos a aplicar.

4.1.4. Selección de concentración de células para evaluar daño oxidativo a biomoléculas

Como ya fue señalado, se estableció la concentración de células adecuadas a cada prueba para evaluar el daño oxidativo a biomoléculas. En cada una de estas pruebas, oxidación de proteínas, peroxidación lipídica, actividad de la NOX y consumo de glutatión (GSH), las muestras de PMN se resuspendieron en buffer fosfato (pH 7,40).

El número de células de PMN/mL necesario para la evaluación de los biomarcadores de inflamación, de estrés y daño oxidativo fue ensayado a partir de una concentración teórica de base que se ajustó hasta encontrar el valor óptimo de células con el que se debe contar para procesar eficientemente las muestras en el rango de sensibilidad del ensayo (Tabla 5).

En cuanto a la oxidación de proteínas, medida mediante la determinación de carbonilos, las primeras pruebas se hicieron sobre una concentración de PMN igual a 8×10^4 PMN/mL, que fue la concentración de PMN óptima seleccionada para las determinaciones de ΔO_2 y QL. Sin embargo, la concentración de PMN igual a 8×10^4 células/ mL no fue suficiente para determinar los carbonilos presentes en las muestras, debido a que en los sucesivos lavados de los precipitados obtenidos se perdía muestra. Este primer ensayo fue necesario para comprender que la concentración de células debía ser muy superior, por un lado, para permitir la precipitación de las proteínas, y por otro lado, para evitar que los sedimentos de las proteínas precipitadas se pierdan en los diversos pasos del proceso metodológico, en los sucesivos lavados, que se requieren para el procesamiento de la muestra. Por ello se ensayó la determinación de carbonilos en distintas concentraciones crecientes de PMN hasta encontrar aquella para la cual se

obtuvieron resultados reproducibles, y que permitiera la detección de los carbonilos basales en la muestra. La concentración de trabajo óptima para la cuantificación de carbonilos en las muestras de PMN fue 5×10^6 células/mL (Tabla 5), que luego fueron utilizados para la determinación de carbonilos en células expuestas a los agentes tóxicos, MC-LR o Fe^{2+} (capítulos 2, 3 y 4).

Tabla 5. Concentraciones de células (PMN/mL) en estado basal evaluadas para cada una de las determinaciones de biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo (ΔO_2 : consumo de oxígeno, QL: quimioluminiscencia espontánea, CO: carbonilos (oxidación de proteínas), TBARS: oxidación de lípidos, NOX: actividad de NADPH oxidasa, GSH: contenido de glutatión intracelular)

PMN (células/mL)	ΔO_2 (nmol O_2 /10 ⁶ cél)	QL (cps/10 ⁶ cél)	CO (nmol/10 ⁶ cél)	TBARS (μM)	NOX (URL/seg/mg prot)	GSH (mmol/10 ⁶ cél)
2×10^4	55 ± 10	47 ± 4	nd	Nd	nd	Nd
6×10^4	47 ± 2	50 ± 4	nd	Nd	nd	Nd
8×10^4	96 ± 6	72 ± 13	nd	Nd	nd	Nd
$1,5 \times 10^5$	-	-	nd	Nd	nd	$6,5 \pm 0,5$
2×10^5	32 ± 5	36 ± 8	nd	Nd	nd	
$2,5 \times 10^5$	-	-	nd	Nd	15 ± 6	
$1,5 \times 10^5$	$5,4 \pm 0,1$	46 ± 8	nd	Nd		
5×10^6	-	-	38 ± 6	Nd		

nd: no detectable

Con respecto a la determinación de TBARS, se ensayaron concentraciones crecientes de PMN desde 2×10^4 hasta 5×10^6 células por mL de muestra, pero no se pudieron detectar TBARS, probablemente debido a la baja sensibilidad del método. Por ello se consideró para la evaluación de la oxidación de lípidos en el modelo experimental de PMN expuestos a agonistas contaminantes la QL espontánea, que es una técnica mucho más sensible.

Para la determinación de la actividad de la NOX y del contenido intracelular de GSH se realizaron los ensayos con concentraciones crecientes de PMN a partir de la concentración 8×10^4 PMN/mL, y se seleccionó una concentración de $2,5 \times 10^5$ PMN/mL para la determinación de la actividad de la NOX y $1,5 \times 10^5$ PMN/mL para GSH (Tabla 5).

En la Tabla 6 se resumen las concentraciones óptimas seleccionadas para cada determinación de biomarcadores de inflamación, de estrés y daño oxidativo.

Tabla 6. *Concentración óptima de células (PMN/mL) seleccionadas según la sensibilidad de las determinaciones de biomarcadores de inflamación y daño oxidativo.*

Determinación	Concentración de células (PMN/mL)
Consumo de oxígeno	8×10^4
Quimioluminiscencia	8×10^4
GSH	$1,5 \times 10^5$
NOX	$2,5 \times 10^5$
Carbonilos	5×10^6

La selección de la cantidad de PMN por mL de muestra para la evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo fue muy importante ya que las técnicas y metodologías utilizadas en esta tesis no tienen antecedentes para el modelo experimental propuesto, pues no se han reportado experimentos previamente realizados por otros autores respecto a la determinación de carbonilos, GSH y quimioluminiscencia espontánea en neutrófilos.

4.2. Capítulo 2. Daño oxidativo e inflamación en neutrófilos humanos expuestos a MC-LR

4.2.1. Marcadores de inflamación

Con el objetivo de demostrar el efecto de la exposición de PMN humanos expuestos a concentraciones permitidas de MC-LR se evaluaron los biomarcadores de inflamación tales como el ΔO_2 , un marcador del estallido celular respiratorio, y la actividad de la NOX; y los marcadores de estrés oxidativo, como quimioluminiscencia espontánea, oxidación a biomoléculas y consumo de glutatión, el principal antioxidante endógeno celular.

Para ello se utilizaron PMN humanos aislados y tratados con la dosis permitida de MC-LR en aguas de consumo y recreativas, estimada en 1 μg MC-LR /L, como también, en una dosis subaguda calculada en 25 μg /L.

4.2.1.1. Estallido respiratorio celular. Consumo de oxígeno en PMN

Con el objetivo de evaluar si la exposición de PMN a MC-LR genera cambios en el estallido respiratorio celular, se determinó el ΔO_2 en las células vivas expuestas al agonista y células vivas no expuestas (control). Se utilizó una concentración óptima de 8×10^4 PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada resultó sensible. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de la determinación del ΔO_2 de PMN medidos con un electrodo de oxígeno tipo Clark. Se puede observar que cuando los PMN se exponen a las concentraciones utilizadas de MC-LR se activan los mecanismos asociados al ΔO_2 respecto al estado basal de estas células aisladas (sin tratamiento). Se utilizó PMA (0,2 μg /mL) como control positivo de estimulación del ΔO_2 y Zn^{2+} (4 mM) como control negativo de inhibición de ΔO_2 .

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9, en la que se pueden observar los efectos activadores cuando los PMN se incubaron con MC-LR. El ΔO_2 aumentó significativamente un 40% en PMN expuestos a la concentración de 1 μg MC-LR/L ($p < 0,05$) y un 60% con 25 μg MC-LR/L ($p < 0,05$) con respecto a los PMN sin exponer a MC-LR, este efecto no difiere significativamente entre los distintos tratamientos (Figura 9).

Estos resultados indican que este agonista activa el estallido celular respiratorio a dosis permitida, estimada en 1 $\mu\text{g/L}$, como también, en una dosis subaguda calculada en 25 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 7, Figura 9).

Tabla 7. Consumo de oxígeno para 8×10^4 PMN/mL, expuestos a concentraciones permitidas de MC-LR: 1 $\mu\text{g MC-LR/L}$; y subaguda: 25 $\mu\text{g MC-LR/L}$ y 0,2 $\mu\text{g PMA/mL}$ y Zn^{2+} (4 mM).

MC-LR ($\mu\text{g/L}$)	Consumo de oxígeno (nmol $\text{O}_2/\text{min}/10^6$ PMN)
0	96 ± 6
1	$133 \pm 2^*$
25	$159 \pm 13^*$
PMA	$167 \pm 6^{\dagger\dagger\dagger}$
Zn^{2+}	0

** $p < 0,05$ respecto al control; ††† ; $p < 0,001$ respecto al control y a MC-LR.*

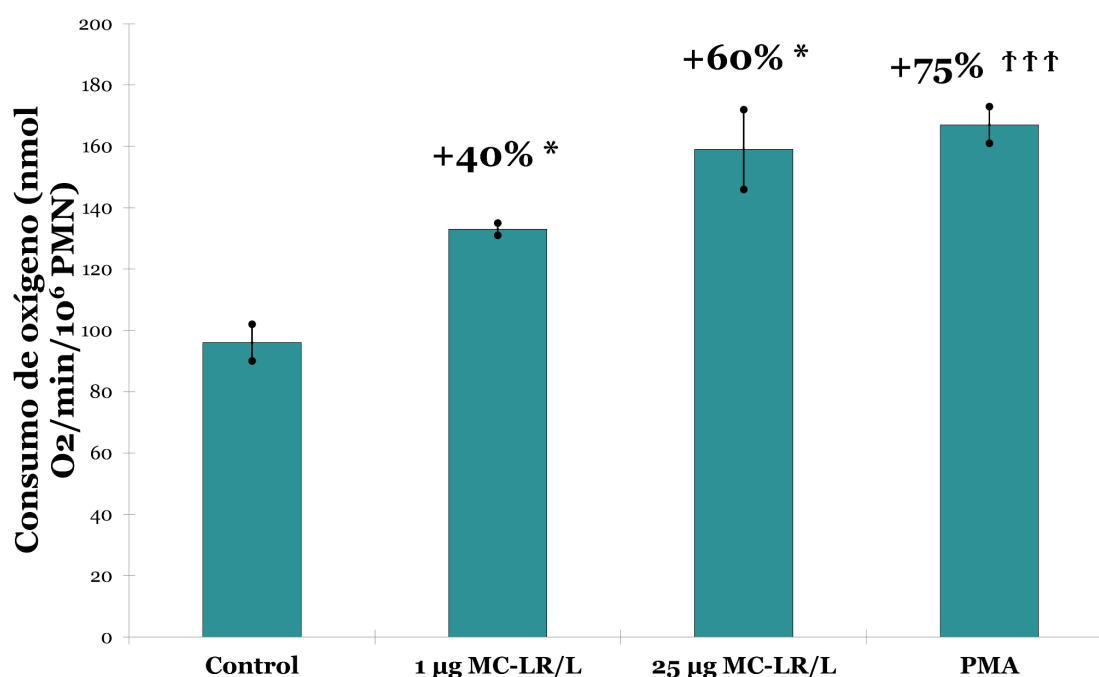


Figura 9. Cambios en el consumo de oxígeno de PMN expuestos a MC-LR: 1 $\mu\text{g/L}$ y 25 $\mu\text{g/L}$ y PMA 0,2 $\mu\text{g/mL}$, comparados con el control. ** $p < 0,05$ respecto al control; ††† ; $p < 0,001$ respecto al control y a MC-LR 1 $\mu\text{g/L}$*

En la Figura 9 se puede observar el cambio en el ΔO_2 medido en PMN expuestos tanto a la concentración máxima permitida de MC-LR en aguas de consumo y recreacionales como con la exposición a una concentración subaguda de MC-LR, expresado en porcentaje de aumento con respecto al control (PMN sin exponer a MC-LR, 0 μg MC-LR/L).

Estos resultados indican que la exposición de PMN a MC-LR aumenta el estallido respiratorio con producción de ROS, tanto con la concentración máxima permitida de MC-LR en aguas de consumo y recreacionales como con la exposición a concentración subaguda de MC-LR.

4.2.1.2. PMN expuestos a MC-LR ($\mu\text{g/L}$) y cianuro

Con el propósito de conocer si el ΔO_2 determinado en los PMN expuestos a MC-LR en las concentraciones permitida y subaguda, está asociado a la actividad de la NOX (ΔO_2 extramitocondrial) o a la cadena respiratoria mitocondrial, se midió el mismo en presencia de cianuro (CN^-), un inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la cinética del ΔO_2 de PMN (8×10^4 células/mL) antes (T1) y después (T2) del agregado de CN^- (10 mM). Se puede observar que en presencia de CN^- el ΔO_2 de PMN expuestos a concentraciones permitida y subaguda de MC-LR se inhibe completamente.

Tabla 8. Consumo de oxígeno ($\text{nmol } O_2/\text{min}/10^6$ PMN) (8×10^4 células/mL) en PMN expuestos a MC-LR ($\mu\text{g/L}$) al inicio de la medición: tiempo 1 (T1) y posterior al agregado de cianuro a los 5 minutos de iniciado el proceso de medición: tiempo 2 (T2)

Consumo de oxígeno ($\text{nmol } O_2/\text{min}/10^6$ PMN)		
MC-LR ($\mu\text{g/L}$)	T1	T2
0	101 ± 8	$20 \pm 1^{**}$
1	138 ± 4	0^{**}
25	162 ± 5	0^{**}

$^{**}p < 0,01$

Estos resultados indican que el agregado de cianuro a la suspensión de PMN expuestos a la concentración máxima permitida y subaguda de MC-LR inhibe completamente el estallido respiratorio, lo cual demuestra que el efecto activador del ΔO_2 por MC-LR estaría asociado a procesos oxidativos que ocurren a nivel mitocondrial con ambas concentraciones de MC-LR.

4.2.1.3. Actividad de NADPH oxidasa (NOX)

Con el objetivo de determinar si la exposición a MC-LR activa o inhibe la actividad de la NOX de PMN se evaluó el consumo de NADPH por luminiscencia de células expuestas al agonista y de células sin exponer (control). Se utilizó una concentración de $2,5 \times 10^6$ PMN/mL, la cual mostró una luminiscencia detectable expresada en unidades relativas de luminiscencia (URL por unidad de tiempo (segundos) y por miligramo de proteínas).

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la actividad de la NOX (ULR/seg x mg prot) en PMN ($2,5 \times 10^5$ células/mL) expuestos a MC-LR ($\mu\text{g/L}$). Se puede observar que la exposición de PMN a MC-LR, en la concentración de células a la que este método resultó sensible, inhibió en un 100% la actividad de la enzima, ya que no se detectó luminiscencia en las células expuestas a ambas concentraciones de MC-LR (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de la determinación NOX (ULR seg /mg prot) en PMN ($2,5 \times 10^5$ células/mL) expuestos a MC-LR ($\mu\text{g/L}$)

MC-LR ($\mu\text{g/L}$)	NOX de PMN (ULR seg/mg prot)
0	15051 ± 11875
1	Nd
25	Nd

nd: no detectable

Estos resultados indican que en PMN expuestos a MC-LR se inhibe completamente el estallido respiratorio extramitocondrial del PMN y que el efecto inhibitorio que genera la MC-LR sería a nivel de la membrana celular, con ambas concentraciones, tanto a la concentración máxima permitida en aguas de consumo y recreacionales como con la exposición a una concentración subaguda de MC-LR.

4.2.2. Marcadores de estrés y daño oxidativo

4.2.2.1. Quimioluminiscencia espontánea

Con el objetivo de evaluar si la exposición de los PMN a MC-LR genera incremento de la peroxidación de lípidos y estrés oxidativo, se determinó la emisión de luz por quimioluminiscencia espontánea de las células expuestas al agonista con respecto a las células control. Se utilizó una concentración óptima de 8×10^4 PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada es sensible. En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de la determinación del marcador de peroxidación lipídica, la quimioluminiscencia espontánea de las células vivas.

Se puede observar que luego de la exposición de las células a concentraciones permitida y subaguda de MC-LR/L, se incrementó la quimioluminiscencia espontánea (QL) con respecto a los PMN sin exponer al agonista (control). Los resultados de los experimentos realizados demuestran que, comparado con el control, la quimioluminiscencia espontánea, aumentó significativamente con $1 \mu\text{g}$ MC-LR/L respecto al control (300%, $p < 0,001$) y 200% respecto a PMA ($p < 0,001$). Con la concentración mayor de MC-LR el incremento de la quimioluminiscencia espontánea es del 50% con respecto al control (Tabla 10 y Figura 10).

Cuando se expusieron los PMN a PMA ($0,2 \mu\text{g/mL}$), un reconocido inductor del daño oxidativo, se observó un incremento del 100% en la quimioluminiscencia espontánea ($p < 0,001$) con respecto al control, el mismo efecto que se observó con $30 \text{ mg Fe}^{2+}/\text{L}$ (Tabla 10 y Figura 10).

Tabla 10. Quimioluminiscencia de PMN (8×10^4 PMN/mL), expuestos a concentraciones permitida de MC-LR: $1 \mu\text{g}$ MC-LR/L; y subaguda: $25 \mu\text{g}$ MC-LR/L; y el activador PMA ($0,2 \mu\text{g}$ PMA/mL)

MC-LR ($\mu\text{g/L}$)	Quimioluminiscencia (cps/ 10^6 PMN)
0	72 ± 13
1	$287 \pm 24^{\text{†††}}$
25	$108 \pm 18^{***}$
PMA ($0,2 \mu\text{g/mL}$)	$158 \pm 15^{***}$

*** $p < 0,001$ respecto al control; $^{\text{†††}}$ $p < 0,001$ respecto al control y a PMA

En la Figura 10 se puede observar el cambio en la QL medido en PMN expuestos a MC-LR, tanto a la concentración máxima permitida en aguas de consumo y recreacionales como con la exposición a la concentración subaguda de MC-LR, expresado en porcentaje respecto al control (PMN sin exponer a MC-LR, 0 μg MC-LR/L).

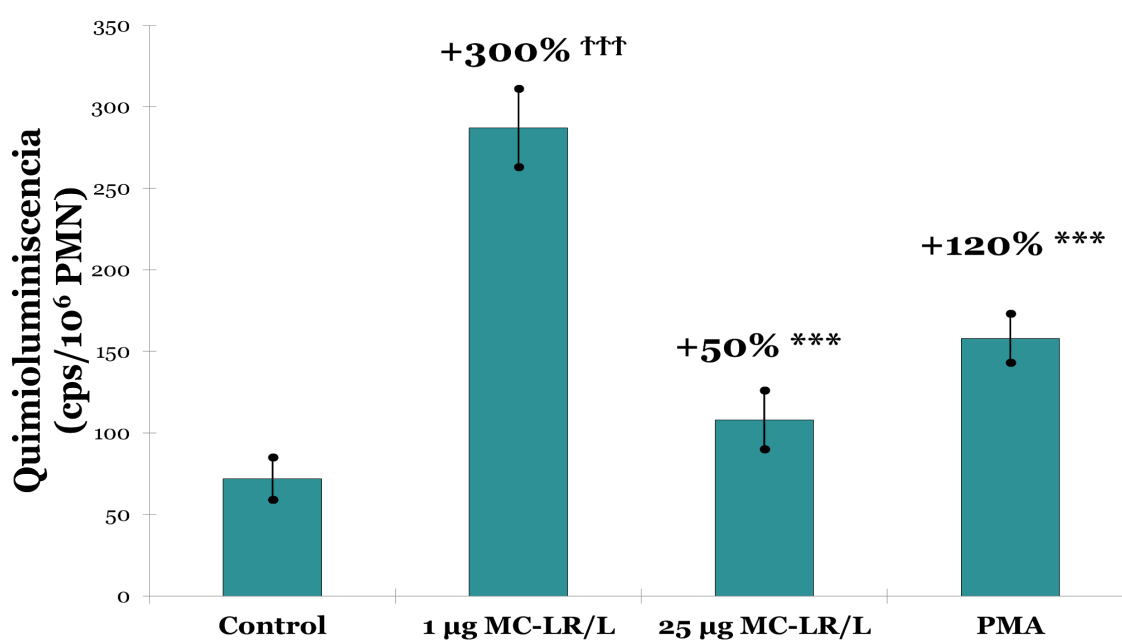


Figura 10. Cambios en la quimioluminiscencia espontánea de PMN expuestos a MC-LR: 1 $\mu\text{g/L}$ y 25 $\mu\text{g/L}$; PMA (0,2 $\mu\text{g/mL}$) respecto al control. *** $p < 0,001$ respecto al control; ††† $p < 0,001$ respecto al control y a PMA

Estos resultados indican que la exposición a MC-LR incrementa la oxidación de lípidos y del daño oxidativo de PMN, tanto a la concentración máxima permitida en aguas de consumo y recreacionales como con la exposición a concentración subaguda de MC-LR.

4.2.2.2. Oxidación de proteínas: contenido de carbonilos

Con el objetivo de evaluar si la exposición a MC-LR genera oxidación de proteínas en PMN, se determinó el contenido de grupos carbonilos de proteínas presentes en las células. Se utilizó una concentración óptima de 5×10^6 PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada resultó sensible.

Se puede observar que la exposición de las células a la concentración máxima permitida de MC-LR en agua de bebida y recreacionales incrementa significativamente

la oxidación de proteínas un 60% ($p < 0,05$) y con la exposición subaguda un 118% ($p < 0,01$), en ambos casos con respecto a los PMN control (Tabla 11, Figura 11).

La Figura 11 muestra el cambio en la oxidación de proteínas medido como contenido de carbonilos en PMN expuestos a MC-LR, tanto a la concentración máxima permitida en aguas de consumo y recreacionales como con la exposición a la concentración subaguda de MC-LR, expresado en porcentaje respecto al control (PMN sin exponer a MC-LR, 0 μg MC-LR/L).

Tabla 11. Oxidación de proteínas medida como carbonilos carbonilos (CO) en PMN (5×10^6 células/mL) expuestos a MC-LR ($\mu\text{g/L}$)

Carbonilos de PMN (nmol proteínas CO/ 10^6 células)	
MC-LR ($\mu\text{g/L}$)	
0	38 ± 6
1	$61 \pm 9^*$
25	$83 \pm 15^{**}$
PMA	$141 \pm 2^{***}$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

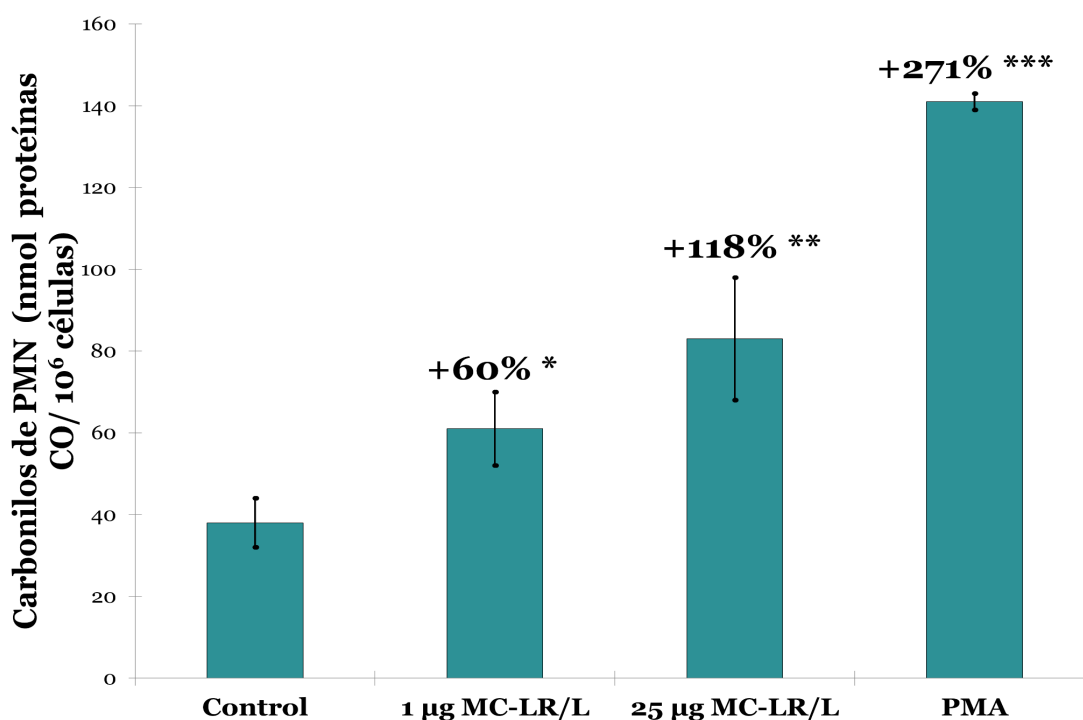


Figura 11. Cambios en el contenido de carbonilos en PMN expuestos a MC-LR: 1 $\mu\text{g/L}$ y 25 $\mu\text{g/L}$; PMA (0,2 $\mu\text{g/mL}$) respecto al control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Estos resultados indican que el daño oxidativo a biomoléculas de membrana que se observa por quimioluminiscencia espontánea de PMN expuestos a MC-LR estaría asociado a la oxidación de proteínas.

4.2.2.3. Oxidación de lípidos: TBARS

Con el objetivo de investigar si el incremento de la quimioluminiscencia espontánea observada en PMN expuestos a concentraciones máxima permitida y subaguda de MC-LR está asociado al incremento de peroxidación de lípidos, se evaluó el contenido de TBARS en las células. Sin embargo, en todo el rango de las concentraciones de PMN utilizadas para la selección de la concentración óptima de trabajo para todos los biomarcadores evaluados, con la metodología empleada para la determinación de TBARS no se pudieron detectar los productos de oxidación de lípidos en este modelo experimental. Los resultados obtenidos en la determinación de quimioluminiscencia espontánea (ver sección 4.2.2.1.) indican que en PMN expuestos a MC-LR se genera emisión de luz por desexcitación del $^1\text{O}_2$, pero que en este modelo experimental no estaría asociado a la oxidación de lípidos.

4.2.2.4. Contenido de Glutación intracelular

Con el objetivo de evaluar si la exposición de PMN a MC-LR genera consumo o depleción de antioxidantes, se determinó el contenido de GSH en las células. Se utilizó una concentración óptima de $1,5 \times 10^6$ PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada resultó sensible. Todos los tratamientos con MC-LR, en todas las concentraciones evaluadas, disminuyen significativamente ($p < 0,001$) el contenido intracelular de GSH, la concentración máxima permitida lo disminuye un 90% ($p < 0,001$) y la concentración subaguda un 80%, en ambos casos con respecto al control (PMN sin exposición al agonista, sin tratamiento) (Tabla 12 y Figura 12).

Tabla 12. Contenido intracelular de glutación (GSH) en PMN expuestos a MC-LR ($\mu\text{g/L}$)

MC-LR ($\mu\text{g/L}$)	GSH (nmol/ 10^6 PMN)
0	$5,77 \pm 0,44$
1	$0,58 \pm 0,15^{***}$
25	$1,07 \pm 0,05^{***}$

*** $p < 0,001$

En la Figura 12 se puede observar la disminución del contenido intracelular de GSH en PMN expuestos a MC-LR, tanto a la concentración máxima permitida en aguas de consumo y recreacionales como a la exposición a la concentración subaguda de MC-LR, expresado en porcentaje de disminución respecto al control (PMN sin exponer a MC-LR, 0 µg MC-LR/L).

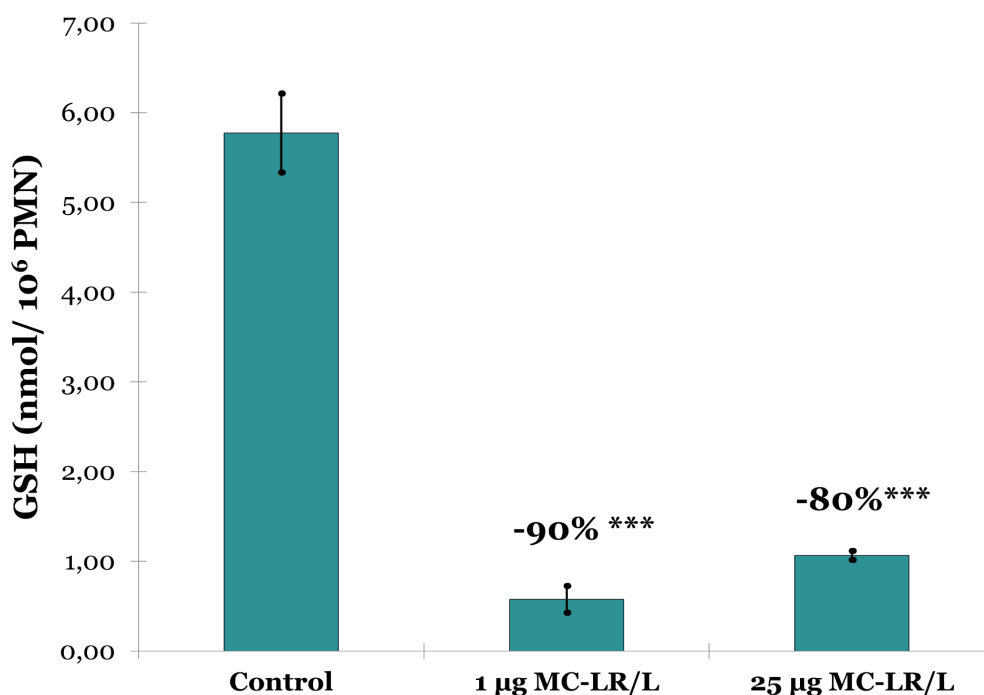


Figura 12. Cambios en el contenido intracelular de GSH en PMN expuestos a MC-LR: 1 µg/L y 25 µg/L respecto al control. *** $p < 0,001$ respecto al control

Estos resultados indican que la exposición de PMN a dosis permitida y subaguda de MC-LR disminuye significativamente el contenido de GSH intracelular, con la consecuente disminución de la protección antioxidante y la predisposición de las células a estrés y daño oxidativo.

4.2.3. Índices de estimulación del estallido respiratorio y de daño oxidativo

De acuerdo a los resultados obtenidos, la MC-LR activa el estallido celular respiratorio medido como ΔO_2 e incrementa la producción de ROS. En consecuencia, el estrés oxidativo medido por quimioluminiscencia incrementa, tanto con la dosis máxima permitida, 1 µg/L, como con la dosis subaguda de 25 µg/L (ver Tabla 10).

A partir de los biomarcadores evaluados se puede calcular el índice de inhibición o de estimulación de los procesos inflamatorios y oxidativos asociados al

efecto de MC-LR en PMN aislados (Tabla 13) con respecto al parámetro evaluado en PMN en ausencia de MC-LR (control). Un valor mayor a 1 indica un efecto estimulante o activador y un valor menor a 1 representa un efecto inhibitorio del proceso involucrado.

Tabla 13. Índice de estimulación o inhibición del estallido respiratorio y procesos de daño oxidativo de PMN expuestos a MC-LR (1 y 25 µg/L) o PMA (0,2 µg/mL)

MC-LR (µg/L)	Consumo de oxígeno	Quimioluminiscencia	Carbonilos	Glutación
0	1,0	1,0	1,0	1,0
1	1,5	4,0	1,6	0,1
25	1,7	1,5	2,2	0,2
PMA	1,7	1,5	nd	nd

nd: no determinado

Estos resultados indican que MC-LR actuaría como estímulo del estallido respiratorio celular en PMN expuestos, y activa la generación de ROS con ambas concentraciones de MC-LR evaluadas. Con la concentración permitida de MC-LR en agua de bebida y recreacionales, tendría un efecto estimulante del estrés oxidativo, con la generación de ROS, principalmente el $^1\text{O}_2$, de la oxidación de proteínas y consumo de GSH. Sin embargo, con la exposición a una concentración subaguda de MC-LR el efecto sobre los PMN estaría asociado a procesos inflamatorios con activación del estallido respiratorio celular, similar al que genera la exposición de los PMN a PMA, asociado a la oxidación de proteínas, mayor que con la dosis máxima permitida de MC-LR y consumo de GSH intracelular. Ambas concentraciones de MC-LR generan un efecto inhibitorio de la protección antioxidante ya que se consume el GSH intracelular.

Cuando se estimó el índice de inflamación mediante la combinación de los dos indicadores de estallido respiratorio en PMN (ΔO_2 y NOX), se observó que la contribución de la NOX a este índice es cero en PMN expuestos a MC-LR, por lo tanto, este índice es el mismo que el obtenido teniendo en cuenta solamente el ΔO_2 detectado por polarografía, que estaría asociado a la reducción del oxígeno en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

El índice de daño oxidativo calculado teniendo en cuenta los biomarcadores de oxidación de biomoléculas y de protección antioxidante en PMN mostró que la MC-LR incrementa el consumo de GSH intracelular con el aumento de la concentración a la que se exponen los PMN, tanto a la concentración máxima permitida de MC-LR en agua de bebida y recreativas como en la concentración subaguda evaluada. Un valor mayor a 1 indica un efecto estimulante o activador y un valor menor a 1 representa un efecto inhibitorio del proceso involucrado (Tabla 14).

Tabla 14. *Índice de estimulación de inflamación y daño oxidativo en PMN expuestos a MC-LR (1 y 25 µg/L)*

MC-LR (µg/L)	Índice de inflamación	Índice de daño oxidativo
0	1,0	1,0
1	1,4	1,9
25	1,7	1,3

Los resultados de la Tabla 14 muestran que la MC-LR tanto en la concentración máxima permitida en agua de bebida (o de consumo) y recreacionales como en la concentración subaguda estimula procesos inflamatorios y daño oxidativo en los PMN expuestos, sin embargo, la respuesta inflamatoria es mayor con la concentración permitida (1 µg MC-LR/L) y el daño oxidativo es mayor con la exposición a la concentración subaguda (25 µg MC-LR/L).

4.3. Capítulo 3. Daño oxidativo e inflamación en neutrófilos humanos expuestos a hierro

4.3.1. Marcadores de inflamación

Con el objetivo de demostrar el efecto de la exposición de PMN humanos a concentraciones permitidas de hierro se evaluaron los biomarcadores de inflamación tales como el ΔO_2 , una medida del estallido celular respiratorio y la actividad de la NOX; y marcadores de estrés oxidativo, como quimioluminiscencia espontánea, oxidación a biomoléculas y consumo de glutatión, el principal antioxidante endógeno celular.

Para ello se utilizaron PMN humanos aislados y tratados con dos concentraciones máximas permitidas de Fe^{2+} en aguas de consumo y recreativas, como también una concentración tóxica.

4.3.1.1. Estallido celular respiratorio. Consumo de oxígeno en PMN

Con el objetivo de evaluar si la exposición de PMN a Fe^{2+} genera cambios en el estallido respiratorio celular, se determinó el ΔO_2 en las células vivas expuestas al agonista y células vivas no expuestas (control). Se utilizó una concentración óptima de 8×10^4 PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada resultó sensible. En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos de la determinación del ΔO_2 de PMN medidos con un electrodo de oxígeno tipo Clark. Se puede observar que cuando los PMN, a concentraciones 8×10^4 PMN/mL, se exponen a concentraciones crecientes de Fe^{2+} el ΔO_2 disminuye respecto al estado basal de estas células aisladas (sin tratamiento). Se utilizó PMA ($0,2 \mu\text{g/mL}$) como control positivo de estimulación del ΔO_2 y Zn^{2+} (4 mM) como control negativo de inhibición de ΔO_2 .

Los resultados obtenidos muestran que el ΔO_2 disminuyó en forma significativa un 40% en PMN expuestos a las concentraciones de $6 \mu\text{g } Fe^{2+}/L$ ($p<0,01$) y $30 \mu\text{g } Fe^{2+}/L$ ($p<0,01$) y 58 % con $300 \mu\text{g } Fe^{2+}/L$ ($p<0,001$) con respecto a los PMN sin exponer a Fe^{2+} (control) y que este efecto no difiere significativamente entre los distintos tratamientos. Estos resultados indican que este agonista inhibe parcialmente el estallido celular respiratorio con dosis permitidas y tóxicas (Tabla 15, Figura 13).

Tabla 15. Consumo de oxígeno para 8×10^4 PMN/mL, expuestos a concentraciones permitidas de Fe^{2+} : $6 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$; $30 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$, y tóxica: $300 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$ y $0,2 \mu\text{g PMA}/\text{mL}$ y Zn^{2+} (4 mM).

Fe^{2+} ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Consumo de oxígeno ($\text{nmol O}_2/\text{min}/10^6 \text{ PMN}$)
0	96 ± 6
6	$57 \pm 7^{**}$
30	$58 \pm 7^{**}$
300	$40 \pm 11^{***}$
PMA	$167 \pm 6^{\dagger\dagger\dagger}$
Zn^{2+}	0

$^{**}p < 0,01$ y $^{***}p < 0,001$: respecto al control; $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0,001$ respecto al control y a Fe^{2+}

En la Figura 13 se puede observar el cambio en el ΔO_2 medido en PMN expuestos a concentraciones permitidas de Fe^{2+} en agua de bebida y recreacionales y concentración tóxica, expresado en porcentaje de disminución respecto al control (PMN sin exponer a Fe^{2+} , $0 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$).

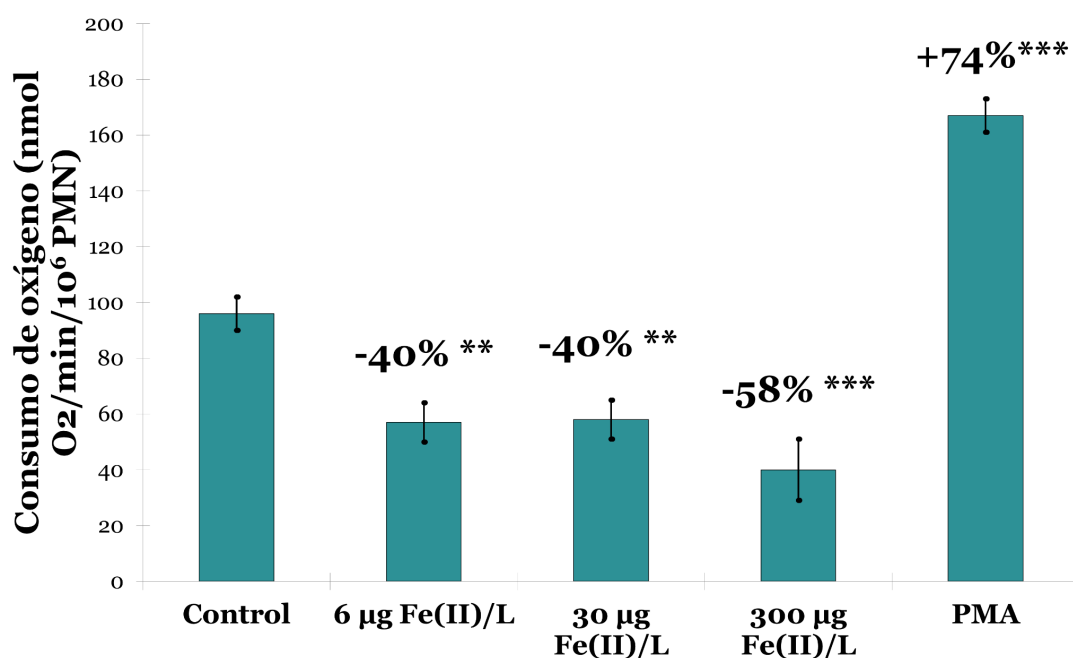


Figura 13. Cambios en el consumo de oxígeno de PMN expuestos al Fe^{2+} ($\mu\text{g}/\text{L}$): $6 \mu\text{g}/\text{L}$, $30 \mu\text{g}/\text{L}$ y $300 \mu\text{g}/\text{L}$, y PMA $0,2 \mu\text{g}/\text{mL}$, comparados con el control. $^{**}p < 0,01$ y $^{***}p < 0,001$: respecto al control

Estos resultados indican que la exposición a Fe^{2+} disminuye el estallido respiratorio con las concentraciones permitidas de Fe^{2+} en aguas de consumo y recreacionales y con la concentración tóxica evaluada.

4.3.1.2. PMN expuestos a Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$) y cianuro

Con el propósito de conocer si el ΔO_2 determinado en los PMN expuestos al Fe^{2+} en las concentraciones permitidas y tóxica, está asociado a la actividad de la NOX (ΔO_2 extramitocondrial) o a la cadena respiratoria mitocondrial, se midió el mismo en presencia de cianuro (CN^-), un inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la cinética del ΔO_2 de PMN (8×10^4 células/mL) antes (T1) y después (T2) del agregado de CN^- (10 mM). Se puede observar que en presencia de CN^- el ΔO_2 de PMN expuestos a concentraciones crecientes de Fe^{2+} se inhibe completamente.

Tabla 16. Consumo de oxígeno ($\text{nmol O}_2/\text{min}/10^6$ PMN) (8×10^4 células/mL) en PMN expuestos al Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$) al inicio de la medición: tiempo 1 (T1) y posterior al agregado de cianuro a los 5 minutos de iniciado el proceso de medición: tiempo 2 (T2)

Consumo de oxígeno ($\text{nmol O}_2/\text{min}/10^6$ PMN)		
Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	T1	T2
0	101 ± 8	$8 \pm 1^{**}$
6	64 ± 4	0^{**}
30	47 ± 3	0^{**}

$^{**}p < 0,001$

Estos resultados indican que el agregado de cianuro a la suspensión de PMN expuestos a Fe^{2+} inhibe completamente el estallido respiratorio intramitocondrial y que el efecto inhibitorio del Fe^{2+} sería a nivel extramitocondrial con ambas concentraciones permitidas de Fe^{2+} en aguas de consumo y recreacionales.

4.3.1.3. Actividad de NADPH oxidasa (NOX)

Con el objetivo de determinar si la exposición a Fe^{2+} activa o inhibe la actividad de la enzima NOX de PMN se evaluó el consumo de NADPH por luminiscencia de células expuestas al agonista y de células sin exponer (control). Se utilizó una concentración de $2,5 \times 10^6$ PMN/mL, la cual mostró una luminiscencia detectable expresada en unidades relativas de luminiscencia (URL por unidad de tiempo (segundos) y por miligramo de proteínas).

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la actividad de NOX (ULR/seg x mg prot) en PMN ($2,5 \times 10^5$ células/mL) expuestos a Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$). Se puede observar que en la concentración de células a la que este método resultó sensible, la exposición a Fe^{2+} , en todas las concentraciones evaluadas, inhibió en un 100% la actividad de la enzima, ya que no se detectó luminiscencia en las células expuestas al agonista (Tabla 17).

Tabla 17. Resultados de la determinación NOX (ULR seg /mg prot) en PMN ($2,5 \times 10^5$ células/mL) expuestos a Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)

Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	NOX de PMN (ULR seg/mg prot)
0	15051 ± 11875
6	Nd
30	Nd
300	Nd

nd: no detectable

Estos resultados indican que en PMN expuestos a Fe^{2+} se inhibe completamente el estallido respiratorio extramitocondrial y que el efecto inhibitorio que genera el Fe^{2+} sería a nivel de la membrana celular, con ambas concentraciones permitidas de Fe^{2+} en aguas de consumo y recreacionales como también tóxicas.

4.3.2. Marcadores de estrés oxidativo

4.3.2.1. Quimioluminiscencia espontánea

Con el objetivo de evaluar si la exposición de PMN a Fe^{2+} genera incremento de la peroxidación de lípidos y estrés oxidativo, se determinó la emisión de luz por quimioluminiscencia espontánea de las células expuestas al agonista con respecto a las

células control. Se utilizó una concentración óptima de 8×10^4 PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada es sensible. En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos de la determinación del marcador de peroxidación lipídica, la quimioluminiscencia espontánea de las células vivas.

Se puede observar que luego a la exposición de las células a diferentes concentraciones de Fe^{2+}/L , se incrementó la quimioluminiscencia espontánea (QL) con respecto a PMN sin exponer al agonista. Los resultados de los experimentos realizados demuestran que, comparado con el control, la quimioluminiscencia espontánea aumentó significativamente cuando a los PMN se los expone a $30 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$ (100%, $p < 0,01$) y 80% al exponerlos a una concentración de $300 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$ ($p < 0,05$) (Tabla 18 y Figura 14).

Cuando se expusieron los PMN a PMA ($0,2 \mu\text{g/mL}$), un reconocido inductor del daño oxidativo, se observó un incremento del 100% en la quimioluminiscencia espontánea ($p < 0,001$) con respecto al control, el mismo efecto que se observó con $30 \text{ mg Fe}^{2+}/\text{L}$ (Tabla 18 y Figura 14).

Tabla 18. *Quimioluminiscencia de PMN (8×10^4 PMN/mL), expuestos a concentraciones permitidas de Fe^{2+} : $6 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$; $30 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$; y tóxica: $300 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$; y el activador PMA ($0,2 \mu\text{g PMA/mL}$)*

Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	Quimioluminiscencia (cps/10^6 PMN)
0	72 ± 13
6	72 ± 9
30	$150 \pm 11^{**}$
300	$124 \pm 16^*$
PMA	$158 \pm 15^{***}$
<i>*$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$</i>	

En la Figura 14 se puede observar el cambio en la QL medido en PMN expuestos a concentraciones permitidas de Fe^{2+} en agua de bebida y recreacionales y a una concentración tóxica, expresado en porcentaje de aumento respecto al control (PMN sin exponer a Fe^{2+} , $0 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$).

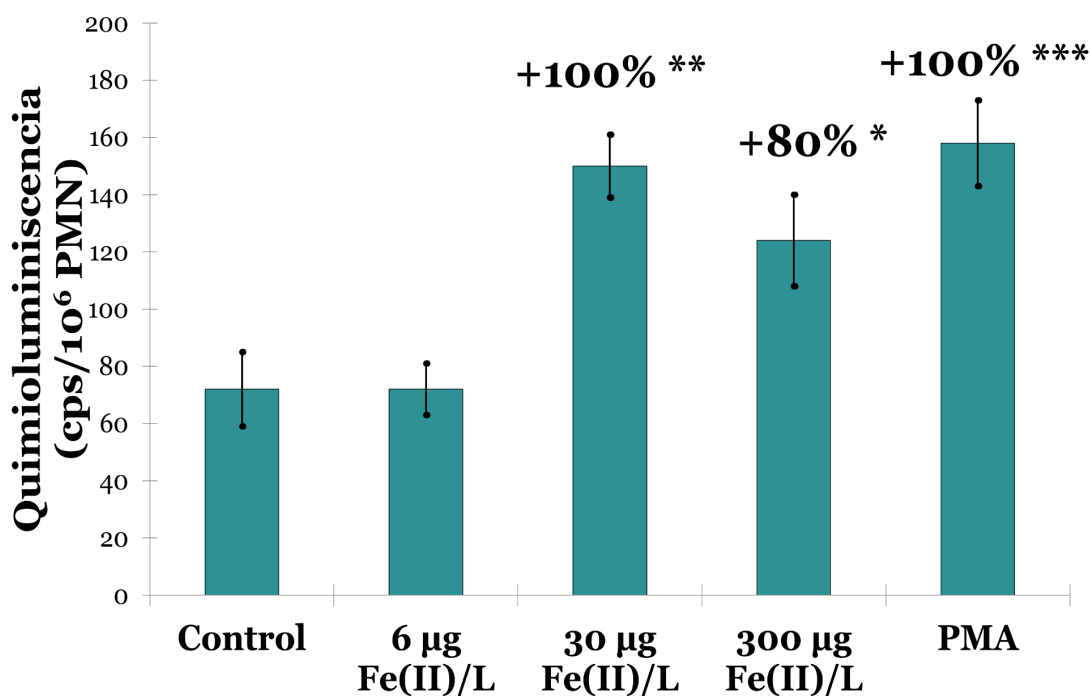


Figura 14. Cambios en la quimioluminiscencia espontánea de PMN expuestos a Fe^{2+} : 6 µg/L, 30 µg/L y 300 µg/L, y PMA 0,2 µg/mL, comparados con el control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Estos resultados indican que la exposición a Fe^{2+} incrementa la oxidación de biomoléculas y el estrés oxidativo de PMN con la máxima concentración permitida de Fe^{2+} tanto en aguas de consumo y recreacionales como con la concentración tóxica evaluada.

4.3.2.2. Oxidación de proteínas: contenido de carbonilos

Con el objetivo de evaluar si la exposición a Fe^{2+} genera oxidación de proteínas en PMN, se determinó el contenido de grupos carbonilos de proteínas presentes en las células. Se utilizó una concentración óptima de 5×10^6 PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada resultó sensible. Se puede observar que la exposición de las células a diferentes concentraciones de Fe^{2+} /L no genera cambios significativos en la oxidación de proteínas con respecto a los PMN control (Tabla 19 y Figura 15).

Tabla 19. Oxidación de proteínas medida como carbonilos (CO) en PMN (5×10^6 células/mL) expuestos a Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)

Carbonilos de PMN (nmol proteínas CO/ 10^6 células)	
Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	
0	38 ± 6
6	41 ± 6
30	28 ± 4
300	45 ± 10
PMA	$141 \pm 2^{***}$

*** $p < 0,001$

Estos resultados indicarían que el daño oxidativo a biomoléculas de membrana que se observa por quimioluminiscencia espontánea de PMN expuestos a Fe^{2+} no estaría asociado a la oxidación de proteínas.

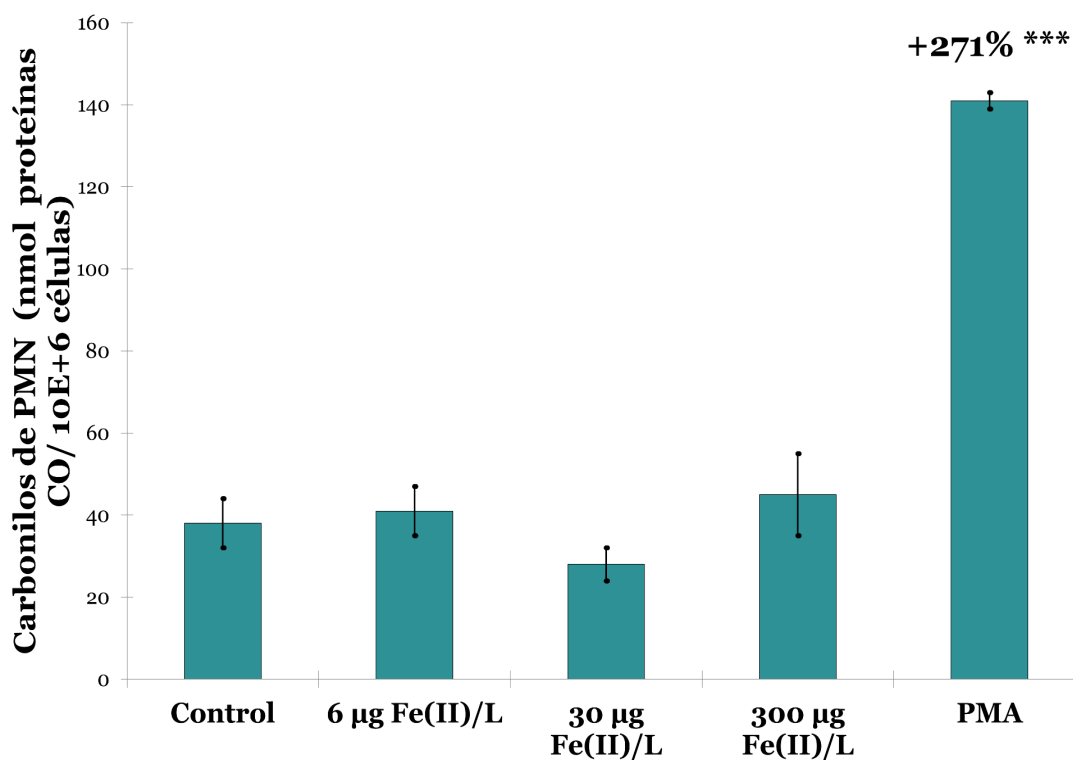


Figura 15. Contenido de carbonilos en PMN expuestos a Fe^{2+} : 6 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$ y 300 $\mu\text{g/L}$, y PMA 0,2 $\mu\text{g/mL}$, comparados con el control. *** $p < 0,001$

4.3.2.3. Oxidación de lípidos: TBARS

Con el objetivo de investigar si el incremento de la quimioluminiscencia espontánea observada en PMN expuestos a concentraciones máximas permitidas y tóxicas de Fe^{2+} está asociado al incremento de peroxidación de lípidos, se evaluó el contenido de TBARS en las células. Sin embargo, en todo el rango de las concentraciones de PMN utilizadas para la selección de la concentración óptima de trabajo para todos los biomarcadores evaluados, con la metodología empleada para la determinación de TBARS no se pudieron detectar los productos de oxidación de lípidos en este modelo experimental. Los resultados obtenidos en la determinación de quimioluminiscencia espontánea (ver sección 4.3.2.1.) indican que en PMN expuestos a Fe^{2+} se genera emisión de luz por la desexcitación del $^1\text{O}_2$, pero que en este modelo experimental no estaría asociado a la oxidación de biomoléculas.

4.3.2.4. Contenido de Glutación intracelular

Con el objetivo de evaluar si la exposición de PMN a Fe^{2+} genera consumo o depleción de antioxidantes, se determinó el contenido de GSH en las células. Se utilizó una concentración óptima de $1,5 \times 10^6$ PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada resultó sensible. Todos los tratamientos con Fe^{2+} , en todas las concentraciones evaluadas, disminuyen significativamente el contenido intracelular de GSH, un 80% con las concentraciones permitidas ($p < 0,001$) y un 90% con la concentración tóxica respecto al control (PMN sin exponer a Fe^{2+}) (Tabla 20 y Figura 16).

Tabla 20. Contenido intracelular de glutación (GSH) en PMN expuestos a Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)

Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	GSH (nmol/ 10^6 PMN)
0	$5,77 \pm 0,44$
6	$1,10 \pm 0,70^{***}$
30	$1,16 \pm 0,02^{***}$
300	$0,54 \pm 0,26^{***}$

*** $p < 0,001$

En la Figura 16 se puede observar la disminución del contenido intracelular de GSH en PMN expuestos a concentraciones permitidas de Fe^{2+} tanto en agua de bebida y recreacionales como la concentración tóxica, expresada en porcentaje de disminución respecto al control (PMN sin exponer a Fe^{2+} , $0 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$).

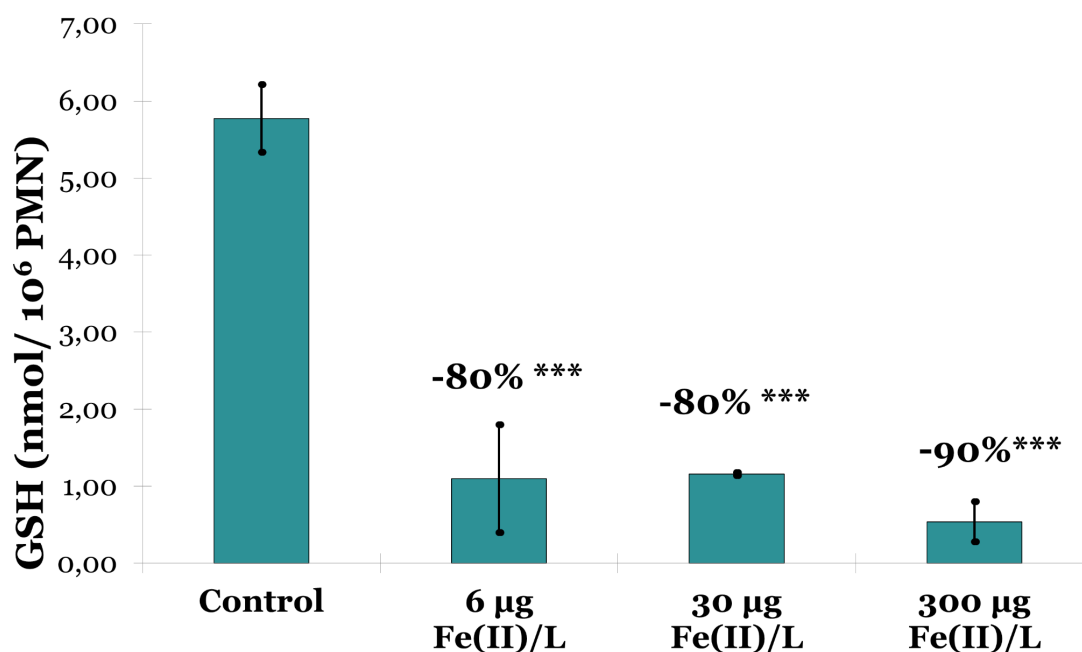


Figura 16. Cambios en el contenido intracelular de GSH en PMN expuestos a Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$) con respecto a control. *** $p < 0,001$

Estos resultados indican que la exposición de PMN a dosis permitidas de Fe^{2+} en agua disminuye significativamente el contenido de GSH intracelular, disminuyendo la protección antioxidante y predisponiendo las células a estrés y daño oxidativo, siendo mucho mayor este efecto con la concentración tóxica de Fe^{2+} .

4.3.3. Índices de estimulación del estallido respiratorio y del daño oxidativo

De acuerdo a los resultados obtenidos, el Fe^{2+} inhibe el estallido celular respiratorio dependiente de NOX, medido como ΔO_2 y como actividad del complejo enzimático por luminiscencia, e incrementa la producción de ROS y en consecuencia el estrés oxidativo medido por quimioluminiscencia, tanto con las dosis máximas permitidas, 6 y 30 $\mu\text{g/L}$, como con la dosis tóxica de 300 $\mu\text{g/L}$.

A partir de estos biomarcadores se puede calcular el índice de inhibición o de estimulación de los procesos inflamatorios u oxidativos asociados al efecto del Fe^{2+} en

PMN aislados (Tabla 21) con respecto a al parámetro evaluado en PMN en ausencia del Fe^{2+} . Un valor mayor a 1 indica un efecto estimulante o activador y un valor menor a 1 representa un efecto inhibitorio del proceso involucrado.

Tabla 21. Índice de estimulación o inhibición del estallido respiratorio y procesos oxidativos de PMN expuestos a Fe^{2+} (6, 30, 300 $\mu\text{g/L}$) o PMA (0,2 $\mu\text{g/mL}$)

Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	Consumo de oxígeno	Quimioluminiscencia	Carbonilos	GSH
0	1,0	1,0	1,0	1,0
6	0,6	1,0	1,1	0,2
30	0,6	2,1	0,7	0,2
300	0,4	1,7	1,2	0,1
PMA	1,7	2,2	nd	nd

nd: no determinado

Los índices calculados que se muestran en la Tabla 21 indican que Fe^{2+} actuaría como estímulo del estrés oxidativo en los PMN expuestos e inhibitorio del estallido respiratorio celular. Con la exposición a la menor concentración de Fe^{2+} el efecto sobre los PMN estaría asociado a procesos oxidativos que involucran la homeostasis redox celular asociados al GSH, sin activación del estallido respiratorio celular ni oxidación de biomoléculas. Sin embargo, el Fe^{2+} , en las concentraciones máxima permitida y tóxica, tendría un efecto estimulante del estrés oxidativo, con la generación de ROS, principalmente el $^1\text{O}_2$, que no involucra a la NOX ni oxidación de proteínas, pero sí al contenido de GSH intracelular. Sin embargo, con la concentración tóxica el consumo de GSH intracelular es mayor. La exposición de los PMN a Fe^{2+} genera un efecto inhibitorio de la protección antioxidante ya que se consume casi totalmente el GSH intracelular.

Cuando se estimó el índice de inflamación mediante la combinación de los dos indicadores de estallido respiratorio en PMN (ΔO_2 y NOX), se observó que la contribución de NOX a este índice es cero en PMN expuestos a Fe^{2+} , por lo tanto, este índice es el mismo que el obtenido teniendo en cuenta solamente el ΔO_2 detectado por polarografía, que estaría asociado a la reducción del oxígeno en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

El índice de daño oxidativo calculado teniendo en cuenta los biomarcadores de oxidación de biomoléculas y de protección antioxidante en PMN mostró que el Fe^{2+} incrementa el consumo de GSH intracelular con el aumento de la concentración a la que se exponen los PMN, tanto a concentraciones permitidas de Fe^{2+} en agua de bebida y recreativas como en la concentración tóxica evaluada. Un valor mayor a 1 indica un efecto estimulante o activador y un valor menor a 1 representa un efecto inhibitorio del proceso involucrado (Tabla 22).

Tabla 22. *Índice de estimulación o inhibición de inflamación y daño oxidativo en PMN expuestos a Fe^{2+} (6, 30, 300 $\mu\text{g/L}$)*

Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	Índice de inflamación	Índice de daño oxidativo
0	1,0	1,0
6	0,6	0,8
30	0,6	1,0
300	0,4	1,0

Los resultados de la Tabla 22 muestran que el Fe^{2+} tanto con la concentración máxima permitida en agua de bebida y recreacionales como con la concentración tóxica inhibe los procesos inflamatorios y no genera estrés/daño oxidativo. Si bien con las concentraciones máxima permitida y tóxica se observa aumento de la quimioluminiscencia, y consumo de GSH intracelular, los procesos oxidativos podrían ser reversibles y no observarse un cambio en la concentración de biomoléculas oxidadas.

4.4. Capítulo 4. Estrés oxidativo e inflamación en neutrófilos humanos expuestos a hierro y MC-LR.

4.4.1. Marcadores de inflamación

Con el objetivo de demostrar el efecto de la exposición de PMN humanos expuestos a concentraciones permitidas de MC-LR y Fe^{2+} en forma combinada se evaluaron los biomarcadores de inflamación tales como el ΔO_2 , un marcador del estallido celular respiratorio, y la actividad del complejo enzimático NOX; y los marcadores de estrés oxidativo, como quimioluminiscencia espontánea, oxidación a biomoléculas y consumo de glutatión, el principal antioxidante endógeno celular.

Para ello se utilizaron PMN humanos aislados y tratados con la dosis permitida de MC-LR en aguas de consumo y recreativas, estimada en 1 μg MC-LR /L, como también, en una dosis subaguda calculada en 25 μg /L en presencia de Fe^{2+} en las concentraciones permitidas en aguas de consumo y recreativas o tóxicas.

4.4.1.1. Estallido respiratorio celular. Consumo de oxígeno en PMN

Con el objetivo de evaluar si la exposición de PMN a MC-LR y Fe^{2+} genera cambios en el estallido respiratorio celular, se determinó el ΔO_2 en las células vivas expuestas al agonista y células vivas no expuestas (control). Se utilizó una concentración óptima de 8×10^4 PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada resultó sensible. En la Tabla 23 se muestran los resultados obtenidos de la determinación del ΔO_2 de PMN medidos con un electrodo de oxígeno tipo Clark. Se puede observar que cuando los PMN se exponen en forma combinada a las concentraciones permitidas y subaguda de MC-LR y de todas las concentraciones permitidas de Fe^{2+} se activan los mecanismos asociados al ΔO_2 respecto al estado basal de estas células aisladas (sin tratamiento) (Tabla 23, Figuras 17 y 18).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 23 y Figuras 17 y 18, en la que se pueden observar los efectos activadores o inhibitorios dosis dependiente cuando los PMN se incubaron con MC-LR y Fe^{2+} . Con respecto a los PMN sin exponer, la combinación de concentraciones permitida de MC-LR con la menor concentración permitida de Fe^{2+} aumentó un 40% ($p<0,01$) el ΔO_2 , y 46% ($p<0,01$) con la concentración de 1 μg MC-LR/L y 300 μg Fe^{2+} /mL (tóxica) (Tabla 23, Figuras 17 y 18).

Cuando se comparan los resultados obtenidos del ΔO_2 de PMN expuestos a ambos agonistas juntos con respecto a la exposición al Fe^{2+} , el ΔO_2 de los PMN expuestos a todas las combinaciones de concentraciones permitidas de ambos agonistas y tóxicas de Fe^{2+} y con la concentración permitida de MC-LR fue significativamente mayor al 100% ($p<0,01$) que cuando fueron expuestos a las concentraciones permitidas y tóxica de Fe^{2+} , y ese incremento es independiente de la concentración de Fe^{2+} . Para la concentración tóxica de Fe^{2+} y concentración permitida de MC-LR el incremento del ΔO_2 también fue mayor al 100% ($p<0,01$), sin embargo, con la concentración subaguda de MC-LR no se observó cambio significativo entre la combinación de ambos agonistas y la exposición a Fe^{2+} en la concentración tóxica y al control (Tabla 23).

Tabla 23. Consumo de oxígeno para 8×10^4 PMN/mL, expuestos a concentraciones permitidas de MC-LR: $1 \mu g$ MC-LR/L; y subaguda: $25 \mu g$ MC-LR/L en presencia de Fe^{2+} : concentraciones permitidas: 6 y $30 \mu g$ Fe^{2+} /L; y tóxica: $300 \mu g$ Fe^{2+} /L

Agonista	Consumo de oxígeno (nmol O_2 /min/ 10^6 PMN)		
Fe^{2+} (μg /L)	0 MC-LR/L	$1 \mu g$ MC-LR/L	$25 \mu g$ MC-LR/L
0	96 ± 6	$133 \pm 2^*$	$159 \pm 13^*$
6	$57 \pm 7^{**}$	$135 \pm 8^{##}$	$132 \pm 11^{##}$
30	$58 \pm 7^{**}$	$111 \pm 9^{*†}$	$118 \pm 9^{*†}$
300	$40 \pm 11^{**}$	$140 \pm 11^{##}$	$69 \pm 11^{**}$

$^{**}p<0,01$ respecto al control; $^{††}p<0,01$ respecto a MC-LR y al Fe^{2+} ; $^{##}p<0,01$ respecto al control y al Fe^{2+}

Si se compara el ΔO_2 de PMN expuestos a ambos agonistas con respecto a la exposición a MC-LR, el efecto observado con ambos agonistas simultáneamente sobre el ΔO_2 dependió de la concentración de Fe^{2+} y de MC-LR. Con la máxima concentración permitida de Fe^{2+} , la combinación con la concentración permitida y subaguda de MC-LR, el ΔO_2 disminuyó un 17% respecto a la concentración permitida de MC-LR y 26% con respecto a la incubación con la concentración subaguda de MC-LR ($p<0,01$). Sin embargo, cuando se combinaron la concentración subaguda de MC-LR ($25 \mu g$ MC-LR/L) y tóxica de Fe^{2+} ($300 \mu g$ Fe^{2+} /mL), el ΔO_2 disminuyó un 57% ($p<0,05$) con respecto a los PMN expuestos solamente a esa concentración de MC-LR y no cambió respecto a las células sin exponer a ningún agonista ni al ΔO_2 de los PMN expuestos a concentraciones permitidas o tóxica de Fe^{2+} (Tabla 23, Figuras 17 y 18).

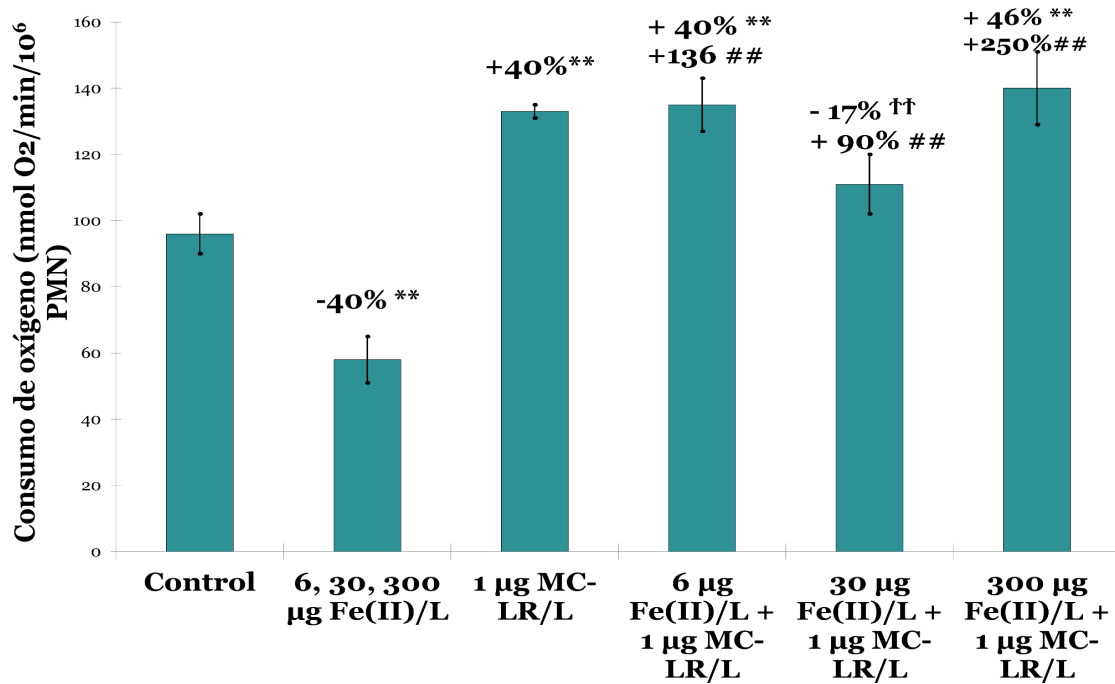


Figura 17. Cambios en el consumo de oxígeno de PMN expuestos al Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$): 6 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$ y 300 $\mu\text{g/L}$ y MC-LR: 1 $\mu\text{g/L}$ comparados con el control y MC-LR: 1 $\mu\text{g/L}$. ** $p < 0,01$ respecto al control; †† $p < 0,01$ respecto a MC-LR; ## $p < 0,01$ respecto a Fe^{2+}

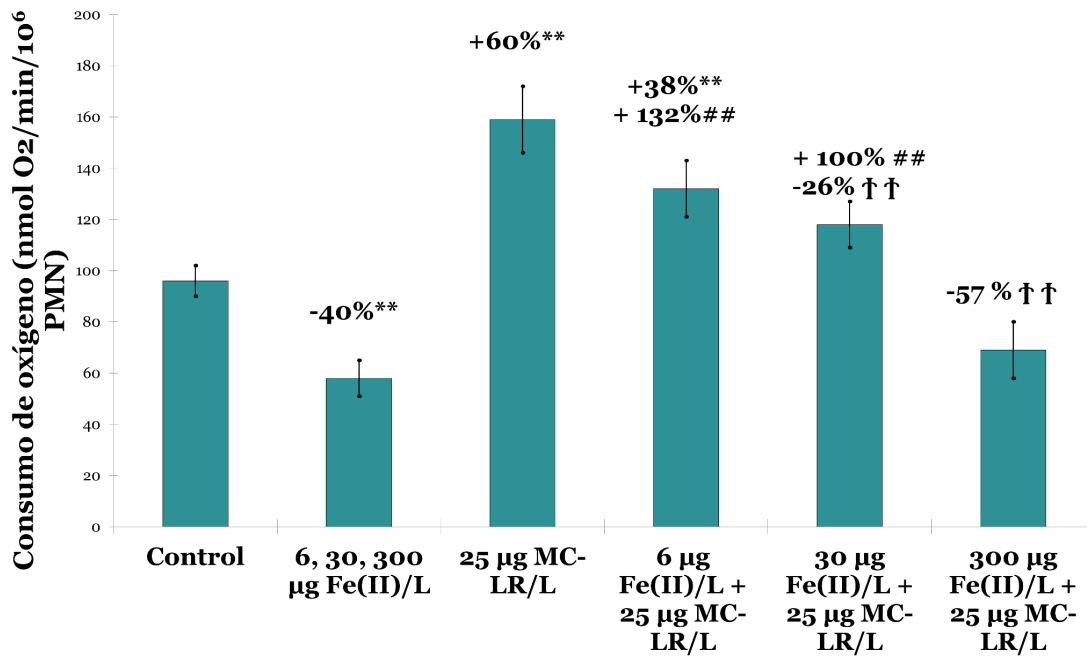


Figura 18. Cambios en el consumo de oxígeno de PMN expuestos al Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$): 6 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$ y 300 $\mu\text{g/L}$ y MC-LR: 25 $\mu\text{g/L}$ comparados con el control, (MC-LR: 25 $\mu\text{g/L}$ y Fe^{2+} : 6, 30 y 300 $\mu\text{g/L}$). ** $p < 0,01$ respecto al control; †† $p < 0,01$ respecto a MC-LR; ## $p < 0,01$ respecto al Fe^{2+}

En la Figura 17 se puede observar el cambio en el ΔO_2 medido en PMN expuestos tanto a la concentración máxima permitida de MC-LR y Fe^{2+} en aguas de consumo y recreacionales como a la exposición a una concentración subaguda (Figura 18) de MC-LR, o tóxica de Fe^{2+} , expresado en porcentaje de aumento o disminución con respecto al control (PMN sin exponer a agonistas) o a cada agonista.

Estos resultados indican que la combinación de ambos agonistas activa el estallido celular respiratorio con las dosis permitidas de 6 y 30 $\mu g Fe^{2+}/L$ y con la dosis permitida o subaguda de MC-LR (1 μg MC-LR/L y 25 μg MC-LR/L) (Tabla 23, Figuras 17 y 18) con respecto a PMN control. MC-LR en la concentración permitida activa el ΔO_2 de los PMN expuestos a la concentración tóxica de Fe^{2+} , pero con la concentración subaguda de MC-LR y tóxica de Fe^{2+} , el ΔO_2 se inhibe respecto MC-LR ($p < 0,01$) que alcanza el valor del control (Tabla 23, Figura 18), y el de Fe^{2+} como único agonista. En síntesis, el Fe^{2+} en la concentración máxima permitida previene el incremento del ΔO_2 causado por el MC-LR en la concentración permitida y subaguda, y el Fe^{2+} , en la concentración tóxica inhibe el efecto activador de la MC-LR en la concentración subaguda (Tabla 23, Figura 18).

4.4.1.2. PMN expuestos a Fe^{2+} , MC-LR ($\mu g/L$) y cianuro

Con el propósito de conocer si el ΔO_2 determinado en los PMN expuestos a MC-LR y Fe^{2+} , en las concentraciones permitida y subaguda de MC-LR y las permitidas y tóxica de Fe^{2+} , está asociado a la actividad de la NOX (ΔO_2 extramitocondrial) o a la cadena respiratoria mitocondrial, se determinó el mismo en presencia de cianuro (CN^-), un inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

En la Tabla 24 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la cinética del ΔO_2 de PMN (8×10^4 células/mL) antes (T1) y después (T2) del agregado de CN^- (10 mM). Se puede observar que en presencia de CN^- el ΔO_2 de PMN expuestos a la combinación de todas las concentraciones permitidas y tóxicas de MC-LR y de Fe^{2+} se inhibe completamente.

Tabla 24. Consumo de oxígeno (nmol O₂/min/10⁶ PMN) (8 x 10⁴ células/mL) en PMN expuestos al MC-LR y Fe²⁺ al inicio de la medición: tiempo 1 (T1) y posterior al agregado de cianuro a los 5 minutos de iniciado el proceso de medición: tiempo 2 (T2)

Agonista		Consumo de oxígeno (nmol O ₂ /min/10 ⁶ PMN)		
Fe ²⁺ (μg/L)	1 μg MC-LR/L		25 μg MC-LR/L	
	T1	T2	T1	T2
0	133 ± 2	20 ± 1**	159 ± 13	20 ± 1**
6	135 ± 8 **	0**	132 ± 11**	0**
30	111 ± 9	0**	118 ± 9	0**
300	140 ± 11**	0**	69 ± 11 ^{††}	0**

**p < 0,01

Estos resultados indican que el agregado de cianuro a la suspensión de PMN expuestos a la concentración máxima permitida y subaguda de MC-LR combinadas con las concentraciones permitidas y tóxica de Fe²⁺ inhibe completamente el estallido respiratorio, lo cual indica que el efecto activador de estos agonistas combinados (en ausencia de cianuro) estaría asociado principalmente a procesos oxidativos que ocurren a nivel mitocondrial.

4.4.1.3. Actividad de NADPH oxidasa (NOX)

Con el objetivo de determinar si la exposición a los agonistas MC-LR y Fe²⁺ combinados activa o inhibe la actividad de la NOX de PMN, se evaluó el consumo de NADPH por luminiscencia de células expuestas al agonista y de células sin exponer (control). Se utilizó una concentración de 2,5 x 10⁶ PMN/mL, la cual mostró una luminiscencia detectable expresada en unidades relativas de luminiscencia (URL por unidad de tiempo (segundos) y por miligramo de proteínas).

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la actividad de NOX (ULR/seg x mg prot) en PMN (2,5 x 10⁵ células/mL) expuestos a MC-LR y Fe²⁺ (μg/L). Se puede observar que la exposición de PMN a ambos agonistas, en la concentración de células a la que este método resultó sensible, inhibió en un 100% la actividad de la enzima, ya que no se detectó luminiscencia en las células expuestas a las concentraciones de ambos agonistas (Tabla 25).

Tabla 25. Resultados de la determinación NOX (ULR seg /mg prot) en PMN ($2,5 \times 10^5$ células/mL) expuestos a MC-LR y Fe^{2+} combinados ($\mu\text{g/L}$)

Agonista	NOX de PMN (ULR seg/mg prot)		
Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	MC-LR/L		
	0	1 $\mu\text{g} / \text{L}$	25 $\mu\text{g} / \text{L}$
0	15051 $\pm$ 11875	nd	nd
6	nd	nd	nd
30	nd	nd	nd
300	nd	nd	nd

nd: no detectable

Estos resultados indican que en PMN expuestos a MC-LR y Fe^{2+} combinados se inhibe completamente el estallido respiratorio extramitocondrial del PMN y que el efecto inhibitorio que generan MC-LR y Fe^{2+} sería a nivel de la membrana celular, con ambas concentraciones, tanto a la concentración máxima permitida en aguas de consumo y recreacionales como con la exposición a concentraciones tóxicas de ambos agonistas.

4.4.2. Marcadores de estrés oxidativo

4.4.2.1. Quimioluminiscencia espontánea

Con el objetivo de evaluar si la exposición de los PMN a MC-LR y Fe^{2+} combinados genera incremento de la peroxidación de lípidos y estrés oxidativo, se determinó la emisión de luz por quimioluminiscencia espontánea de las células expuestas a la combinación de los agonistas con respecto a las células control y a cada uno de los agonistas. Se utilizó una concentración óptima de 8×10^4 PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada es sensible. En la Tabla 26 se muestran los resultados obtenidos de la determinación del marcador de peroxidación lipídica, la quimioluminiscencia espontánea de las células vivas.

Se puede observar que luego de la exposición de las células a la combinación de los agonistas en la concentración permitida y subaguda de MC-LR/L en forma simultánea con concentraciones permitidas o tóxica de Fe^{2+} , disminuyó la quimioluminiscencia espontánea (QL) con respecto a los PMN expuestos a cada

agonista en las distintas concentraciones evaluadas, y sin cambios significativos con respecto al control (PMN sin exponer al agonista) (Tabla 26 y Figura 19).

Tabla 26. Quimioluminiscencia de PMN (8×10^4 PMN/mL), expuestos a concentraciones permitida de MC-LR: $1 \mu\text{g MC-LR/L}$ y subaguda: $25 \mu\text{g MC-LR/L}$; y Fe^{2+} (6, 30 o $300 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{L}$)

Agonista	Quimioluminiscencia (cps/ 10^6 PMN)		
Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	0 MC-LR/L	$1 \mu\text{g MC-LR/L}$	$25 \mu\text{g MC-LR/L}$
0	72 ± 13	$287 \pm 24^{\dagger\dagger\dagger}$	$108 \pm 18^{***}$
6	72 ± 9	$65 \pm 6^{\#\#}$	$67 \pm 6^{\#\#}$
30	$150 \pm 11^{***}$	$56 \pm 2^{\dagger\dagger\dagger}$	$41 \pm 1^{\dagger\dagger\dagger}$
300	$124 \pm 16^{***}$	$62 \pm 9^{\&\&\&}$	$34 \pm 1^{\dagger\dagger\dagger}$

*** $p < 0,001$ respecto al control; $\#\#p < 0,001$ respecto a MC-LR; $\&\&\&p < 0,001$ respecto a MC-LR y a Fe^{2+} ; $\dagger\dagger\dagger p < 0,001$ respecto al control, a MC-LR y a Fe^{2+}

Los resultados de los experimentos realizados demuestran que la QL de los PMN expuestos a la combinación de ambos agonistas en las concentraciones permitidas disminuyó un 77% con respecto a la concentración permitida de MC-LR ($p < 0,001$, Figura 18) y un 40% con respecto a la concentración subaguda de MC-LR ($p < 0,001$, Figura 19). La exposición de los PMN a las concentraciones máxima permitida y tóxica de Fe^{2+} con MC-LR en la concentración permitida, generó una disminución del 60 y 50% respectivamente de la emisión de luz con respecto al efecto producido por la exposición de los PMN a las concentraciones máxima permitida y tóxica de Fe^{2+} como único agonista ($p < 0,001$), hasta alcanzar los valores de QL de PMN control (Tabla 26 y Figura 19). El valor de cambio expresado en porcentajes se indica en la Figura 19 (70%) para las combinaciones de dosis permitida y tóxica de Fe^{2+} con la dosis subaguda de MC-LR comparadas con Fe^{2+} como único agonista (60 y 50% respectivamente) o con MC-LR como único agonista (80%).

Con respecto a la combinación de las concentraciones máxima permitida y tóxica de Fe^{2+} con MC-LR en la concentración subaguda, generó una disminución del 70% de la emisión de luz con respecto al efecto producido por la exposición de los PMN a las concentraciones máxima permitida y tóxica de Fe^{2+} , en ambos casos como único agonista ($p < 0,001$) (Tabla 26, Figura 20).

En las Figuras 19 y 20 se puede observar el cambio en la QL medido en PMN expuestos a la combinación de MC-LR y Fe^{2+} , tanto a la concentración máxima permitida en aguas de consumo y recreacionales como con la exposición a la concentración subaguda de MC-LR y tóxica de Fe^{2+} (Figura 20) respecto al control (PMN sin exponer a agonistas) o a cada agonista (Figuras 19 y 20).

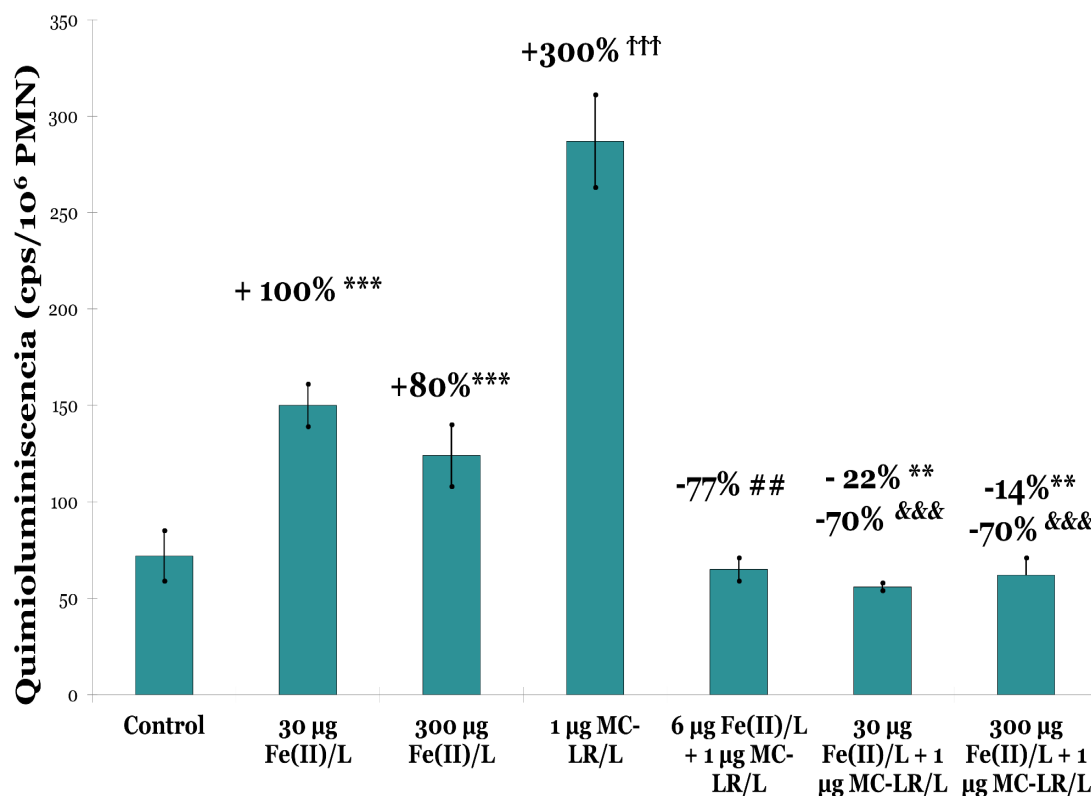


Figura 19. Cambios en la quimioluminiscencia de PMN expuestos al Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$): 6 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$ y 300 $\mu\text{g/L}$ y MC-LR: 1 $\mu\text{g/L}$ comparados con el control, con Fe^{2+} y MC-LR (1 $\mu\text{g/L}$).

** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ respecto al control; #### $p < 0,001$ respecto a MC-LR; &&& $p < 0,001$ respecto a MC-LR y a Fe^{2+} ; ††† $p < 0,001$ porcentaje promedio respecto a MC-LR (80%) y a Fe^{2+} (60% con dosis permitida y 50% con dosis tóxica)

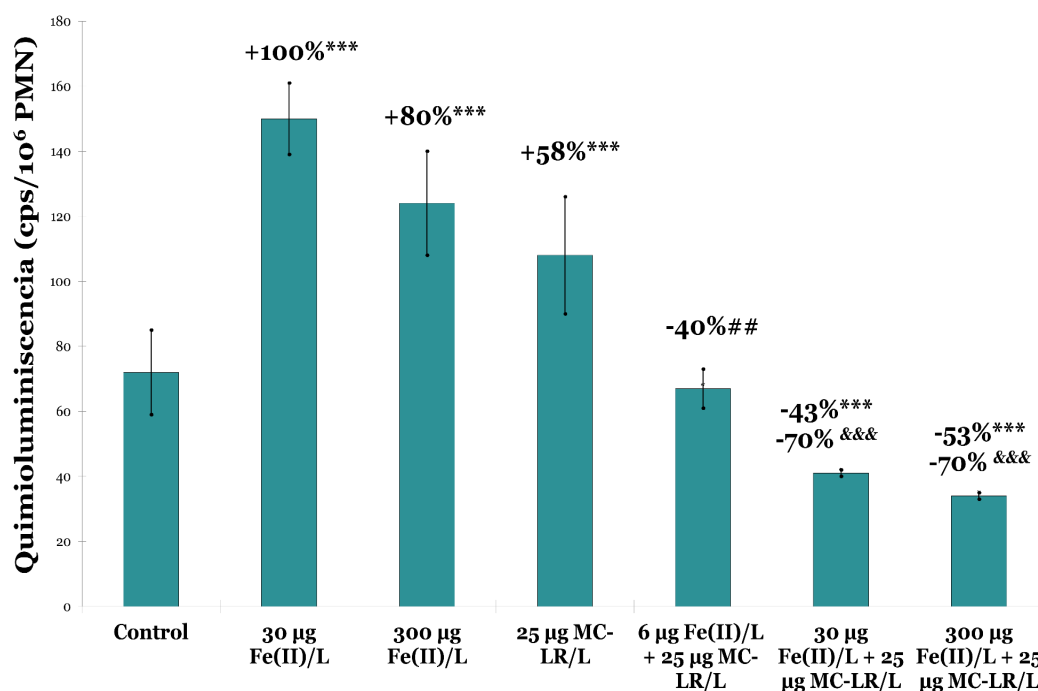


Figura 20. Cambios en la quimioluminiscencia de PMN expuestos al Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$): 6 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$ y 300 $\mu\text{g/L}$ y MC-LR: 25 $\mu\text{g/L}$ comparados con el control, con Fe^{2+} y con MC-LR (25 $\mu\text{g/L}$). *** $p < 0,001$ respecto al control; ## $p < 0,001$ respecto a MC-LR; &&& $p < 0,001$ respecto a MC-LR y a Fe^{2+}

Estos resultados indican que la exposición a MC-LR combinada con Fe^{2+} previene la oxidación de lípidos y del daño oxidativo de PMN que genera la MC-LR en la concentración permitida o subaguda, o la exposición a Fe^{2+} , tanto con la concentración máxima permitida en aguas de consumo y recreacionales como con la exposición a la concentración tóxica.

4.4.2.2. Oxidación de proteínas: contenido de carbonilos

Con el objetivo de evaluar si la exposición a MC-LR en simultáneo con Fe^{2+} genera oxidación de proteínas en PMN, se determinó el contenido de grupos carbonilos de proteínas presentes en las células. Se utilizó una concentración óptima de 5×10^6 PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada resultó sensible.

La combinación de MC-LR en la concentración permitida con Fe^{2+} , en todas las concentraciones evaluadas, disminuye 30% ($p < 0,01$) la oxidación de proteínas en los PMN expuestos con respecto a la oxidación de proteínas generada por la MC-LR en la concentración permitida, hasta alcanzar el valor del control. El mismo efecto fue observado con las combinaciones de las concentraciones permitidas y tóxica de Fe^{2+} con

la concentración subaguda de MC-LR, pero la disminución fue mayor (52%, $p<0,01$) con respecto al efecto producido por MC-LR (Tabla 27, Figuras 21 y 22).

Sin embargo, se puede observar que la exposición de las células a la concentración máxima permitida de Fe^{2+} combinada con la concentración subaguda de MC-LR en agua de bebida y recreacionales incrementa significativamente la oxidación de proteínas de los PMN expuestos (70%, $p<0,001$) con respecto a los PMN sin exponer, con una oxidación de proteínas similar al efecto observado por la exposición de los PMN a la concentración permitida ($p<0,05$) y subaguda de MC-LR como único agonista ($p<0,01$). En todos los casos, la combinación con Fe^{2+} protegió a las proteínas de los PMN del daño oxidativo generado por la MC-LR (Tabla 27, Figuras 21 y 22).

Tabla 27. Oxidación de proteínas medida como carbonilos (CO) en PMN (5×10^6 células/mL) expuestos a la combinación de MC-LR y Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)

Agonista	Carbonilos de PMN (nmol proteínas CO/ 10^6 células)		
Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$)	0 MC-LR/L	1 μg MC-LR/L	25 μg MC-LR/L
0	38 $\pm$ 6	61 $\pm$ 9*	83 $\pm$ 15**
6	41 $\pm$ 6	41 $\pm$ 10 ^{##}	35 $\pm$ 9 ^{##}
30	28 $\pm$ 4	34 $\pm$ 9 ^{##}	65 $\pm$ 1 ^{###}
300	45 $\pm$ 10	32 $\pm$ 9 ^{##}	44 $\pm$ 17 ^{##}

* $p<0,05$; ^{##} $p<0,001$ respecto a MC-LR; ^{###} $p<0,001$ respecto al control y al Fe^{2+} .

Las Figuras 21 y 22 muestran el cambio en la oxidación de proteínas medido como contenido de carbonilos en PMN expuestos a MC-LR y Fe^{2+} , combinados en la concentración máxima permitida en aguas de consumo y recreacionales como con la concentración subaguda de MC-LR o tóxica de Fe^{2+} , expresado en porcentaje respecto al control (PMN sin exponer a agonistas) o a cada agonista (Figuras 15, 21 y 22). En la Figura 22 no se incluyen los datos de Fe^{2+} como agonista solo ya que no presenta diferencias significativas con el control, y el porcentaje de cambio con respecto al Fe^{2+} es igual al del control.

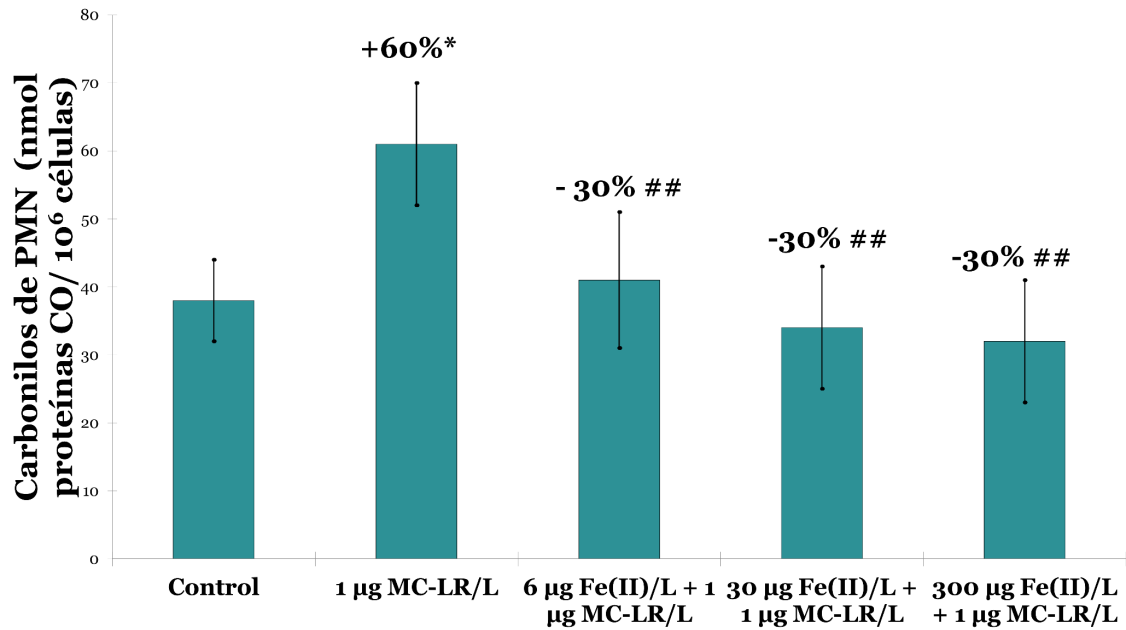


Figura 21. Cambios en el contenido de carbonilos de PMN expuestos al Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$): 6 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$ y 300 $\mu\text{g/L}$ y MC-LR: 1 $\mu\text{g/L}$ comparados con el control y con MC-LR (1 $\mu\text{g/L}$).
* $p < 0,05$; ## $p < 0,001$ respecto a MC-LR.

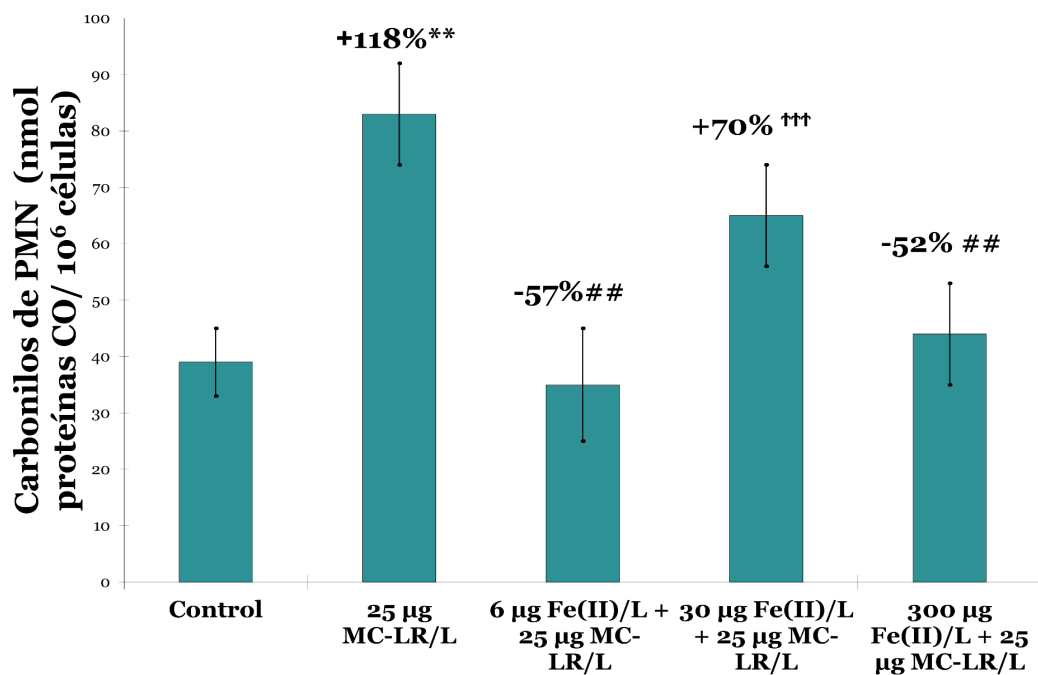


Figura 22. Cambios en el contenido de carbonilos de PMN expuestos al Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$): 6 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$ y 300 $\mu\text{g/L}$ y MC-LR: 25 $\mu\text{g/L}$ comparados con el control y con MC-LR (25 $\mu\text{g/L}$). ** $p < 0,01$ respecto al control; ## $p < 0,001$ respecto a MC-LR; ††† $p < 0,001$ respecto al control y al Fe^{2+} .

Estos resultados indicarían que la presencia de Fe^{2+} inhibe el estrés oxidativo de las proteínas causado por la exposición de PMN a la concentración permitida de MC-LR. La concentración permitida de $1\ \mu\text{g}\ \text{Fe}^{2+}/\text{mL}$ y la concentración tóxica de Fe^{2+} inhiben la oxidación de proteínas que genera la exposición a una concentración subaguda de MC-LR, sin embargo, la concentración máxima permitida de Fe^{2+} no es suficiente para inhibir el daño oxidativo a proteínas que produce la concentración subaguda de MC-LR. De acuerdo a estos resultados y los obtenidos de quimioluminiscencia, el daño oxidativo a las proteínas observado en los PMN expuestos a MC-LR y a Fe^{2+} en la combinación subaguda de MC-LR y máxima permitida de Fe^{2+} no estaría asociada a los procesos oxidativos de membrana que generan como producto de descomposición final al $^1\text{O}_2$ y emisión de luz.

4.4.2.3. Oxidación de lípidos: TBARS

Con el objetivo de investigar si el incremento de la quimioluminiscencia espontánea observada en PMN expuestos a la combinación de MC-LR en concentraciones máxima permitida y subaguda con concentraciones permitidas y una concentración tóxica de Fe^{2+} está asociado al incremento de peroxidación de lípidos, se evaluó el contenido de TBARS en las células. Sin embargo, en todo el rango de las concentraciones de PMN utilizadas para la selección de la concentración óptima de trabajo para todos los biomarcadores evaluados, con la metodología empleada para la determinación de TBARS no se pudieron detectar los productos de oxidación de lípidos en este modelo experimental. Los resultados obtenidos en la determinación de quimioluminiscencia espontánea (ver sección 4.2.2.1.) indican que en los PMN expuestos a cada uno de los agonistas por separado, MC-LR o Fe^{2+} , genera emisión de luz, pero que en este modelo experimental cuando se exponen los PMN a la mezcla de ambos agonistas, no se observa ese incremento en la quimioluminiscencia de los PMN expuestos. Lo que indica que los efectos observados no estarían asociados a la oxidación de lípidos.

4.4.2.4. Contenido de Glutación intracelular

Con el objetivo de evaluar si la exposición de PMN a la combinación de MC-LR y Fe^{2+} genera consumo o depleción de antioxidantes, se determinó el contenido de GSH en las células. Se utilizó una concentración óptima de $1,5 \times 10^6$ PMN/mL, concentración a la cual la técnica empleada resultó sensible. Todos los tratamientos con MC-LR y

Fe²⁺, en todas las concentraciones evaluadas, disminuyen significativamente el contenido intracelular de GSH (Tabla 28, Figura 23 y 24).

La exposición de los PMN a la combinación de los agonistas en la concentración permitida de Fe²⁺ y MC-LR genera una disminución del 70% ($p<0,01$) del contenido intracelular de GSH respecto a los PMN control, comparable con el efecto observado por la exposición de PMN a las concentraciones permitidas del agonista Fe²⁺ (80%, $p<0,001$), a la concentración subaguda de MC-LR (80%, $p<0,001$); o a la combinación de MC-LR subaguda y máxima permitida de Fe²⁺, como también con la combinación de la concentración subaguda de MC-LR y tóxica de Fe²⁺ (70%, $p<0,001$ y $p<0,01$ respectivamente) (Tabla 28, Figuras 23 y 24).

Sin embargo, la exposición de los PMN a la concentración máxima permitida y tóxica de Fe²⁺ combinadas con la concentración permitida de MC-LR consumen el 97% del contenido intracelular de GSH ($p<0,001$) con respecto al control, comparable con el efecto observado con la combinación de la concentración permitida de Fe²⁺ y concentración subaguda de MC-LR (93%, $p<0,001$); con la exposición al agonista Fe²⁺ en la concentración tóxica (93%, $p<0,001$), o concentración permitida de MC-LR (90%, $p<0,001$) en aguas de consumo y recreacionales, en todos los casos con respecto al control (PMN sin exposición al agonista, sin tratamiento) (Tabla 28, Figuras 23 y 24).

Tabla 28. Contenido intracelular de glutatión (GSH) en PMN expuestos a MC-LR y Fe²⁺ (µg/L)

Agonista	GSH (nmol/ 10 ⁶ PMN)		
	Fe ²⁺ (µg/L)	0 MC-LR/L	1 µg MC-LR/L 25 µg MC-LR/L
	0	5,77 ± 0,44	0,58 ± 0,15*** 1,07 ± 0,05***
	6	1,10 ± 0,70***	1,30 ± 0,16## 0,38 ± 0,08 ^{†††}
	30	1,16 ± 0,02***	0,17 ± 0,1 ^{†††} 1,69 ± 0,21 ^{†††}
	300	0,54 ± 0,26***	0,42 ± 0,19*** 1,28 ± 0,62 ^{&&}

*** $p<0,001$ respecto al control; ## $p<0,01$ respecto al control y MC-LR; && $p<0,01$ respecto al control y Fe²⁺; ††† $p<0,001$ respecto al control, a MC-LR y al Fe²⁺.

En las Figuras 23 y 24 se puede observar la disminución del contenido intracelular de GSH en PMN expuestos a MC-LR y Fe^{2+} , tanto a la concentración máxima permitida en aguas de consumo y recreacionales como a la exposición a la concentración subaguda de MC-LR y tóxica de Fe^{2+} , expresado en porcentaje de disminución respecto al control (PMN sin exponer a los agonistas) y a cada agonista.

La disminución del contenido intracelular de GSH fue mayor con la combinación de la mayor concentración de Fe^{2+} (máxima permitida y tóxica) con la menor concentración de MC-LR (permitida) como también con la mezcla de los agonistas con la menor concentración de Fe^{2+} (permitida) y mayor de MC-LR (subaguda) (Tabla 28, Figuras 23 y 24).

Estos resultados indican que la exposición de PMN a las dosis permitidas y subaguda de MC-LR combinadas con las concentraciones permitidas y tóxica de Fe^{2+} disminuye significativamente el contenido de GSH intracelular, disminuyendo la protección antioxidante y predisponiendo las células a estrés y daño oxidativo.

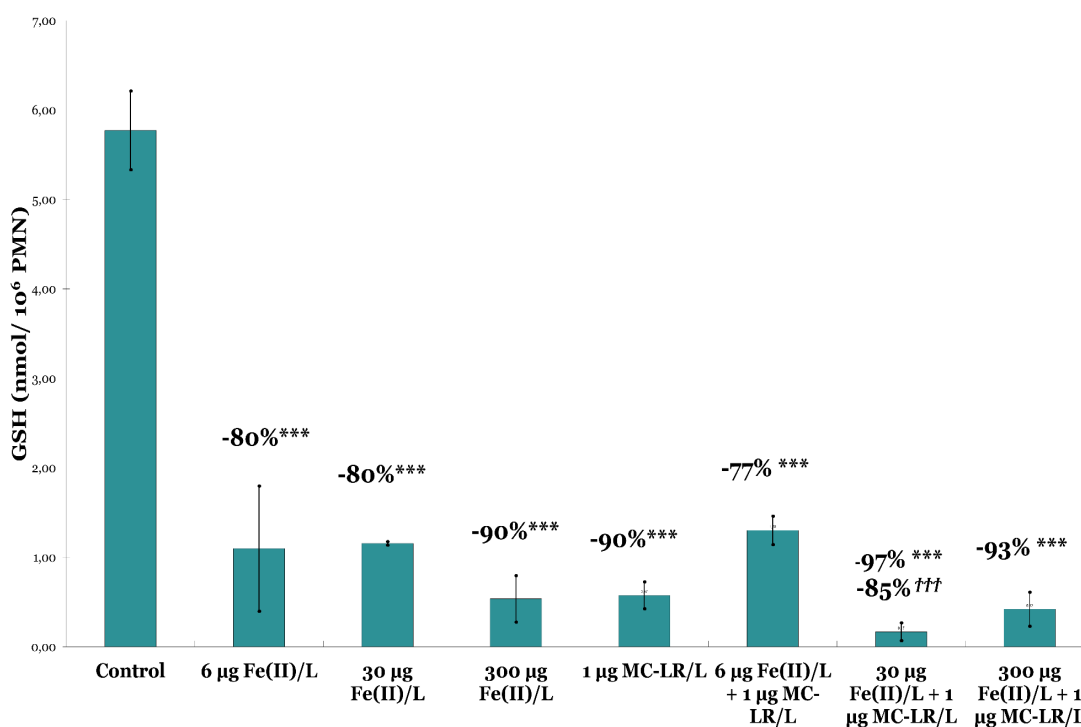


Figura 23. Cambios en el contenido intracelular de GSH de PMN expuestos al Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$): 6 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$ y 300 $\mu\text{g/L}$ y MC-LR: 1 $\mu\text{g/L}$ comparados con el control, Fe^{2+} (6, 30 y 300 $\mu\text{g/L}$) y MC-LR (1 $\mu\text{g/L}$). *** $p < 0,001$ respecto al control; $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0,001$ respecto a MC-LR (70%) y al Fe^{2+} (85%)

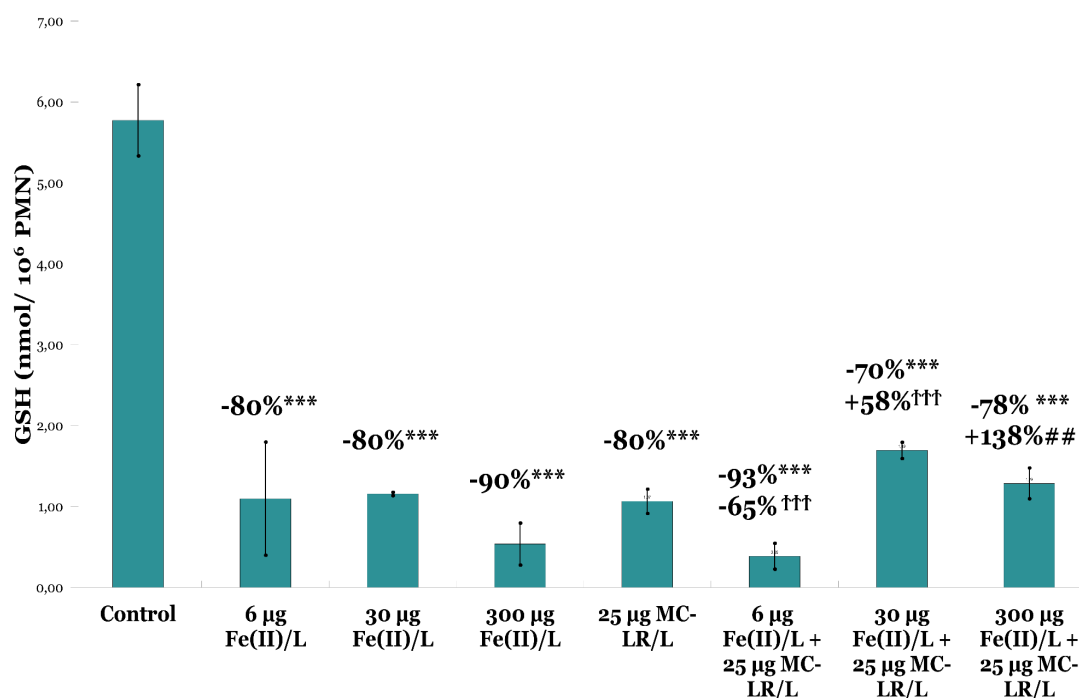


Figura 24. Cambios en el contenido intracelular de GSH de PMN expuestos al Fe^{2+} ($\mu\text{g/L}$): 6 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$ y 300 $\mu\text{g/L}$ y MC-LR: 1 $\mu\text{g/L}$ comparados con el control, Fe^{2+} (6, 30 y 300 $\mu\text{g/L}$) y MC-LR (25 $\mu\text{g/L}$). *** $p < 0,001$ respecto al control; ## $p < 0,01$ respecto al Fe^{2+} ; ††† $p < 0,01$ respecto a MC-LR y al Fe^{2+}

4.4.3. Índices de estimulación del estallido respiratorio y del daño oxidativo

A partir de los biomarcadores evaluados para cada agonista en las distintas concentraciones permitidas en agua de bebida y recreacionales como con las concentraciones tóxicas, se pudo calcular el índice de inhibición o de estimulación de los procesos inflamatorios u oxidativos asociados al efecto de MC-LR y Fe^{2+} cuando los PMN aislados se incubaron *ex vivo* con la mezcla de ambos agonistas con respecto al parámetro evaluado en PMN en ausencia de los agonistas (control) (Tabla 29). Un valor mayor a 1 indica un efecto estimulante o activador y un valor menor a 1 representa un efecto inhibitorio del proceso involucrado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la combinación de MC-LR y Fe^{2+} , en todas las concentraciones evaluadas, activa el estallido celular respiratorio medido como ΔO_2 en PMN con respecto al control (PMN sin exponer), excepto con la combinación de la concentración tóxica de Fe^{2+} y subaguda de MC-LR (Tabla 29).

La combinación de ambos agonistas en concentraciones permitidas disminuye el estrés oxidativo con respecto al control, como también con las concentraciones tóxica de Fe^{2+} y subaguda de MC-LR, protegiendo a los PMN de la generación de ROS y del

daño oxidativo que genera cada agonista, ya que el índice que combina los marcadores de daño oxidativo para cada agonista en todas las combinaciones es menor al de las células sin exponer.

Con respecto a la oxidación de proteínas medida como carbonilos presentes en la muestra, la combinación de las concentraciones permitidas o tóxica de Fe^{2+} con la concentración permitida de MC-LR disminuye la oxidación de proteínas, sin embargo, cuando los PMN se los expone a la concentración máxima permitida o tóxica de Fe^{2+} con la concentración subaguda de MC-LR en la mezcla, se estimula la oxidación de proteínas de los PMN expuestos a la mezcla respecto al control (Tabla 29). La combinación de ambos agonistas en todas las concentraciones a las que se expusieron los PMN depletaron casi totalmente a los PMN del GSH intracelular con respecto al control (Tabla 29). Estos resultados indican que MC-LR combinada con Fe^{2+} actuaría como estímulo del estallido respiratorio celular en PMN expuestos a todas las concentraciones permitidas de Fe^{2+} y MC-LR, o tóxica de Fe^{2+} y permitida de MC-LR.

La combinación de Fe^{2+} y MC-LR en concentración tóxica y subaguda respectivamente inhibe el ΔO_2 con respecto al control (Tabla 29).

Tabla 29. Índice de estimulación o inhibición del estallido respiratorio y procesos oxidativos de PMN expuestos a MC-LR (1 y 25 $\mu\text{g/L}$) y Fe^{2+} (6, 30 y 300 $\mu\text{g/L}$) con respecto al control

Consumo de oxígeno			Quimioluminiscencia		Carbonilos		GSH	
Fe ²⁺	MC-LR (µg/L)							
(µg/L)	1	25	1	25	1	25	1	25
6	1,4	1,4	0,9	0,9	1,1	0,9	0,2	0,07
30	1,2	1,2	0,8	0,6	0,9	1,7	0,03	0,3
300	1,5	0,7	0,9	0,9	0,8	1,2	0,07	0,2

La combinación de ambos agonistas no activa la generación de ROS con todas las concentraciones de MC-LR y Fe^{2+} evaluadas. Se observó que con las concentraciones permitidas de MC-LR en agua de bebida y recreacionales combinadas con Fe^{2+} , tanto en concentraciones permitidas como tóxicas, no tendría un efecto activador del estrés oxidativo, respecto al control.

Sin embargo, con la exposición a una concentración subaguda de MC-LR y tóxica de Fe^{2+} el efecto sobre los PMN no estaría asociado a procesos inflamatorios con

activación del estallido respiratorio celular, pero sí asociado a la oxidación de proteínas y consumo de GSH intracelular. Ambas concentraciones de MC-LR generan un efecto inhibitorio de la protección antioxidante ya que se consume el GSH intracelular (Tabla 29).

Con el objetivo de estimar la contribución de MC-LR o del Fe^{2+} al efecto observado en los PMN expuestos a la mezcla de ambos agonistas en todas las combinaciones de las concentraciones evaluadas, se calcularon los índices de estallido respiratorio y estrés oxidativo con respecto al efecto de los biomarcadores correspondientes con respecto a cada agonista, a la MC-LR (Tabla 30) o al Fe^{2+} (Tabla 31).

Para evaluar la contribución del Fe^{2+} al efecto observado con la mezcla de ambos agonistas se calcularon los índices de estallido respiratorio y estrés oxidativo a partir de los biomarcadores correspondientes en PMN expuestos a la combinación de ambos agonistas con respecto a MC-LR. Estos índices muestran que no se observa un efecto estimulante del ΔO_2 , y se produce una inhibición del estrés oxidativo y de la oxidación de proteínas con las todas las concentraciones de ambos agonistas. Con todas las combinaciones de MC-LR y Fe^{2+} , los indicadores de estallido respiratorio y estrés oxidativo muestran un efecto inhibitorio con respecto al estallido respiratorio que genera la MC-LR como único agonista, lo que sugiere que el Fe^{2+} actuaría como un agente inhibitorio de la respuesta de los PMN al estallido respiratorio estimulado por MC-LR (Tabla 30).

La disminución de los índices de quimioluminiscencia y oxidación de proteínas para los PMN expuestos a la mezcla de ambos agonistas en todas las concentraciones comparados con el efecto de MC-LR como único agonista indica que el estrés oxidativo y daño a proteínas sería causado por acción del Fe^{2+} . Esta observación se comprueba al analizar los índices de consumo de GSH intracelular para las combinaciones de concentraciones permitidas de MC-LR y Fe^{2+} , como también, con la mezcla de MC-LR en concentración subaguda con el Fe^{2+} , tanto con la concentración máxima permitida como tóxica. Ambas concentraciones muestran un aumento del contenido de GSH respecto a MC-LR. Lo que indicaría que la presencia de Fe^{2+} en la mezcla disminuye el consumo de GSH (Tabla 30).

Con el objetivo de analizar la contribución de la MC-LR al efecto observado con la mezcla de ambos agonistas se calcularon los índices de estallido respiratorio y estrés

oxidativo a partir de los biomarcadores correspondientes en PMN expuestos a la combinación de ambos agonistas con respecto al Fe^{2+} .

Tabla 30. Índice de estimulación o inhibición del estallido respiratorio y procesos oxidativos de PMN expuestos a MC-LR (1 y 25 $\mu\text{g/L}$) y Fe^{2+} (6, 30 y 300 $\mu\text{g/L}$) con respecto a MC-LR (1 y 25 $\mu\text{g/L}$)

Consumo de oxígeno		Quimioluminiscencia		Carbonilos		Glutación		
Fe ²⁺	MC-LR (µg/L)							
(µg/L)	1	25	1	25	1	25	1	25
0	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	0,8	0,2	0,6	0,7	0,4	2,2	0,4
30	0,8	0,7	0,2	0,4	0,6	0,8	0,3	1,6
300	1,1	0,4	0,2	0,3	0,5	0,5	0,7	1,2

Estos índices muestran que la combinación de ambos agonistas en todas las concentraciones aumenta el ΔO_2 , en forma similar al efecto activador del estallido respiratorio que genera la MC-LR, sin embargo, se muestra una disminución en los indicadores de estrés oxidativo, ya que los índices de quimioluminiscencia son menores a uno en la mezcla de todas las concentraciones de Fe^{2+} y de MC-LR (Tabla 31).

En cuanto al contenido de carbonilos presentes en los PMN expuestos a las combinaciones de agonistas con la concentración máxima permitida de Fe^{2+} y las concentraciones permitida o subaguda de MC-LR, el índice es mayor a 1. Lo que indicaría el estímulo de la oxidación de proteínas en los PMN expuestos (Tabla 31).

Tabla 31. Índice de estimulación o inhibición del estallido respiratorio y procesos oxidativos de PMN expuestos a MC-LR (1 y 25µg/L) y Fe²⁺ (6, 30, 300µg/L) con respecto a Fe²⁺ (6, 30 y 300µg/L)

Consumo de oxígeno		Quimioluminiscencia		Carbonilos		GSH		
Fe ²⁺	MC-LR (µg/L)							
(µg/L)	1	25	1	25	1	25	1	25
0	1	1	1	1	1	1	1	1
6	2,3	2,3	0,9	0,9	1	0,9	1,2	0,3
30	1,9	2,0	0,4	0,3	1,2	2,3	0,2	1,5
300	3,5	1,7	0,5	0,3	0,7	1	0,8	2,4

Estos resultados difieren con los índices calculados con respecto a MC-LR mostrados en la Tabla 30. La activación del estallido respiratorio con todas las concentraciones de agonistas evaluadas se debe a la acción de la MC-LR y la estimulación del estrés oxidativo al efecto del Fe²⁺, como también el daño oxidativo a las proteínas con la combinación de la concentración máxima permitida de Fe²⁺ y subaguda de MC-LR (Tabla 31).

Los índices de contenido intracelular de GSH calculados para la combinación de los agonistas en todas las concentraciones evaluadas con respecto al Fe²⁺ (Tabla 31) mostraron la misma tendencia de los índices calculados respecto a MC-LR (Tabla 30), sugiriendo que ambos agonistas contribuyen de igual manera al consumo de este antioxidante endógeno en los PMN expuestos.

Cuando se estimó el índice de inflamación mediante la combinación de los dos indicadores de estallido respiratorio en PMN (ΔO_2 y NOX), se observó que la contribución de la NOX a este índice es cero en PMN expuestos a la combinación de ambos agonistas, por lo tanto, este índice es el mismo que el obtenido teniendo en cuenta solamente el ΔO_2 detectado por polarografía, que estaría asociado a la reducción parcial del oxígeno molecular en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Tabla 32). Un valor mayor a 1 indica un efecto estimulante o activador y un valor menor a 1 representa un efecto inhibitorio del proceso involucrado.

El índice de inflamación calculado teniendo en cuenta el consumo de oxígeno (ΔO_2) mostró que la combinación de MC-LR con Fe^{2+} genera respuesta inflamatoria con respecto a los PMN sin exponer a la mezcla de agonistas, excepto con la combinación de la concentración tóxica de Fe^{2+} y subaguda de MC-LR (Tabla 32). El efecto observado estaría relacionado con los procesos inflamatorios y respuesta independiente al estallido respiratorio mediado por el complejo enzimático NOX.

El índice de daño oxidativo calculado a partir de la combinación de tres parámetros, teniendo en cuenta los biomarcadores de oxidación de biomoléculas y de protección antioxidante en PMN expuestos a las mezclas de ambos agonistas, mostró que la combinación de MC-LR con Fe^{2+} no genera incremento del daño oxidativo con respecto a PMN control (Tabla 32).

Tabla 32. Índice de estimulación de inflamación y daño oxidativo en PMN expuestos a MC-LR (1 y 25 $\mu g/L$) y Fe^{2+} (6, 30 y 300 $\mu g/L$) con respecto al control

Fe^{2+} ($\mu g/L$)	MC-LR ($\mu g/L$)			
	Índice de inflamación		Índice de daño oxidativo	
0	1	25	1	25
6	1,4	1,4	0,7	0,6
30	1,2	1,2	0,6	0,9
300	1,5	0,7	0,6	0,8

Con el objetivo de analizar si la respuesta inflamatoria o de daño oxidativo se debe al efecto del Fe^{2+} o de la MC-LR o de ambos, se calcularon los indicadores de inflamación y de daño oxidativo a partir de los biomarcadores correspondientes para los PMN expuestos a la combinación de agonistas con respecto a cada agonista, a MC-LR o a Fe^{2+} . Los resultados se muestran en las Tablas 33 y 34.

En la Tabla 33 se muestran los índices de inflamación y daño oxidativo calculados a partir de los biomarcadores correspondientes para los PMN expuestos a la combinación de agonistas con respecto a MC-LR.

Tabla 33. Índice de estimulación de inflamación y daño oxidativo en PMN expuestos a MC-LR (1 y 25 µg/L) y Fe²⁺ (6, 30 y 300 µg/L) con respecto a la MC-LR

Fe ²⁺ (µg/L)	MC-LR (µg/L)			
	Índice de inflamación		Índice de daño oxidativo	
0	1	25	1	25
6	1	0,8	1	0,5
30	0,8	0,7	0,4	0,9
300	1,2	0,4	0,5	0,7

Los resultados obtenidos indican que en las concentraciones evaluadas la presencia de Fe²⁺ solamente ejerce un efecto sinérgico con MC-LR en la respuesta inflamatoria de PMN expuestos a la concentración tóxica de Fe²⁺ combinada con la concentración permitida de MC-LR, sin embargo, cuando los PMN se exponen a la mezcla de ambos agonistas, no se observa que el Fe²⁺ contribuya en forma sinérgica con MC-LR al daño oxidativo.

En la Tabla 34 se muestran los índices de inflamación y daño oxidativo calculados a partir de los biomarcadores correspondientes para los PMN expuestos a la combinación de agonistas con respecto a Fe²⁺. Estos resultados indican que la MC-LR sería el agonista que contribuye a la respuesta inflamatoria que se observa cuando los PMN se exponen a la combinación de ambos agonistas en todas las concentraciones, y contribuye en forma sinérgica con el Fe²⁺ al daño oxidativo con la combinación de las concentraciones máxima permitida y tóxica de Fe²⁺ respectivamente con la concentración subaguda de MC-LR.

Tabla 34. Índice de estimulación de inflamación y daño oxidativo en PMN expuestos a MC-LR (1 y 25 µg/L) y Fe²⁺ (6, 30 y 300 µg/L) con respecto al Fe²⁺

Fe ²⁺ (µg/L)	MC-LR (µg/L)			
	Índice de inflamación		Índice de daño oxidativo	
0	1	25	1	25
6	2,3	2,3	1,0	0,7
30	1,9	2,0	0,6	1,4
300	3,5	1,7	0,7	1,2



5. Discusión de resultados

Como primer paso en el desarrollo experimental de esta tesis y con el objetivo de demostrar que la MC-LR/hepatotoxina genera una situación de estrés y daño oxidativo como mecanismo de toxicidad celular, que involucra la participación de las ROS asociada a la respuesta inflamatoria, y que la misma es afectada o potenciada por la presencia de hierro (Fe^{2+}), fue necesario disponer de un modelo experimental *ex vivo* que permita evaluar *in vitro* biomarcadores de inflamación y daño oxidativo.

El modelo experimental utilizado consistió en trabajar con PMN aislados, vivos y activos, que respondan al estímulo de exposición a los dos agentes contaminantes seleccionados: MC-LR y Fe^{2+} . Este modelo no ha sido utilizado previamente con estos fines, por lo tanto, fue necesario poner a punto cada una de las técnicas bioquímicas empleadas para la evaluación de los biomarcadores propuestos.

El desarrollo de un estudio experimental en un modelo *in vitro* requiere necesariamente de una adaptación para poder extraer conclusiones adecuadas. Por ello, la primera etapa de los experimentos de esta Tesis ha sido indispensable. En este sentido, se reconoce la necesidad de definir la concentración de células necesarias para optimizar las técnicas empleadas en la evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación. Como la sensibilidad de los métodos espectrofotométricos es menor a la de los métodos electroquímicos, polarográficos y de emisión de luz, como la quimioluminiscencia, se requirió ajustar la concentración de PMN en las muestras para cada ensayo, siendo la concentración óptima del orden de 1 a 5×10^6 células por mililitro de muestra para los métodos espectrofotométricos medidos en el rango de la luz visible y en el rango de 8×10^4 a 1×10^5 células por mililitro de muestra para los métodos polarográficos y técnicas de quimioluminiscencia, como se indicó en el capítulo 1. Teniendo en cuenta estas consideraciones, este modelo experimental, puede ser útil para la evaluación de la participación de las ROS asociada a la respuesta inflamatoria, para evaluar la acción de otros agonistas con efecto pro-oxidante o antioxidante, cambios en la respuesta celular, alteraciones en la función de proteínas, acumulación de metabolitos de procesos oxidativos o efectos tóxicos, como también fisiológicos, asociados al metabolismo celular.

En cuanto al modelo experimental para los estudios *in vitro* de esta Tesis, los PMN permitieron evaluar el comportamiento y respuesta celular frente a la exposición aguda a diversos agentes tóxicos ambientales. Representa un modelo experimental de relativamente fácil acceso para la evaluación de biomarcadores de estrés y daño oxidativo, factible de ser empleado para el estudio del daño que genera la exposición

aguda a concentraciones permitidas y tóxicas de agentes ambientales como el Fe^{2+} y la MC-LR, ambos presentes en el agua recreativa y agua de consumo o bebida contaminadas.

Los experimentos realizados *in vitro* representan un modelo relativamente accesible para la evaluación de biomarcadores de estrés y daño oxidativo. Sin embargo, cabe aclarar que algunos autores argumentan que no es fácil determinar si la toxicidad relativa de las sustancias químicas en modelos *in vitro* es comparable a sus toxicidades relativas *in vivo*, pues en el sistema *in vivo* intervienen muchos factores que crean confusión, como la toxicocinética, el metabolismo y los mecanismos de reparación y defensa. Además, como la mayoría de esos ensayos mide parámetros de la citotoxicidad general, no tienen una base mecanicista. Por consiguiente, la concordancia entre las toxicidades relativas *in vitro* e *in vivo* es meramente correlativa.

Aun así, pese a los muchos problemas y dificultades que plantea la extrapolación de modelos *in vitro* a situaciones *in vivo*, los ensayos *in vitro* resultan muy valiosos, porque son sencillos de realizar con poco costo y porque pueden utilizarse como métodos de detección con los que seleccionar fármacos o compuestos muy tóxicos en las fases tempranas de su desarrollo (Zurlo, 2012).

La selección de las células PMN como modelo experimental para este estudio fue justificada en la introducción y en los materiales y métodos de la Tesis. La misma se sustenta en varios estudios que demuestran que la MC-LR aumenta la migración de neutrófilos humanos, la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad fagocítica (Kujbida, 2006) en la intoxicación aguda. Por ello, esta Tesis permitió el estudio de los biomarcadores de inflamación y de daño oxidativo en cumplimiento de los objetivos específicos planteados. A futuro, este modelo experimental de PMN expuestos a agentes tóxicos permitiría avanzar en el estudio de los mecanismos bioquímicos moleculares asociados a algunos de estos procesos fisiopatológicos.

La selección de la toxina MC-LR para este estudio se asocia con el reconocido aumento de la frecuencia con que se la identifica en aguas de bebida y recreacionales, inducidas por el cambio climático. Estas toxinas son estudiadas como una problemática emergente cada vez más alarmante tanto en Argentina como a nivel mundial.

Con respecto a la selección del oligoelemento, se sabe que el hierro se encuentra presente en aguas de bebida y recreacionales. Aunque no existe un nivel guía en aguas de consumo humano definido para este elemento traza, se considera que es

potencialmente tóxico ya que puede participar en reacciones redox y está involucrado en el estrés oxidativo asociado a numerosas condiciones patológicas.

Actualmente, y como fue señalado en la introducción de esta Tesis, estudios previos demuestran que tanto la MC-LR, como el ión Fe^{2+} generan daño celular mediante mecanismos de estrés oxidativo (Mussaco Sebio, 2016; Saporito Magriñá y col., 2022). En base a ello se postula que la presencia de MC-LR, un oligopéptido ambiental, en las concentraciones ensayadas de 1 μg MC-LR/L y 25 μg MC-L/L, sería más grave y dañina para la salud humana si se combina con el Fe^{2+} presente en aguas de bebida y recreacionales, aun en los niveles permitidos.

En relación a las concentraciones de los agonistas de contaminación evaluadas en esta Tesis, los resultados obtenidos demuestran que la MC-LR presenta un comportamiento diferente al Fe^{2+} en los PMN expuestos a estos dos agentes ambientales de modo aislados y combinados, tanto sea para las concentraciones permitidas como de sobrecarga.

El tratamiento de los PMN con MC-LR o con Fe^{2+} produjo un aumento de la producción de ROS, evidenciado por el incremento de la quimioluminiscencia en los neutrófilos (PMN) humanos sin cambios en la viabilidad celular. Los estudios realizados por Suzuki y col. (2006) y por Kujbida y col. (2008) mostraron un aumento de la tasa de supervivencia de los neutrófilos en condiciones inflamatorias. Las citoquinas y los productos bacterianos pueden prolongar la supervivencia de los neutrófilos interfiriendo en el proceso fisiológico de apoptosis (Suzuki col., 2006; Tan y Coussens, 2007; Kujbida y col, 2008). Sin embargo, en este modelo experimental desarrollado *in vitro* no se puede evaluar la prolongación de la supervivencia de los PMN mediado por la producción de citoquinas, procesos que se llevarían a cabo *in vivo*, pero sí se observó que la exposición a estos agentes de contaminación no generó cambios en la viabilidad celular.

Los resultados obtenidos y mostrados en los capítulos 2 a 4 de esta Tesis de Maestría, indican que pudo demostrarse parcialmente la hipótesis de trabajo. La exposición de los PMN a diferentes concentraciones de MC-LR/hepatotoxina genera una situación de estrés y daño oxidativo celular como mecanismos de toxicidad, que involucra la participación de las ROS asociada a la respuesta inflamatoria y la misma también es afectada por la presencia de Fe^{2+} . Tanto la MC-LR como el ión Fe^{2+} en solución acuosa generan daño celular mediante mecanismos oxidativos, sin embargo, la MC-LR genera también toxicidad celular asociada a procesos inflamatorios, generación

de anión superóxido y oxígeno singulete, que se ve agravada por el consumo de GSH intracelular. Sin embargo, la exposición a la mezcla de ambos agonistas no genera un efecto sinérgico activador de procesos inflamatorios y/ oxidativos en los PMN expuestos, con todas las combinaciones de concentraciones permitidas o de sobrecarga (tóxicas) de MC-LR o de Fe^{2+} , como se esperaba.

En cuanto al efecto de MC-LR en PMN, el agonista activa el estallido respiratorio, como también el estrés y daño oxidativo. Se observa que involucra mecanismos independientes de la respuesta inflamatoria mediada por la NOX de la membrana celular de los PMN, con incremento de la oxidación de proteínas y depleción del antioxidante hidrosoluble endógeno más abundante a nivel intracelular, el GSH. Tanto sea con la concentración permitida como con la dosis subaguda. Sin embargo, el Fe^{2+} inhibe el estallido respiratorio y los mecanismos de generación de ROS asociados a la actividad de la NOX, pero, al igual que MC-LR activa el daño oxidativo que se evidencia por el incremento de la quimioluminiscencia espontánea de los PMN expuestos al agonista, la desexcitación de los productos finales de descomposición de lipohidroperóxidos y consumo de GSH. Estos datos indican que el daño oxidativo observado ocurre mediante mecanismos oxidativos asociados a procesos que no involucran al sistema NOX pero que son mediados por el radical hidroxilo y el oxígeno singulete.

La MC-LR aislada aumenta la oxidación de proteínas, medida como contenido de carbonilos y la peroxidación de lípidos, medida como quimioluminiscencia espontánea de los PMN. La generación de daño oxidativo evidenciado por la oxidación de biomoléculas es mayor con la concentración subaguda de MC-LR. El incremento de los indicadores de inflamación y de daño oxidativo se sustentan en que la MC-LR incrementa el ΔO_2 con la consiguiente generación de ROS, principalmente el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno singulete, especie que genera emisión de luz cuando se desexcita al volver a su estado basal (de singulete a triplete). Los experimentos realizados en presencia de cianuro indicarían que la activación del ΔO_2 y la generación de ROS ocurre principalmente a nivel intramitocondrial.

Las condiciones inflamatorias que estimula la MC-LR en PMN se evidencian en forma directa por el incremento del estallido celular respiratorio medido como ΔO_2 de los PMN expuestos a los agonistas, y los procesos oxidativos se entienden por el aumento en la presencia de carbonilos, el incremento de la quimioluminiscencia, la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas. En este caso, es importante tener en

cuenta que la peroxidación lipídica se detecta con un método sensible, como el contador de fotones, pero no se evidencia, en las concentraciones celulares empleadas, con el método de detección de TBARS. Se podría decir, que el mecanismo de lesión oxidativa no implica la peroxidación lipídica de fosfolípidos de membrana con daño oxidativo irreversible, pero puede ser causa de alteraciones de las proteínas de las membranas biológicas y de lípidos de las membranas de organelas intracelulares, y de la apertura del poro de transición de la permeabilidad de la membrana y el colapso del potencial de la membrana mitocondrial (Ding y col., 2000). Estas alteraciones de la membrana mitocondrial podrían explicar la contribución de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial a la medida del ΔO_2 por polarografía y generación de ROS.

La presencia de Fe^{2+} predispone a los PMN al daño y estrés oxidativo por dishomeostasis redox y disminución de la actividad inflamatoria y de la defensa antioxidante celular. El Fe^{2+} inhibe el estallido respiratorio de PMN medido como ΔO_2 en las concentraciones permitidas y tóxicas, pero incrementa el estrés oxidativo con la concentración máxima permitida (30 $\mu g/L$) y tóxica (300 $\mu g/L$), medido como emisión de luz por quimioluminiscencia. La inhibición del consumo de oxígeno, ΔO_2 , de los PMN en presencia de cianuro indica que el Fe^{2+} inhibe el estallido respiratorio medido como ΔO_2 extramitocondrial (mediado por la NOX) y también el intramitocondrial.

Algunos estudios recientes sugieren fuertemente que la formación de ROS y las alteraciones mitocondriales son los dos eventos principales que se encuentran en el cultivo celular de rata tratado con MC-LR (Ding y col., 2003). Además de la lesión celular, las ROS promueven la inflamación mediante la activación del factor de transcripción nuclear NF- κB , que controla la formación de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión en modelos que estudian hepatocitos (Jaeschke, 2000).

Contrariamente a lo esperado, la combinación de las concentraciones permitidas de Fe^{2+} con MC-LR no actúan en forma sinérgica, al contrario, disminuye el efecto tóxico y oxidante de MC-LR en los PMN expuestos. Para el estudio del efecto combinado de MC-LR y Fe^{2+} se expusieron los PMN a ambos agonistas combinados en las distintas concentraciones evaluadas. Si se comparan los biomarcadores medidos en PMN con los tratamientos combinados respecto a los PMN control, el ΔO_2 incrementa, pero si se lo compara con el efecto producido por MC-LR, el ΔO_2 en PMN expuestos a las mezclas de los agonistas es menor al observado para el agonista MC-LR en ambas concentraciones, permitida y subaguda. La combinación de ambos agonistas también disminuye el estrés y daño oxidativo medido por quimioluminiscencia tanto respecto a

los PMN expuestos al Fe^{2+} en concentración máxima permitida y tóxica, como a la MC-LR en concentración permitida o subaguda, e inhibe la oxidación de proteínas que produce la MC-LR en la concentración permitida y subaguda, para llegar a alcanzar los valores de PMN control y de PMN expuestos al Fe^{2+} . En el siguiente esquema (Figura 25) se puede observar la tendencia de los efectos de los distintos contaminantes en PMN expuestos de modo aislado y combinados:

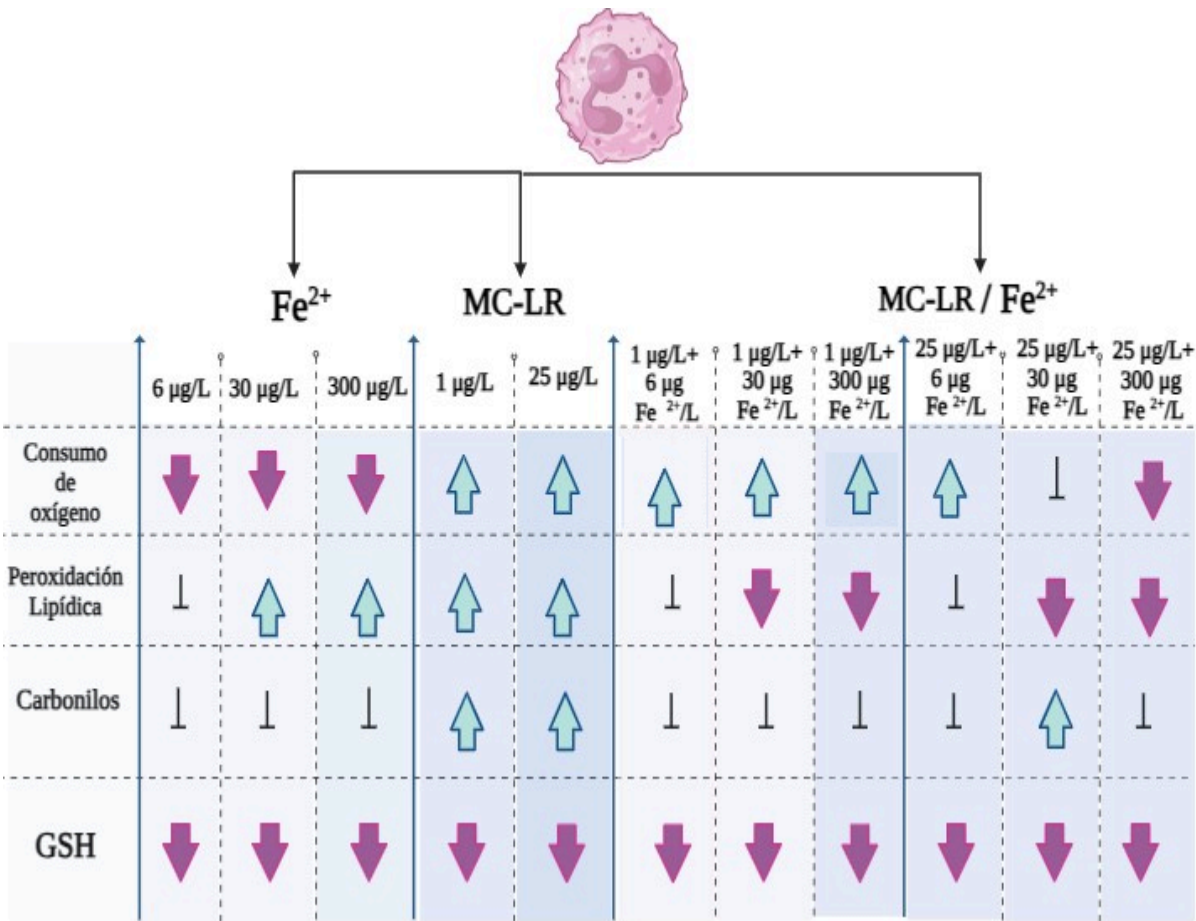


Figura 25. Este esquema compara los resultados promedios de los experimentos contra control. A modo de representación se puede ver la tendencia de los efectos que tuvieron los agentes tóxicos según sus respectivos biomarcadores en comparación a los PMN no expuestos (control). Las flechas verdes, que apuntan hacia arriba, refieren aumento con respecto a control. La flecha roja hacia abajo refiere disminución con respecto al control. El símbolo ⊥ hace referencia a que no existe diferencias con respecto a control.

Todos los tratamientos, tanto con MC-LR como con Fe^{2+} , y la combinación de ambos, en todas las concentraciones evaluadas, inhiben la actividad de la NOX y disminuyen significativamente el contenido intracelular de GSH en PMN con respecto al control (PMN solos, sin tratamiento), predisponiendo a las células al estrés y daño oxidativo. Si bien la exposición de PMN a la combinación de la concentración permitida de Fe^{2+} y permitida de MC-LR genera consumo de GSH con respecto a los PMN control, esta disminución es menor que la que genera la combinación de la concentración permitida de Fe^{2+} y subaguda de MC-LR como también es menor a la que genera las mayores concentraciones de Fe^{2+} o de la MC-LR, como único agonista. Sin embargo, los PMN expuestos a cada agonista o mezcla de ambos están casi completamente depletados de GSH intracelular. Vinculado a esta observación es necesario tener en cuenta que MC-LR puede formar un conjugado MC-LR-GSH como un proceso de desintoxicación (Pflugmacher y col., 1998). La conjugación de GSH con MC-LR intentaría neutralizar la toxicidad de este agonista, sin embargo, la disminución de este potente antioxidante dejaría a los tejidos aún más susceptibles al daño oxidativo (Ding y Ong, 2003; Gehringer y col., 2004).



6. Conclusiones

Durante el desarrollo de la tesis se pudo confirmar parcialmente la hipótesis planteada. Por un lado, con los resultados obtenidos, se puede concluir que la toxicidad de la MC-LR estaría asociada a procesos inflamatorios. Los PMN como respuesta al agonista de contaminación, actúa mediante mecanismos que no involucran la NOX, aunque sí se activan procesos oxidativos, mayor aún en el rango de concentraciones permitidas. Probablemente estaría involucrada la actividad mitocondrial en el rango de concentraciones permitidas. Este hecho sugiere que el estrés oxidativo está presente en los mecanismos de toxicidad, con oxidación de proteínas, inactivación de NOX y disminución de la protección antioxidante. Sin embargo, el Fe^{2+} no activa el sistema NOX y el estallido respiratorio de los PMN en el rango de las concentraciones permitidas en agua, pero genera estrés oxidativo cuando se los expone a concentraciones máxima o mayores a las permitidas, relacionado con la oxidación de lípidos, generación de ROS ($^1\text{O}_2$), oxidación de proteínas y consumo de GSH.

Por otro lado, si bien el efecto de la combinación de ambos agentes contaminantes es también tóxico, no es más tóxico que el efecto que genera cada uno como único agonista. Estos resultados han permitido concluir que los niveles permitidos de MC-LR y Fe^{2+} en aguas de consumo y recreativas no serían inocuos para la salud humana. En el rango de concentraciones permitidas la interacción entre ambos agonistas podría considerarse menos desfavorable, ya que se observa disminución de la quimioluminiscencia espontánea, con una disminución de la generación de ROS (principalmente oxígeno singulete) respecto a ambos agonistas y una disminución de la oxidación de proteínas con todas las combinaciones respecto al efecto de MC-LR y a la concentración tóxica de Fe^{2+} . La combinación de MC-LR y Fe^{2+} , en concentraciones permitidas, disminuye el efecto tóxico y oxidante de MC-LR.

Los resultados obtenidos son de gran relevancia ya que la exposición a dosis permitidas de MC-LR o de Fe^{2+} en aguas de consumo y recreativas afectaría la homeostasis redox intracelular de PMN, exponiendo a estas células, primera línea de defensa de un organismo a las infecciones, a un entorno tóxico y oxidativo que afecta su respuesta.

Por último, se considera que a partir de los resultados del modelo *in vitro* deberían evaluarse los efectos *in vivo*, debido a que los resultados de esta Tesis mostraron efectos tóxicos asociados con la respuesta inflamatoria y el daño oxidativo, con disminución de la función de defensa de los PMN y de su protección antioxidante.



7. Referencias bibliográficas

- Adan, A., Kiraz, Y., Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol*, 17(14):1213-1221. doi: 10.2174/1389201017666160808160513.
- Aguilera, A., Echenique, R. (2017). Cyanobacterias nocivas en ambientes acuáticos continentales: Taxonomía ecológica. En: *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Serie: Temas de salud 5*, (Giannuzzi L, Petcheneshkyt T, Hansen M, eds.). Cap. 2. 15-26. Buenos Aires.
- Akerboom, T.P., Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*, 77:373-82.
- Allan, C., Watts, R. (2018). Revealing Adaptive Management of Environmental Flows. *Environmental Management*, 61:520–533 DOI 10.1007/s00267-017-0931-3.
- Andrinolo, D., Sedan, D., Telese, L., Aura, C., Masera, S., Giannuzzi, L., Marra, C., Alaniz, M. (2008). Hepatic recovery after damage produced by subchronic intoxication with the cyanotoxin microcystin LR. *Toxicon*, 51:457-467. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.11.012.
- Arman, T., Clarke, J.D. (2021). Microcystin Toxicokinetics, Molecular Toxicology, and Pathophysiology in Preclinical Rodent Models and Humans. *Toxins (Basel)*, 13(8):537. doi: 10.3390/toxins13080537.
- Arruda, M. A., Barja-Fidalgo, C. (2009). NADPH oxidase activity: In the crossroad of neutrophil life and death. *Frontiers in Bioscience*, 14:4546-4556.
- Avila Vázquez, M. (2019). Cianotoxinas en aguas de consumo humano. *Red Universitaria de Ambiente y Salud/Médicos de Pueblos Fumigados*. Página web: <https://reduas.com.ar/cianotoxinas-en-aguas-de-consumo-humano/>
- Babior, BM. (1992). The respiratory burst oxidase. *Advances in Enzymology*, 65:49.
- Backer, L.C. (2008). Exposición recreativa a bajas concentraciones de microcistinas durante una floración de algas en un lago pequeño. *Drogas*, 6:389–406.
- Bagg, A., Neilands, J. B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon. *Escherichia coli. Biochemistry*, 26:5471–5477.

- Bauzá, L., Leda Giannuzzi, L. (2017). Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Métodos de control del desarrollo de floraciones cianobacterianas en ambientes acuáticos. Revisión actualizada. Cáp. 8, Pág: 125.
- Bearden, S. W., Perry, R. D. (1999). The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol Microbiol*, 32:403–414.
- Bedard, K., Krause, K. (2007). The NOX family of ROS-Generating NADPH Oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87:245–313; doi: 10.1152/physrev.00044.2005.
- Begum, R., Thota, S., Abdulkadir, A., Kaur, G., Bagam, P., Batra, S. (2022). Proteínas de la familia de la NADPH oxidasa: dinámica de señalización para el manejo de enfermedades. *Cell Mol Immunol*, 19(6): 660–686. doi: 10.1038/s41423-022-00858-1
- Bieczynski, F., Torres, W., Paineofilua, J., Castroa, J., Bianchi, V., Frontera, J., Paz, D., González, C., Martín, A., Villanueva, S., Luquet, C. (2016). Alterations in the intestine of Patagonian silverside (*Odontesthes hatcheri*) exposed to microcystin-LR: Changes in the glycosylation pattern of the intestinal wall and inhibition of multidrug resistance proteins efflux activity. *Aquatic Toxicol*, 178:106-117. doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.016.
- Björkman, U., Ekholm, R. (1995). Hydrogen peroxide degradation and glutathione peroxidase activity in cultures of thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol*, 111(1): 99-107.
- Bonda, D.J., Lee, H.G., Blair, J.A, Zhu, X., Perry, G., Smith, M.A. (2011). Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Metallomics*, 3: 267-270.
- Boveris, A., Cadenas, E., Reiter, R., Filipowsky, M., Nakase, Y., Chance, B. (1980). Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reactions. *Proc Natl Acad Sci*, 77:347-351. doi: 10.1073/pnas.77.1.347.
- Boveris, A., Llesuy, S.F., Fraga, G. (1985). Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. *J Free Radic Biol Med*, 1(2):131-8. doi: 10.1016/0748-5514(85)90017-0.

- Boveris, A., Repetto, M., Bustamante, J., Bovers, A., Valdez, L. (2008). The concept of oxidative stress in pathology. In: Free Radical Pathophysiology (Alvarez S., Evelson P., Boveris A., eds), Research Signpost, Kerala, India, pp. 1-17.
- Boveris, A., Repetto, M.G. (2020). Iron and copper mitochondrial toxicities in rat brain. En: "Brain mitochondria: distribution and function" (Lores Arnaiz S, Bustamante J, eds), Nova Science Publishers, NY, USA. p. 83- 105. ISBN: 978-1-53616-650-7.
- Brennan, R. G., Weaver, L.H., Matthews, B.W. (1986). Use of protein sequence and structure to infer distant evolutionary relationships. *Chem. Scripta*, 26B:251–255.
- Brock, J.H. (1989). The biology of iron. In: Iron in Immunity, Cancer and Inflammation (de Sousa, M. and Brock, J.H., Eds.), pp. 35-54. Wiley, Chichester.
- Bu, Y. Z., Li, X. Y., Zhang, B. J., Chung, I. K., Lee, J. A. (2006). Microcystins cause embryonic toxicity in mice. *Toxicon*, 48(8):966- 972.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., Griffiths, E. (1978). Role of iron in bacterial infections. *Curr Top Microbiol Immunol*, 80:1–35.21.
- Cadenas, E., Giulivi, C., Ursini, F., et al. (1994). Electronically-excited state formation during lipid peroxidation. *Methods Toxicol*, 1B:384-399.
- Camaschella, C. (2005). Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood*, 106 (12):3710-3717.
- Carmichael, W. (2001). Health effects of toxin-producing cyanobacteria: The CyanoHABs. *Human and ecological risk assessment: An International Journal*, 7(5):1393-1407.
- Carreras, M.C., Riobó, N.A., Pargament, G.A., Boveris, A., Poderoso, J.J. (1997). Effects of respiratory burst inhibitors on nitric oxide production by human neutrophils. *Free Radical Research*, 26: 325-334
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59:527-605.
- Chanock, S. J., el Benna, J., Smith, R.M., Babior, B.M. (1994). The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem*, 269:24519-24522.

- Chorus, I., Bartram, J. (1999). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Great Britain: St. Edmundsbury Press, Bury St Edmunds, Suffolk. ISBN: ISBN 0-419-23930-8.
- Chorus, I., Welker, M. (2021). Toxic Cyanobacteria in Water (2nd ed.). CRC Press. Retrieved from <https://www.perlego.com/book/2096451/toxic-cyanobacteria-in-water-a-guide-to-their-public-health-consequences-monitoring-and-management-pdf>.
- Codd, G., Bell, S., Kaya, K., Ward, C., Beattie, K., Metcalf, J., Codd, G.A., Campana, S.G., Ward, C.J., Beattie, K.A., et al. (1999). Toxinas cianobacterianas, vías de exposición y salud humana. *Eur J Phycol*, 34:405–415.
- Crichton, R. R. (1991). Inorganic biochemistry of iron metabolism. Ellis Horwood, New York, N.Y.
- Crosa, J. H. (1997). Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol*, 61:319–336.
- Dean, R., Fu, S., Stocker R., Davies E.M. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 324:1-18.
- De Luca, S. J., Pegorer, M. G., De Luca, M.A. (2010). Oxidação de microcistinas- LR em águas pelo íon ferrato (VI). *Eng Sanit Ambient*, 15(1):5-10.
- De Visser, K., Eichten, A., Coussens, Lisa M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Publishing Group*, 6, doi:10.1038/nrc1782.
- Dev, S., Babitt, J.L. (2017). Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*, 1: S6-S20.
- Diez-Quijada, L., Benítez-González, M.d.M., Puerto, M., Jos, A., Cameán, A.M. (2021). Immunotoxic Effects Induced by Microcystins and Cylindrospermopsin: A Review. *Toxins*, 13: 711. <https://doi.org/10.3390/toxins13100711>
- Diez-Quijada, L., Hinton, D.M. (2000). US FDA "Redbook II" Immunotoxicity Testing Guidelines and Research in Immunotoxicity Evaluations of Food Chemicals and New Food Proteins (Directrices para pruebas de inmunotoxicidad "Redbook II" de la FDA de EE. UU. *Toxicol Pathol*, 28:467–478.

- Diez-Quijada, L., Sierosławska, A. (2010). Efectos inmunotóxicos, genotóxicos y cancerígenos de las cianotoxinas. *Centr Eur J Immunol*, 3:105–110.
- Ding, W., Shen, H.M., Ong, C.N. (2000). Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin induced rapid apoptosis in rat hepatocytes, *Hepatology*, 3: 547–555.
- Ding, W., Ong, C. (2003). Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol Lett*, 220:1–7.
- Enghag, P. (2008). Encyclopedia of the Elements. Technical Data, History, Processing, Applications, pp. 190–191.
- Escolar, L., Pérez-Martin, J., de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol*, 181:6223-6229.
- Falcone, I. R. (1999). An Overview of problems caused by toxic blue–green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Enviromental Toxicology*, 14(1):5-12.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199902\)14:1<5::AID-TOX3>3.0.CO;2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<5::AID-TOX3>3.0.CO;2)
- Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS letters*, 476: 52-54; doi: 10.1016/s0014-5793(00)01669-0.
- Franklin, R.B., Costello, L.C. (2009). The Important Role of the Apoptotic Effects of Zinc in the Development of Cancers. *J Cell Biochemistry*, 106(5):750–757. doi: 10.1002/jcb.22049.
- Gaetani, G.F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A.M., Kirkman, H.N. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73(1):334-339.
- Galaris, D., Pantopoulos, K. (2008). Oxidative Stress and Iron Homeostasis: Mechanistic and Health Aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 45(1):1-23 doi: 10.1080/10408360701713104.
- Gehring, M.M., Shepard, E.G., Downing, T.G., Wiegand, C., Neilan, B.A. (2004). An investigation into the detoxification of MC-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 931–941.

- Geiszt, M. (2006). NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res*, 71(2):289-99. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.05.004.
- Gerschman, R., Gilbert, D., Nye, S.W. et al. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119:623-626.
- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., Andrinolo, D. (2011). An acute case of intoxication with Cyanobacteria and Cyanotoxins in recreational water in Salto Grande dam, Argentina. *Marine Drugs*, 9:2164-2175; doi: 10.3390/md9112164.
- Giannuzzi, L., Ortega, F., Ventozi, E. (2018). Toxicología general y aplicada / Leda Giannuzzi. Coordinación general de Leda Giannuzzi. - 1a ed . - La Plata : Universidad Nacional de La Plata; La Plata. EDULP. Libro digital, PDF - (Libros de cátedra).
- Gonzalez Flecha, B., Cutrin, J.C., Boveris, A. (1993). Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to *in vivo* ischemia-reperfusion. *J Clin Invest*, 91:456-464.
- Greer, B., Maul, R., Campbell, K., Elliott, C.T. (2017). Detección de cianotoxinas de agua dulce y medición de microcistinas enmascaradas en tilapia de granjas acuícolas del sudeste asiático. *Anal Bioanal Chem*, 409:4057–406.
- Halliwell, B., Gutteridge, J M. C. (1989). Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. Free Radic Biol Med. Clarendon Press: Oxford, pp 188-276. doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.003.0005.
- Huang, I-Shuo., Zimba, P.V. (2019). Metabolitos bioactivos de cianobacterias: una revisión de su química y biología. *Algas nocivas*, 83:42-94. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.11.008>
- Ito, E., Kondo, F., Harada, K. (2000). First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunos-taining meted. *Toxicon*, 38:37–48.
- Jaeschke, H. (2000). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury, J. *Gastroenterol. Hepatol*. 15: 718–724.

- Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological sciences*, 65:166–176.
- Jones, D.P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signa.*, 8:1865–1879.
- Jones D.P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295:849-868.
- Kamata, H., Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signaling. *Cell Signal*, 11:1-14.
- Kemp, M., Go, Y., Jones, D.P. (2008). Non equilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox system biology. *Free Radic Biol Med*, 44:921-937.
- Kozlowski, H., Janck-Klos, A., Brasun, J., Gaggelli, E., et al. (2009). Copper, iron, and Zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coord Chem Rev*, 253:2665-2685.
- Kujbida, P., Hatanaka, E., Campa, A., Colepicolo, P., Pinto, E. (2006). Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(1):273-277.
- Kujbida P., Hatanaka, E., Campa, A., Curi, R., Poliselli Farsky, S. E., Pinto, E. (2008). *Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR. Toxicon*, 51:1274– 1280.
- Lairion, F., Saporito Magriñá, C., Cimato, A., Martinez Sarrasague, M., Repetto, M. (2022). Aplicación del concepto de hormesis en la enseñanza de la química de los metales de transición. En: Educación en la Química. ENDELAQ. Eje temático: La interdisciplinariedad como estrategia para la educación en química. (Lorenzo M.G., Lastres Flores L. ed.), Asociación de Educadores en la Química de la República Argentina (ADEQRA), Buenos Aires. 28 (1):16-27,
- Lalucque, H., Silar, P. (2003). NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends Microbiol*, 11:9-12.
- Lankoff, A., Carmichael, W.W., Grasman, K.A., Yuan, M. (2004). The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes in vitro. *Toxicology*, 204:23–40.

- Lardy, B., Bof, M., Aubry, L., Paclet, H. M., Morel, F., Satre M. and Klein, KG. (2005). NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta*, 1744:199-212.
- Lawton, L., Marsalek, B., Padisak, J., Chorus I. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management, vol. 1. Edited by Chorus I. New York: E and FN Spon.
- Leutner, S., Schindownski, K., Frolich, L., et al. (2005). Enhanced ROS-generation in lymphocytes of Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry*, 38:312-315.
- Levine, R.L., D., Garland, Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186:464-78. doi: 10.1016/0076-6879(90)86141-h.
- Li, Y., Zhu, H., Kuppusamy, P., Roubaud, V., Zweier, J.L., Trush, M.A. (1998). Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem*, 273 (4): 2015–2023. doi: 10.1074/jbc.273.4.2015.
- Litwin, M., Calderwood, S.B. (1993). Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol*, 6:137–149.
- Lowry, OH., Rosebrough, N.G., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275.
- McCarty, C.L., Nelson, L., Eitnien, S., Zgodzinski, E., Zabala, A., Billing, L., Diorio, M. (2016). Informe semanal de morbilidad y mortalidad Evaluación de las necesidades de la comunidad después de la contaminación por toxina de microcistina de un suministro de agua municipal, condado de Lucas, Ohio, septiembre de 2014. *Mórbido Mortal Semana Rep*, 65:925–929.
- McCord, J.M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244:6049-6055.

- McCord, J.M., Keele, B.B. Jr, Fridovich, I. (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68:1024-1027.
- Mankiewicz-Boczek, J., Tarczyska, M., Fladmark, K.E., Doskeland, S.O., Walter, Z., Zalewski, M. (2001). Efecto apoptótico del extracto de cianobacterias en hepatocitos de rata y linfocitos humanos. Medio ambiente. *Toxicol*, 16:225–233..
- Mankiewicz-Boczek, J., Palus, J., Gagala, I., Izydorczyk, K., Jurczak, T., Dziubałtowska, E., Stepnik, M., Arkusz, J., Komorowska, M., Skowron, A., et al. (2011). Effects of microcystins-containing cyanobacteria from a temperate ecosystem on human lymphocytes culture and their potential for adverse human health effects. *Harmful Algae*, 10:356–365.
- Mann, P.J.G., Quastel, J.H. (1946). Toxic effects of oxygen and of hydrogen peroxide on brain metabolism. *Biochem J*, 40:139–144.
- Massey, I.Y., Yang, F., Ding, Z., Yang, S., Guo, J., Tezi, C., Al-Osman, M., Kamegni, R.B., Zeng, W. (2018). Rutas de exposición y efectos en la salud de las microcistinas en animales y humanos: una mini-revisión. *Toxicon*, 151:156–162.
- Michaelis, L. (1946). Fundamentals of oxidation and respiration. *Am Sci*, 34:573-596.
- Miller, M.A.; Kudela, R.M.; Mekebri, A.; Grúa, D.; Oates, S.C.; Tinker, M.T.; Staedler, M.; Miller, W.A.; Toy-Choutka, S.; Dominik, C.; et al. (2010). Evidencia de una nueva floración de algas marinas nocivas: transferencia de cianotoxinas (microcistina) de nutrias terrestres a marinas. *PLoS ONE*, 5:e12576.
- Ministerio de Salud. (2022). *Salud advierte por la presencia de cianobacterias en aguas recreativas de Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos y Córdoba*. Página web: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/salud-advierde-por-la-presencia-de-cianobacterias-en-aguas-recreativas-de-buenos-aires>
- Moreno, I. M. (2002). Microcistinas: presencia, determinación y estudios. España: Universidad de Sevilla.
- Moreno, I., Repetto, G., Carneán, A. (2003). Interés toxicológico de las microcistinas. *Revista de Toxicología*, 20(3):159-165.

- Moreno, I., Pichardo, S., Josa, A., Gómez-Amores, L., Mate, A., Vázquez, C.M., Cameán A.M. (2005). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicon*, 45: 395-402; doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.11.001.
- Musacco Sebio, R. N. (2016). Daño oxidativo y respuesta antioxidante en la toxicidad del hierro, cobre y material particulado. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
- Neilan, B., Pearson, L., Muenchhoff, J., Moffitt, M., Dittmann, E. (2012). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x.
- Neilands, J.B. (1981). Microbial iron compounds. *Ann Rev Biochem*, 50:715-731.
- Neilands, J. B. (1989). Siderophore systems of bacteria and fungi, p. 141–163. En: T. J. Beveridge and R. J. Doyle (ed.), *Metal ions and bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y
- OMS. (1998). Capítulo 7: Algas y cianobacterias en aguas recreativas. Volumen 1: Aguas costeras y aguas dulces. Ginebra: World Health Organisation.
- OMS. (2003). Guidelines for safe recreational water environments. Volumen 1: Coastal and fresh waters. Geneva: World Health Organization.
- OMS (2006). Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud (WHO/SDE/WSH/03.04/17).
- OMS (2018). Drinking-water. World Health Organization fact sheets, <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>, Accessed 27 Dec 2018.
- Palmer, L.D., Skaar, E.P. (2016). Transition Metals and Virulence in Bacteria. *Annu Rev Genet*, 50:67–91. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035146.
- Pearson, L., Neila, B. (2008). The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr Opin Biotechnol*, 19(3):281-288. doi:19:281-288; doi: 10.1016/j.copbio.2008.03.002.

- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B. (2010). On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Marine Drugs*, 8:1650-1680. doi:10.3390/md8051650.
- Pengxu, L., Bai, T., Yuling, S. (2019). Mechanisms of ferroptosis and relations with regulated cell death: and review. *Frontiers in Physiology*, 10:| <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00139>.
- Pérez, D.S., Soraci, A.L., Tapia, M.O. (2008). Cianobacterias y cianotoxinas: rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua. *Analecta Veterinaria*, 28(1):48-56.
- Pérez-Vázquez, M., García-Velasco, J., Orozco-Medina, M., Contreras-Rodriguez, S. (2018). Determinación de microcistinas LR y RR en agua del Lago de Chapala y su potencial efecto a la salud. *Revista de Ciencias de la Salud*, 5:12-20.
- Pflugmacher, S., Sandermann, H. (1998). Cytochrome P450 Monooxygenases for Fatty Acids and Xenobiotics in Marine Macroalgae. *Plant Physiol*, 117(1):123–128. doi: 10.1104/pp.117.1.123.
- Porter, J.B. Garbowski, M. (2014). La fisiopatología de la sobrecarga de hierro transfusional. *Hematol Oncol Clin North Am*, 28:683-701.
- Poste, A.E., Hecky, R.E., Guildford, S.J. (2011). Evaluating microcystin exposure risk through fish consumption. *Environ Sci Technol*, 45:5806–5811.
- Rastogi, R.P., Sinha, R.P., Incharoensakdi, A. (2014). Las cianotoxinas-microcistinas: Panorama actual. *Environ Sci Biotechnol*, 13:215–249.
- Repetto, M. (2008). Clinical use of chemiluminescence assays for the determination of systemic oxidative stress. En: *Handbook of chemiluminescent methods in oxidative stress assessment*. (Popov I, Lewin G, eds.). Transworld Research Network, Kerala, India. 9:163-194 ISBN: 978-81-7895-334-2.
- Repetto M. G., Ferrarotti, N. F., Boveris, A. (2010). The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Arch Toxicol*, 84(4):255-62. doi: 10.1007/s00204-009-0487.

- Repetto, M., Boveris, A. (2012). Transition metals: bioinorganic and redox reactions in biological systems. En: *Transition Metals: characteristics, properties and uses* (Mishra A, ed), Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, NY, p. 349-370 (2012) ISBN: 978-1-61324-559-0.
- Repetto, M., Semprine, J., Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanisms, biological implications and analytical determinations. En: *"Lipid Peroxidation"*. (Catala A, ed) Intech, open science-open minds. 1:3-30. <http://dx.doi.org/10.5772/45943>. ISBN 980-953-307-143-0.
- Repetto, M.G., Boveris, A. (2016). Systemic Oxidative Stress in patients with neurodegenerative diseases. En: *"Biochemistry of oxidative stress. Physiopathology and clinical aspects"* (R.J. Gelpi, A. Boveris y J.J. Poderoso, eds.) de la serie "Advances in Biochemistry in Health and Disease" (N.S. Dhalla, ed.), Springer, Suiza, p. 345-358. ISBN 978-3-319-45864-9.
- Reznick, A., Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol*, 233:357-363. doi: 10.1016/s0076-6879(94)33041-7.
- Rohrlack, T., Dittmann, E., Rner, T.B., Christoffersen, K. (2001). Efectos de las microcistinas unidas a células en la supervivencia y alimentación de *Daphnia* spp. *Appl Environ Microbiol*, 67: 3523–3529.
- Rosso, L., Giannuzzi, L. (2017). Factores ambientales y antropogénicos que afectan la formación de floraciones de cianobacterias y cianotoxinas. En: *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud*, 5:79.
- Ruiz, M., Rodríguez, M.I., Ruibal, A. L., Centineo, E., Alasia, V., Lerda, D., Aguilera, S. (2008). Estudio del impacto en la salud de una población expuesta al uso de agua con cianobacterias. *Instituto Nacional del Agua*. IV Congreso Argentino de Limnología.
- Ruiz, M., Rodríguez, M. I., Ruibal, A. L., Gonzalez, I., Pellicioni, P., Biagi, M., & Lerda, D. (2010). Efectos en la salud por exposición al agua con microcistinas. III Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua. Córdoba, Argentina: *Instituto Nacional del Agua*.

- Saporito-Magriñá, C., Lairion, F., Musacco-Sebio, R., Fuda, J., Torti, H., Repetto, M.G. (2022). Biochemical regulatory processes in the control of oxidants and antioxidants production in the brain of rats with iron and copper chronic overloads. *J Biol Inorg Chem*, 27(7):665-677. doi: 10.1007/s00775-022-01960-5.
- Sedan, D., Andrinolo, D., Telese, L., Giannuzzi, L., Alaniz, M., Marra, C. (2010). Alteration and recovery of the antioxidant system induced by subchronic exposure to microcystin-LR in mice: its relation to liver lipid composition. *Toxicon*, 55:333-342. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.08.008.
- Sedan, D., Laguens, M., Copparoni, g., Aranda, J., Giannuzzi, L., Marra, C., Andrinolo, D. (2015). Hepatic and intestine alterations in mice after prolonged exposure to low oral doses of Microcystin-LR. *Toxicon*, 104:26-33. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.07.011.
- Sedan, D., Andrinolo, D. (2017). Cianobacterias y Cianotoxinas. Efectos en la salud humana. Casos informados y primeros acercamientos al estudio epidemiológico. En Aguilera, A., Amé, M. V., Andrinolo, D., Bauzá, L., Benítez, R., Crettaz Minaglia, M., De Titto, E., Wunderlin, D. “*Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud*”, Cáp 4, Pág: 67-68. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Seim, S. (1982). Production of reactive oxygen species and chemiluminescence by human monocytes during differentiation and lymphokine activation in vitro. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C*, 90:179-185.
- Sicińska, P., Bukowska, B., Michałowicz, J., Duda, W. (2006). Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. *Toxicon*, 47:387–397.
- Sies, H. (1985) Introductory remarks. In: Oxidative stress (Sies H, ed), Academic Press, London.
- Sies, H. (1991a). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91:31-38.
- Sies, H. (1991b). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr*, 69:965–968. <https://doi.org/10.1007/BF01645140>.

- Sies, H., Jones, D.P. (2007). En: Encyclopedia of Stress (Fink G., ed. 2nd ed.) Elsevier: Amsterdam. pp. 45-48.
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*, 11:613–19. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035.
- Sies, H. (2020). Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants (Basel)*, 9(9): 852. doi: 10.3390/antiox9090852.
- Sies, H. (2021). Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol*, 41: 101867. doi: 10.1016/j.redox.2021.101867.
- Smith, J.L., Haney, J.F. (2006). Transferencia, acumulación y depuración de microcistinas, una toxina cianobacteriana, en el pez luna de semilla de calabaza (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon*, 48:580–589.
- Steffen, W., Grinevald, J., Crutzen, P., McNeill, J. (2011). The Anthropocene: conceptual and historical perspectives. *Philos Trans R Soc Lond A*, 369:842–867. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0327>.
- Stewart, I. (2006). Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria: a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 5:6. doi:10.1186/1476-069X-5-6.
- Suzuki, R., Iwase, M., Miyaoka, K., Kondo, G., Watanabe, H., Ohashi, M., Nagumo, M. (2006). Modulation of neutrophil apoptosis in plasma of patients after orthognathic surgery. *J Surg Res*, 130:110–118.
- Svirčev, Z., Lalić, D., Bojadžija Savić, G. et al. (2019). Panorama geográfico e histórico mundial de la distribución de cianotoxinas y las intoxicaciones por cianobacterias. *Arch Toxicol*, 93:2429–2481. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>
- Tan, T.T., Coussens, L.M. (2007). Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr Opin Immunol*, 19, 209–216.

- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H.D., Chen, G.C., Chen, G., Yu, S.Z. (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17:1317–1321.
- UNESCO. (2009). Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Sylvia Bonilla (editora). Documento Técnico PHI-LAC, N° 16
- US EPA. (2006). Toxicological Reviews of Cyanobacterial Toxins: Microcystins LR, RR, YR and LA (External Review Draft). US Environmental Protection Agency, Washington, DC EPA/600/R-06/139.
- US EPA. (2015). Health Effects Support Document for the Cyanobacterial Toxin Microcystins. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA-820R15102.
- Ushio-Fukai, M., Nakamura, Y. (2008). Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett*, 266(1):37-52. doi: 0.1016/j.canlet.2008.02.044.
- Valdez, L., Boveris, A. (2001). Nitric oxide and superoxide radical production by human mononuclear leukocytes. *Antioxidant Redox Signaling*, 3:505-513. doi: 10.1089/15230860152409130.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T.D. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10):1161-1208.
- Vidal, F., Sedan, D., D’Agostino, D., Cavalieri, M. L., Mullen, E., Parot Varela, M. M., Flores, C., Josep Caixach, Andrinolo, D. (2017). Recreational Exposure during Algal Bloom in Carrasco Beach, Uruguay: A Liver Failure Case Report. *Toxins*, 9(9): 267. <https://doi.org/10.3390/toxins9090267>.
- Wackett, L.P., Orme-Johnson, W.H., Walsh, C.T. (1989). Transition metal enzymes in bacterial metabolism. En T. J. Beveridge and R. J. Doyle (Ed.), *Metal ions and bacteria* (165–206). John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Weinberg, E.D. (1978). Iron and infection. *Microbiol Rev*, 42:45–66.

- Winterbourn, C.C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 82–83:969-974. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X)
- Wooldridge, K.G., Williams, P. (1993). Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 12:325–348.
- World Health Organization, (2002). World Health Report 2002. <http://www.who.int/whr/2002/>.
- Xiang, L., Li, Y.W., Liu, B.L., Zhao, H.M., Li, H., Cai, Q.Y., Mo, C.H., Wong, M.H., Li, Q.X. (2019). Altos riesgos ecológicos y para la salud humana de las microcistinas en los campos de hortalizas en el sur de China. *Medio Ambiente Int*, 133:105142.
- Xiang, L., Li, Y.W., Wang, Z.R., Liu, B.L., Zhao, S.M., Li, H., Cai, Q.Y., Mo, C.H., Li, Q.X. (2020). Bioacumulación y fitotoxicidad y riesgo para la salud humana de la microcistina-LR bajo varios tratamientos: un estudio en macetas. *Toxinas*, 12: 523.
- Yagi, K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine*, 15(2):212-216. doi: 10.1016/0006-2944(76)90049-1.
- Yagi, K. (1998). Simple Procedure for Specific Assay of Lipid Hydroperoxides in Serum or Plasm. En: *Methods in Molecular Biology*. 108: v-viii. Rev: *Free radical and antioxidant protocols. Introduction*. Ed. Armstrong D. pp. 101-106.
- Zegura, B., Straser, A., Filipič, M. (2011). Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins. *Mutant Research*, 727:16-4. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.01.002.
- Zeng, M., Miralda, I., Armstrong, C., Uriarte, S., Bagaitkar, J. (2019). The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Molecular Oral Microbiology*, <https://doi.org/10.1111/omi.12252>.
- Zhang, X.D., Liu, Z.Y., Wang, M.S., Guo, Y.X., Wang, X.K., Luo, K., Huang, S., Li, R.F. (2023). *Front Immunol*, 14:1269451. doi: 10.3389/fimmu.2023.1269451. eCollection 2023.

- Zhao, Y., Xie, P., Zhang, X. (2009). Oxidative stress response after prolonged exposure of domestic rabbit to a lower dosage of extracted microcystins. *Environ Toxicol Pharmacol*, 27:195–199.
- Zhong, S., Liu, Y., Wang, F., Wu, Z, Zhao, S. (2020). Microcystin-LR induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis in alveolar type II epithelial cells of ICR mice in vitro. *Toxicon*, 174:19-25.
- Zurlo, J. (2012). Ensayos de toxicidad in vitro. En Jeanne Mager Stellman (Ed.), Madrid: Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Organización Internacional del Trabajo - OIT

8. Glosario de palabras:

1. **Ácido tiobarbitúrico:** compuesto orgánico y heterociclo que se emplea para determinar las especies reactivas derivadas de la peroxidación de lípidos (también se reconocen otras especies como malondialdehído, 4-HO-nonenal y otros aldehídos de bajo peso molecular).
2. **Autofagia:** vía catabólica específica que mantiene la homeostasis celular y tisular. Es un proceso que permite a las células deshacerse de los productos celulares nocivos que, de otro modo, se acumularían causando daño celular.
3. **Bioacumulación:** acumulación de un contaminante en un organismo desde cualquier fuente de exposición incluyendo aire, agua y alimento. Distinto del término bioconcentración, más restringido, que proviene de la toxicología acuática y hace alusión a la acumulación sólo desde el medio (ej. agua).
4. **Bioensayos:** cualquier experimento en el que se usan seres vivos como objeto de estudio para medir la potencia de un estímulo.
5. **Biomagnificación:** incremento de la concentración de un contaminante de un nivel trófico a otro (entre predadores y presas).
6. **Biomarcador:** molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, de una afección o de una enfermedad. Un biomarcador se utiliza a veces para determinar la respuesta del cuerpo a un tratamiento para una enfermedad o afección.
7. **Cadena mitocondrial de transporte de electrones:** complejos proteicos con grupos prostéticos capaces de aceptar y/o ceder 1 ó 2 electrones. Ordenados en serie, en su mayoría en la membrana interna de la mitocondria. Cada componente en serie acepta electrones del transportador precedente y se los transfiere al siguiente en una secuencia específica.
8. **Carbonilos:** son proteínas con un grupo funcional en el que un átomo de carbono se une con un enlace doble a un átomo de oxígeno. Es una especie indicadora del daño oxidativo celular.
9. **Caspasas:** familia de proteasas de cisteína que se combinan en diferentes vías y cuya activación sigue a estímulos apoptóticos característicos. El flujo de información está mediado por modificaciones postraduccionales específicas a través del reconocimiento de proteínas endógenas.

- 10. Célula diana:** término aplicado en endocrinología a la célula que presenta un receptor específico que se une a su hormona circulante, desencadenando o no una respuesta bioquímica o fisiológica.
- 11. Ciclooxygenasa:** primera enzima de un complejo de enzimas microsómicas de distribución muy amplia que sintetiza prostaglandinas. Existen dos isoformas de la enzima que son reconocidas por sus iniciales COX-1, COX-2.
- 12. Citocromos:** Hemo proteína localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria donde cataliza la transferencia de electrones entre los complejos.
- 13. Consumo de oxígeno celular:** oxígeno consumido en el metabolismo y durante la respiración celular.
- 14. Daño oxidativo:** desequilibrio entre la tasa fisiológica de producción de oxidantes y la velocidad del sistema de defensa antioxidante que ocasiona un daño celular irreversible.
- 15. Determinaciones espectrofotométricas:** determinaciones y técnicas analíticas utilizadas para medir cuánta luz absorbe una sustancia química, a partir de la medición de la intensidad de luz cuando un haz luminoso pasa a través de la solución muestra, con base en la ley de Beer-Lambert. Esta medición también puede usarse para medir la cantidad de un producto químico conocido en una sustancia. La ley de Beer-Lambert trata sobre la iluminancia de una superficie situada a una cierta distancia de una fuente de luz.
- 16. Ecosistema eutrofizado:** característica que toma un ecosistema acuático por el aporte excesivo de nutrientes inorgánicos, principalmente Nitrógeno (N) y Fósforo (P). El ingreso de N y P a los arroyos generan niveles de eutrofización que promueven el crecimiento de cianobacterias y fitoplancton.
- 17. Electrodo de oxígeno:** sensor electroquímico de oxígeno utilizado para la determinación del contenido oxígeno disuelto en gran variedad de medios acuosos.
- 18. Enzimas fosfatasas PP1 y PP2A:** enzimas que catalizan la eliminación de un grupo fosfato en algún residuo de aminoácido, principalmente de serina, treonina o tirosina de un amplio rango de fosfoproteínas.
- 19. Estallido celular respiratorio:** proceso celular que genera, por reducción parcial del oxígeno molecular, intermediarios reactivos del oxígeno que incluyen radicales oxidantes, halógenos oxidados y el oxígeno singulete. El mismo se caracteriza por un incremento abrupto en el consumo de oxígeno y la activación

de la vía metabólica denominada desviación de las hexosas monofosfato, generadora de potencial de reducción bajo la forma de NADPH.

- 20. Estrés oxidativos:** desequilibrio entre la tasa fisiológica de producción de oxidantes y la velocidad del sistema de defensa antioxidante que ocasiona un daño celular reversible
- 21. Ferredoxina:** proteínas hierro-azufre que intervienen en el transporte de electrones en algunas reacciones del metabolismo.
- 22. Forbol miristato acetato (PMA):** agente promotor de tumores asociado al aumento de la proliferación de células malignas. Es un agonista de la proteína quinasa C (agente antineoplásico), generador de especies reactivas de oxígeno, metabolito vegetal, mitógeno, agente carcinógeno e inductor de la apoptosis.
- 23. Fosforilación oxidativa:** síntesis química de ATP (reacción endergónica) que ocurre en la mitocondria impulsada por el proceso exergónico de transferencia de electrones desde el NADH al oxígeno (cadena respiratoria)
- 24. Genotóxico:** tipos de agentes que inducen mutaciones y cualquier otro tipo de daño acontecido en el ADN celular.
- 25. Glutación:** compuesto de bajo peso molecular con grupo sulfhidrilo (-SH) más importante en plantas y animales. Se trata de un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys). Principal antioxidante interno de nuestro cuerpo.
- 26. Homeostasis:** conjunto de fenómenos de autorregulación, que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno de un organismo.
- 27. Inmunoestimulante:** sustancia o condición que aumenta la capacidad del sistema inmunitario para combatir las infecciones y las enfermedades.
- 28. Inmunomodulador:** sustancias que tienen la capacidad de aumentar o disminuir la respuesta inmune. Desde el punto de vista terapéutico, esta capacidad de modulación tiene un amplio potencial como terapia adyuvante en la enfermedad neoplásica, alérgica y por inmunodeficiencia.
- 29. Inmunosupresor:** sustancia que disminuye la respuesta inmunitaria de organismos. Reduce la capacidad del organismo para combatir las infecciones y otras enfermedades, como el cáncer.

- 30. Inmunotoxicidad:** daño para el sistema inmunitario causado por la exposición a sustancias químicas. El análisis de la inmunotoxicidad es una parte estándar del desarrollo de sustancias como posibles fármacos nuevos.
- 31. Método de Lowry:** método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la Ley de Lambert-Bee.
- 32. Mutagénico:** agentes causantes de mutaciones sobre el material hereditario. Ejercen distintos tipos de daño en el material genético, los cuales pueden ser heredables.
- 33. Oligoelemento:** elemento químico que en muy pequeñas cantidades es indispensable para las funciones fisiológicas.
- 34. Peroxidación lipídica:** reacción de los lípidos de la membrana celular con el oxígeno. Se puede dividir como autooxidación propiamente dicha y la catálisis promovida por lipoxigenasas.
- 35. Quelante:** compuesto químico que se une con firmeza a los iones metálicos. En el campo de la medicina, los quelantes se usan para extraer metales tóxicos del cuerpo. También están en estudio para el tratamiento de cáncer.
- 36. Quimioluminiscencia:** emisión de luz asociada con la disipación de energía en una sustancia electrónicamente excitada.
- 37. Regulón:** conjunto de genes diana de un determinado factor de transcripción (proteína reguladora que controla un grupo de operones o genes individuales controlados generalmente como activador o represor).
- 38. Sideróforos:** ligandos específicos de iones férricos de bajo peso molecular.
- 39. Sistema xantina oxidasa:** molibdoflavoenzima ampliamente distribuida en diferentes especies desde las bacterias hasta el hombre. Ha sido estudiada por su relación con la producción de especies reactivas del oxígeno.
- 40. Teratogénico:** agentes causantes de anomalías de carácter anatómico o funcional durante el desarrollo embrionario de un organismo. Provocan el desarrollo de diferentes tipos y/o niveles de defectos congénitos.
- 41. Tumorigénesis:** origen, producción o desarrollo del cáncer a través de cambios genotípicos y fenotípicos que perturban el equilibrio normal entre la proliferación y la muerte celular. La carcinogénesis requiere una constelación de pasos, lo que puede ocurrir rápidamente o durante un período de muchos años.

42. Xenobióticos: sustancia química que es ajena a los organismos de un ecosistema.