



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE

Toxicidad de cianotoxinas presentes en cuerpos de agua dulce de Norpatagonia en la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*.

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología

Lic. Julio César Paineofilú

Director: Dr. Carlos Marcelo Luquet

Codirectora: Dra. Gisela Kristoff

2020

“La verdadera ciencia enseña a dudar de nosotros mismos.”

Claude Bernard

AGRADECIMIENTOS

Los cinco años del doctorado se pasaron muy rápido. El más significativo, sin duda, fue este último, que lo viví al ritmo de *Highway Star* o *The Trooper*. Así como les habrá pasado a muchos otros tesisistas, nunca imaginé que terminaría esta etapa en un contexto de pandemia y de cuarentena, aislado como en un retiro casi espiritual. Por ello, en primer lugar, agradezco a mi familia, que se bancó todos estos meses de lejanía y ausencia, pero siempre apoyándome, en un momento en el que la única certeza era cerrar esta tesis.

- ❖ Por supuesto quiero agradecer a mi director, Dr. Carlos Luquet, por haber dedicado tanto tiempo y energía durante éste y los años anteriores. Esta tesis implica la culminación de una etapa de siete años ininterrumpidos de trabajo en conjunto (contando la tesina de licenciatura), durante los cuales supo tener mucha paciencia y ser un excelente profesor y amigo. En los años venideros seguiré aprendiendo de él, eso seguro.
- ❖ A mi codirectora, Dra. Gisela Kristoff, que durante el desarrollo de la tesis siempre estuvo atenta para ayudarme en lo que necesitara y sobre todo en este último año. Sus aportes fueron más que significativos para que este trabajo llegara a buen puerto.
- ❖ A la Dra. Gabriela Malanga, al Dr. Lucas Mongiat y al Dr. Gustavo Somoza, jurados que evaluaron este trabajo de tesis. Les agradezco por la revisión detallada y comprometida que han hecho. Sus comentarios y sugerencias han ayudado a mejorar enormemente la calidad de este trabajo.
- ❖ A la comisión del Doctorado en Biología del Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB) y al personal del departamento de posgrado, Patricia Gaglioti, Gustavo Pagliari y Marcela Ojeda, por el acompañamiento brindado a lo largo de estos años.
- ❖ A mi subocodirectora, Dra. Flavia Bieczynski, que nuevamente no aparece en los papeles oficiales pero me acompañó durante todo el proceso de esta tesis, brindándome también su amistad, sobre todo en estos últimos meses.

- ❖ A la Lic. Carolina Gonzalez (pronto futura Dra.), por su invaluable aporte con el extracto de microcistina-LR, pero también por su amistad y estar siempre atenta a cualquier consulta que surgiera.
- ❖ Al Dr. Bernd Krock, por haber facilitado gentilmente los extractos de toxina paralizante de moluscos, y haber aportado con sus comentarios a la mejora del artículo de respaldo de esta tesis.
- ❖ A LTH (perdón, Dra. Lucila T. Herbert), por brindarme su amistad sobre todo, pero también por su ayuda y acompañamiento en momentos difíciles, y *phhh* en tanto más que paro de contar, porque seguro me quedo corto. En persona o a la distancia, la diferencia no se nota.
- ❖ A Vir y al Negro (Dra. Virginia Bianchi y Dr. Juan M. Castro), por brindarme su amistad desde que entré al laboratorio y estar dispuestos siempre a ayudarme en todo lo que hiciera falta, desde sólo la compañía en la oficina, hasta la concreción de experimentos que resultaron fundamentales para esta tesis.
- ❖ Al Dr. Mariano Pascual, por su amistad y por ayudarme a mejorar en muchos aspectos de mi formación como científico. Desde la discusión de los resultados hasta la práctica en el laboratorio, sus aportes fueron más que significativos.
- ❖ A la Dra. Julieta De Anna, por ayudarme con los experimentos de expresión ARNm y siempre estar atenta a cualquier consulta.
- ❖ Siempre estaré más que agradecido a la gente que integra el Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), un grupo humano sin igual. Gracias a Pablo Hualde, Leonardo Molinari, Pablo Moreno, Walter Torres, Pablo Morzenti, Mariela Demicheli, Jorge Kuroda, Leandro Castiñeira, Jorge y Carlos Barriga y a Juan Figueroa, que siempre estuvieron atentos y dispuestos a colaborar en el trabajo, ya sea con peces, reactivos, agua destilada, soporte técnico, un mate, una charla, entre otras tantas.
- ❖ A Juancito Hoingo, Rubén Tapia y Fabian Alfonso, guardias del CEAN y amigos, que siempre acompañaron en los recreos entre experimentos, con una charla y un mate de por medio.
- ❖ A los amigos de siempre: Gise, Sofi, Gaby, Eze, Joha, Mati, por su acompañamiento a lo largo de tantos años, sea en persona o la distancia.

- ❖ Esta tesis se realizó con una beca doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), y se financió con los subsidios CONICET PIP 11220130100529CO y ANPCYT-PICT 2013-1415 y 2018-02653.

RESUMEN

Las poblaciones de microalgas, dinoflagelados y cianobacterias pueden crecer de forma masiva en eventos conocidos como “floraciones”. Algunos de estos microorganismos pueden producir compuestos tóxicos para la biota acuática y la salud humana, *e.g.* algunas cianobacterias producen cianotoxinas. En Norpatagonia, están presentes especies de varios géneros de cianobacterias y son muy frecuentes las floraciones de distintas especies del género *Dolichospermum*, potencial productor de más de un tipo de toxina, *e.g.* microcistinas (MC) como microcistina-LR (MCLR), y neurotoxinas como la saxitoxina (STX), la toxina más estudiada de un conjunto de análogos estructurales denominado “toxinas paralizantes de moluscos” (PST, por su nombre en inglés). En estos ambientes, se plantea un escenario donde la interacción entre las toxinas puede potenciar sus efectos nocivos individuales. Los peces pueden incorporar las cianotoxinas a través del intestino, acumularlas y/o excretarlas hacia el medio externo. La MCLR es absorbida en el intestino por transportadores de sales biliares (OATP) y tiene como efecto tóxico característico a la inhibición de la actividad de las enzimas proteína fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A). Puede ser transportada fuera del organismo por los transportadores dependientes de ATP, *e.g.* ABCC (del sistema de resistencia a múltiples xenobióticos, MXR), previa conjugación con glutatión (GSH), catalizada por la enzima glutatión S-transferasa (GST). Por otro lado, las PST típicamente inhiben los canales de sodio, y posiblemente de otros cationes, dependientes de voltaje, e interrumpen la transmisión del impulso nervioso. Sin embargo, su absorción y eliminación en el intestino, así como sus posibles efectos intracelulares, están muy poco estudiados.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo de tesis tiene como objetivo general profundizar el conocimiento sobre la toxicidad de MCLR y PST, en forma individual y combinada, en el intestino medio de la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*. Este objetivo se llevó a cabo utilizando modelos de exposición *in vivo*, *ex vivo* (epitelio aislado, tiras y segmentos intestinales) e *in vitro* (enterocitos aislados y homogenatos de tejido). En los modelos *ex vivo*, se estimó la actividad de las enzimas PP1, GST, glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT), la

peroxidación lipídica y el contenido de GSH y glutatión total. En los modelos *in vitro*, se analizó la producción de ROS y la integridad de la membrana lisosomal. Esto último se estimó a partir del tiempo de retención de rojo neutro del 50% de las células observadas (NRRT50). La actividad de los transportadores ABCC se estimó a través de la tasa de transporte de 2,4-dinitro-S-glutatión (DNP-SG), un sustrato específico, producto de la conjugación (catalizada por GST) del 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) con GSH.

La primera hipótesis de esta tesis plantea que las PST son absorbidas por los enterocitos del intestino medio, donde producen diversos efectos citotóxicos y son exportadas fuera de estas células por transportadores ABCC. Para poner a prueba esta hipótesis, se midió el contenido de GSH, la actividad GST, GR y CAT, y la peroxidación lipídica, la producción de ROS y el NRRT50. El transporte de DNP-SG se estimó en epitelio aislado y en segmentos intestinales evertidos y sin evertir. Los resultados obtenidos sustentan parcialmente esta hipótesis. Luego de la exposición a PST se observaron indicios leves de estrés oxidativo y citotoxicidad, evidenciados por la disminución del contenido de GSH, el aumento de la actividad GST y GR y la disminución del transporte de DNP-SG (sólo en la cara basolateral del intestino) y del NRRT50. Esto último no se agravó cuando los enterocitos se expusieron a PST + MK571, un inhibidor específico de los ABCC. Este resultado sugiere que las PST no son sustratos de estos transportadores, pero sí afectan su función, particularmente en la membrana basolateral. La actividad CAT, la peroxidación lipídica y la producción de ROS no fueron alteradas por la exposición a PST.

La segunda hipótesis plantea que la MCLR modula la actividad y la expresión génica de proteínas del sistema MXR en el intestino medio de *O. mykiss*, modificando así sus efectos citotóxicos a lo largo del tiempo. Para poner a prueba esta hipótesis, se expusieron peces *in vivo* durante 12, 24 y 48 h mediante alimento embebido en MCLR. Se midió el contenido de GSH y glutatión total, la actividad de GST, GR y PP1, el transporte de DNP-SG y el NRRT50. Esta información se complementó con el análisis de la expresión de ARNm de ABCC2, GST- π , GST- ω y de los factores de transcripción/receptores nucleares Nrf2, AhR, ARNT y LXR, vinculados a la activación de la expresión del ARNm de proteínas del sistema MXR

y de enzimas antioxidantes y detoxificantes. Los resultados apoyan parcialmente esta hipótesis. La exposición a MCLR aumentó la capacidad detoxificante del intestino a lo largo del tiempo (caracterizado por mayor actividad de GST y de transporte por ABCC), pero la inhibición de PP1 y el daño a lisosomas se mantuvieron constantes. Las modulaciones observadas no se correspondieron con cambios en la expresión de ARNm de GST- π , GST- ω , ABCC2, Nrf2, AhR, ARNT ni LXR. Según los resultados observados, es posible plantear que, mientras está presente en la dieta, la exposición a MCLR provoca una situación de estrés constante en el intestino medio de *O. mykiss*, pese a que el aumento de la capacidad detoxificante aumentaría la excreción de MCLR hacia afuera del enterocito.

La tercer hipótesis plantea que la exposición a MCLR sensibiliza el intestino medio de *O. mykiss* frente a la toxicidad de las PST. Para poner a prueba esta hipótesis, se realizaron exposiciones consecutivas a MCLR *in vivo* y, luego, a PST *ex vivo*. Se midió el contenido de GSH y glutatión total, la actividad GST, GR, PP1 y CAT, el NRRT50, la producción de ROS y el transporte de DNP-SG (en segmentos intestinales evertidos y sin evertir). Los resultados obtenidos apoyan parcialmente esta hipótesis, ya que la interacción de MCLR y PST produjo efectos negativos sobre el balance oxidativo en el epitelio intestinal, que no se manifestaron en la exposición a cada cianotoxina por separado. La exposición consecutiva a MCLR *in vivo* y PST *ex vivo* provocó la disminución en el contenido de GSH y en el cociente GSH/GSSG. Este efecto se correspondió con la disminución de la actividad GST, el aumento de la actividad CAT y la mayor producción de ROS. Por otro lado, la inhibición de la actividad PP1 por parte de MCLR no se agravó en presencia de PST. Por último, el pretratamiento con MCLR previno la inhibición de la actividad de los ABCC basolaterales producida por PST.

Este trabajo de tesis permite concluir que el intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* es un órgano sensible a la exposición a MCLR y PST. Estas toxinas ingresan a los enterocitos y afectan sus funciones, tanto en forma individual como combinada. Los efectos citotóxicos y de estrés oxidativo, producidos por ambas toxinas persisten aun cuando la actividad del sistema MXR está aumentada, y sus efectos combinados configuran un escenario muy complejo que amerita el desarrollo de nuevos estudios.

ABSTRACT

Populations of microalgae, dinoflagellates, and cyanobacteria can grow massively in events known as “blooms”. Some of these microorganisms can produce compounds that are toxic for aquatic biota and human health; *e.g.*, some cyanobacteria produce cyanotoxins. In northern Patagonia, species of various genera of cyanobacteria are present and blooms of different species of the *Dolichospermum* genus are frequent. *Dolichospermum* can produce more than one type of toxin, including microcystins (MC), such as microcystin-LR (MCLR), and neurotoxins, such as saxitoxin (STX), the best studied toxin within a set of structural analogs called “paralytic shellfish toxins” (PST). Thus, in these environments, a scenario where the interaction between toxins can enhance their individual harmful effects is possible. Fish can incorporate cyanotoxins through the intestine, accumulate them and/or excrete them to the external environment. MCLR uptake occurs in the intestine by bile salt transporters (OATP) and its characteristic toxic effect is the inhibition of the activity of protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A (PP1 and PP2A). It can be transported out of the body by ATP-dependent transporters such as ABCC transporters (from the multidrug resistance system, MXR), after conjugation with glutathione (GSH) catalyzed by the enzyme glutathione S-transferase (GST). On the other hand, PST typically inhibit voltage-gated sodium channels and disrupts the nerve impulse transmission. However, PST absorption and elimination in the intestine, as well as the possible intracellular effects, are poorly studied.

Considering this background, the general aim of the present thesis is to broaden the knowledge about the individual and combined toxicity of MCLR and PST in the middle intestine of *Oncorhynchus mykiss*. This aim was approached using *in vivo*, *ex vivo* (intestinal isolated epithelium, strips, and segments), and *in vitro* (isolated enterocytes and tissue homogenates) exposure models. In the *ex vivo* models, the activities of enzymes PP1, GST glutathione reductase (GR), and catalase (CAT) were estimated, together with lipid peroxidation and content of GSH and total glutathione. In *in vitro* models, reactive oxygen species (ROS) production and lysosomal membrane integrity were analyzed. The latter was

estimated through the neutral red retention time of 50% of observed cells (NRRT50). The activity of ABCC transporters was estimated through the transport rate of 2,4-dinitro-S-glutathión (DNP-SG), a specific substrate product from the conjugation of 1-chloro-2,4-Dinitrobenzene (CDNB) with GSH (catalyzed by GST).

The first hypothesis of this thesis proposes that the uptake of PST is via enterocytes from the middle intestine, where they produce several cytotoxic effects, and are excreted from the cells by ABCC transporters. To test this hypothesis, GSH content, GST, GR, and CAT activity, lipid peroxidation, ROS production, and NRRT50 were measured. The DNP-SG transport rate was estimated in isolated epithelium and in everted and non-everted segments. The results obtained partially support the hypothesis. After PST exposure, mild signs of oxidative stress and cytotoxicity were observed, characterised by a decrease in GSH content, increase of GST and GR activities, and decrease of DNP-SG transport rate (only in the basolateral side of the intestine) and of NRRT50. The latter was not significantly higher when the enterocytes where exposed to PST + MK571, a specific ABCC inhibitor. This result suggests that PST are not substrates of these transporters, but they do affect their function, particularly in the basolateral membrane. CAT activity, lipid peroxidation, and ROS production where not altered by exposure to PST.

The second hypothesis proposes that MCLR modulates the activity and gene expression of proteins of the MXR system in the middle intestine of *O. mykiss*, thus modifying its own cytotoxic effects over time. To test this hypothesis, fish were exposed *in vivo* for 12, 24, and 48 h through food spiked with MCLR. The content of GSH and total glutathione, GST, GR, and PP1 activities, DNP-SG transport rate, and NRRT50 were measured. This information was complemented with the analysis of mRNA expression of ABCC2, GST- π , GST- ω , and the transcription factors/nuclear receptors Nrf2, AhR, ARNT, and LXR, linked to the activation of mRNA expression of proteins from the MXR system and of antioxidant/detoxifying enzymes. The results partially support the hypothesis. Exposure to MCLR increased intestine detoxification capacity along time (characterized by an increase in GST activity and in DNP-SG transport rate), but PP1 inhibition and lysosomal damage were constant. The modulations observed did not correspond to changes in mRNA

expression of GST- π , GST- ω , ABCC2, Nrf2, AhR, ARNT, or LXR, which did not show alterations. Based on the results observed, it is possible to propose that MCLR exposure through diet causes a constant stress condition in the middle intestine of *O. mykiss* even if the increase in detoxification capacity suggests an increase in the excretion of MCLR outside of the enterocytes.

The third hypothesis proposes that MCLR exposure sensitizes the middle intestine of *O. mykiss* against the toxicity of PST. To test this hypothesis, exposures were carried out *in vivo* to MCLR and, consecutively, *ex vivo* to PST. Content of GSH and total glutathione, GST, GR, PP1, and CAT activities, NRRT50, ROS production, and DNP-SG transport rate (in everted and non-everted segments) were measured. The results obtained partially support the hypothesis. The interaction between MCLR and PST caused negative effects on the oxidative balance in the intestinal epithelium that were not apparent after exposure to each cyanotoxin separately. A decrease in GSH content, GSH/GSSG ratio, and GST activity, and an increase of ROS production were observed. On the other hand, MCLR inhibition of PP1 activity was not enhanced by the presence of PST. The pre-treatment with MCLR *in vivo* increases the transport through ABCC on both sides of the intestine, even in combination with PST.

This thesis allows concluding that the middle intestine of *Oncorhynchus mykiss* is an organ sensitive to MCLR and PST exposure. These toxins are taken up by enterocytes and alter their functions, both individually and in combination. The cytotoxic injury and oxidative stress produced by both toxins persists even when the activity of the MXR system increases, and their combined effects constitute a very complex scenario that opens the door for future studies.

ABREVIATURAS

•OH, radical hidroxilo

ABC, *ATP-Binding Casette*

AhR, *Aryl hydrocarbon receptor*

AIC, Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro

ANTX, anatoxinas

ANTX-a, anatoxina-a

ARE, *antioxidant response element*

ARNT, *aryl hydrocarbon nuclear translocator*

As^{III}, arsénico trivalente, arsenito, arsénico^{III}

As^{III}-SG, Conjugado As^{III} + glutatión

As^V, arsenato, arsénico^v

B1, Toxina B1, Gonyautoxina-5

BCRP, *breast cancer resistance protein*, proteína de resistencia al cáncer de mama

BHT, butilhidroxitolueno

BMAA, β -N-metilamino-L-alanina

BSA, albúmina de suero bovino

BSEP, *bile salt export pump*

C1/C2, Protogoniautoxina I, N-sulfocarbamoilgoniautoxina C

CAT, catalasa

CDNB, 1-cloro-2,4-dinitrobencono

CEAN, Centro de Ecología Aplicada del Neuquén

CI₅₀, Concentración inhibitoria 50

CO₂, Dioxido de carbono

Ct, *cycle threshold*

CTX, ciguatoxinas

CYN, cilindrospermopsinas

CYP450, citocromo p450 oxidasas

DCF, 2',7'-diclorofluoresceína

DCFH, 2',7'-Diclorofluorescina

DCFH-DA, 2',7'-Diclorofluorescina diacetato

dcSTX, saxitoxina decarbamoilada

DMA^v, dimetilarsenato, dimetilarsénico^v
DMSO, dimetil-sulfóxido
DNP-SG, 2,4-dinitrofenil-S-glutación
DTNB, ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
DTT, ditioneitol
EC, extractos crudos
EDTA, ácido etilendiamino-tetraacético
EE, Error Estándar
EP, extractos purificados
ER, receptor de estrógenos
FAN, Floraciones algales nocivas
Fe^{II}, Hierro divalente
GCL, enzima glutamato ligasa glutamato-cisteína
GPx, glutación peroxidasa
GR, glutación reductasa
GSH, glutación reducido
GSSG, glutación disulfuro
GST, glutación S-transferasa
GTX 1/4, Goniautoxina 1/4
GTX 2/3, Goniautoxina 2/3
H₂O₂, peróxido de hidrógeno
HANTX-a, homoanatoxina-a
IC, Intervalo de confianza
Keap1, *Kelch ECH associating protein 1*
LXR, *liver X receptor*
LXRES, *LXR response elements*
mAChR, receptores muscarínicos
MAPEG, *Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*
MAs^{III}, metilarsenito, metilarsénico^{III}
MAs^{III}-SG, MAs^{III} + glutación
MC, microcistinas
MCLR, microcistina-LR
MDA, malondialdehído

MDR, sistema de resistencia multidroga, *multidrug resistance*
MMA^v, monometilarsenato, monometilarsénico^v
MRP, *multiresistance associated proteins*, proteínas asociadas a la resistencia a múltiples drogas
MXR, sistema de resistencia a múltiples xenobióticos
N₂, Nitrógeno atmosférico
nAChR, receptores nicotínicos
NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
ND, Nodularinas
NeoSTX, Neosaxitoxina
Nrf2, *nuclear factor-(erythroid-derived 2)-like 2*
NRRT50, Neutral red retention time, tiempo de retención del rojo Nneutro 50
O₂^{-•}, anión superóxido
O₂, oxígeno molecular
OATP, polipéptidos transportadores de aniones orgánicos
OH⁻, anión oxidrilo
OK, *O. kisutch*
OM, *Oncorhynchus mykiss*
PAP, 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato
Pgp1, *permeability glycoprotein 1*, ABCB1
pNPP, para-nitrofenil fosfato sal disodica
PP, proteína fosfatasa
PP1, proteína fosfatasa de tipo 1
PP2, proteína fosfatasa de tipo 2
PST, *paralytic shellfish toxins*
PXR, *pregnane X receptor*
ROS, especies reactivas de oxígeno
RXR, *retinoid X receptor*
SOD, superóxido dismutasa
SS, *Salmo salar*
SSA, ácido 5-Sulfosalicílico
STX, saxitoxinas
STXeq, equivalentes de saxitoxina

SULT, sulfotransferasas
TBA, ácido tiobarbitúrico
TCA, ácido tricloroacético
TNB²⁻, 2-nitro-5-thiobenzoato
TP, toxinas purificadas
TPM, toxinas paralizantes de moluscos
TTX, tetrodotoxina
UDPGA, UDP-glucurónico
UGT, UDP-glucuronosiltransferasas
USA, United States of America
WHO, World Health Organization
XRE, *xenobiotic response element*

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción general	1
1.1. Cianobacterias	3
1.2. Cianotoxinas	6
1.3. Absorción y metabolismo de cianotoxinas.....	9
1.4. Metabolismo de xenobióticos	11
1.5. GSH y metabolismo oxidativo	14
1.6. Transporte y excreción de xenobióticos	16
1.7. Problemática de las cianobacterias en Argentina.....	20
Objetivo General	24
Hipótesis general	24
2. Metodología general	25
2.1. Reactivos.....	26
2.2. Peces	26
2.3. Modelos experimentales.....	28
2.3.1. Segmentos intestinales	28
2.3.2. Tiras intestinales	29
2.3.3. Epitelio aislado.....	29
2.3.4. Células aisladas	31
2.4. Transporte de DNP-SG.....	33
2.5. Determinaciones bioquímicas	35
2.5.1. Contenido de Glutación	36
2.5.2. Actividad Glutación-S-Transferasa (GST)	39
2.5.3. Actividad Glutación Reductasa (GR)	39
2.5.4. Actividad Catalasa (CAT).....	40
2.5.5. Peroxidación lipídica	41

2.5.6. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	42
2.5.7. Actividad proteína fosfatasa 1 (PP1)	43
2.5.8. Contenido de Proteínas.....	44
2.6. Ensayos de viabilidad celular	45
2.6.1. Azul tripán	45
2.6.2. Tiempo de Retención del Rojo Neutro 50 (NRRT50).....	46
Capítulo I. Efectos de las PST sobre marcadores de estrés oxidativo, función	
lisosomal y actividad de los transportadores ABCC	47
CI.1. Introducción.....	48
Objetivo.....	54
Hipótesis.....	54
CI.2. Metodología.....	55
CI.2.1. Extractos de PST	55
CI.2.2. Peces y preparaciones	56
CI.2.3. Marcadores de estrés oxidativo	57
CI.2.4. Estabilidad de la membrana lisosomal	58
CI.2.5. Actividad de transportadores ABCC.....	58
CI.2.6. Análisis estadístico.....	60
CI.3. Resultados	61
CI.3.1. Marcadores de estrés oxidativo	61
CI.3.3. Función de los transportadores ABCC.....	63
CI.4. Discusión	67
CI.5. Conclusiones	73
Capítulo II. Efectos sobre el sistema de resistencia a múltiples xenobióticos y	
daños intracelulares, en juveniles de <i>Oncorhynchus mykiss</i> alimentados con	
MCLR.	74
CII.1. Introducción	75

Objetivo.....	83
Hipótesis.....	83
CII.2. Metodología.....	84
CII.2.1. Extracto de MCLR.....	84
CII.2.2. Peces y exposición <i>in vivo</i>	87
CII.2.3. Preparación del alimento embebido en MCLR.....	87
CII.2.4. Función de los transportadores ABCC.....	89
CII.2.5. Determinaciones bioquímicas.....	89
CII.2.6. Estabilidad de la membrana lisosomal.....	90
CII.2.7. Producción de ROS y estabilidad de la membrana lisosomal <i>in vitro</i>	90
CII.2.8. Expresión génica.....	90
CII.2.9. Análisis estadístico.....	92
CII.3. Resultados.....	95
CII.3.1. Función de los transportadores ABCC.....	95
CII.3.2. Glutación y enzimas asociadas.....	95
CII.3.3. Actividad PP1.....	100
CII.3.4. Estabilidad de la membrana lisosomal.....	101
CII.3.5. Producción de ROS y estabilidad de la membrana lisosomal <i>in vitro</i>	102
CII.3.6. Expresión génica.....	103
CII.4. Discusión.....	106
CII.5. Conclusiones.....	114
Capítulo III. Efectos combinados de MCLR y PST sobre el sistema de sistema de resistencia a múltiples xenobióticos y sobre marcadores intracelulares en el intestino medio de <i>Oncorhynchus mykiss</i>.	115
CIII.1. Introducción.....	116
Objetivo.....	120

Hipótesis.....	120
CIII.2. Metodología	121
CIII.2.1. Extracto de PST	121
CIII.2.2. Diseño experimental	121
CIII.2.3. Marcadores de estrés oxidativo.....	123
CIII.3.4. Tasa de transporte de DNP-SG	124
CIII.3.5. Actividad PP1	125
CIII.3.6. Análisis estadístico	126
CIII.3. Resultados	127
CIII.3.1. Marcadores de estrés oxidativo.....	127
CIII.3.2. Función de los transportadores ABCC en segmentos intestinales.....	130
CIII.3.3. Actividad PP1	132
CIII.4. Discusión	134
CIII.5. Conclusiones	139
3. Discusión general.....	140
4. Conclusiones generales.....	151
5. Bibliografía.....	152
ANEXO I	215
ANEXO II.....	216
Artículo de respaldo	216

1. Introducción general

En los ecosistemas acuáticos, tanto marinos como de agua dulce, las poblaciones de microorganismos que pertenecen al fitoplancton, *e.g.* microalgas, dinoflagelados y cianobacterias, pueden crecer de forma masiva en periodos cortos de tiempo, produciendo eventos llamados “blooms” o “floraciones” (Chorus y Bartram, 1999; Gianuzzi, 2011). Estos eventos se desarrollan naturalmente en condiciones de temperaturas altas, exposición a la luz solar prolongada, pH elevado y disponibilidad de nutrientes como fósforo y nitrógeno (Dantas *et al.*, 2011; Funari y Testai, 2008). Sin embargo, la tendencia actual del cambio climático, sumado a la actividad humana, han provocado el aumento a escala global de la temperatura y de los niveles de CO₂ disuelto, y la sobrecarga de nutrientes en los ambientes acuáticos. En consecuencia, también ha aumentado la frecuencia, la magnitud, las tasas de crecimiento, la persistencia y la distribución geográfica de las floraciones (Paerl y Paul, 2012; Steffen *et al.*, 2012). Las floraciones constituyen un problema ecológico, pero también un problema de índole toxicológica, dado que los microorganismos que las forman, pueden producir compuestos que son tóxicos para otros organismos. A este tipo de floraciones se las denomina “Floraciones algales nocivas” (FAN) y resultan perjudiciales a nivel ambiental, sanitario y productivo (Ettoumi *et al.*, 2011).

Las FAN constituyen un riesgo importante para la biota acuática y para la salud humana, no solo por la peligrosidad individual de cada toxina, sino también por sus efectos combinados. Dentro de los microorganismos causantes de las FAN, las cianobacterias son el grupo más estudiado, debido a su diversidad y al impacto sanitario y ambiental que provocan. Los metabolitos tóxicos que sintetizan son llamados cianotoxinas (Anagnostidis y Komárek, 1985; Sivonen y Jones, 1999) y son muy variables en cuanto a su naturaleza química, por lo que provocan diferentes efectos tóxicos en los organismos expuestos, acuáticos o terrestres. En particular, los peces son los vertebrados con mayor exposición a las floraciones y por ende a las cianotoxinas (Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011).

El intestino medio de los peces representa una vía de exposición muy importante para los xenobióticos (compuestos tóxicos ajenos al metabolismo del organismo), incluidas las cianotoxinas, dado que puede entrar en contacto con ellas a través del alimento y/o el agua. En su cara apical (luminal) presenta una

gran variedad de proteínas transportadoras de iones, nutrientes y sales biliares, que secundariamente facilitan la absorción de xenobióticos (Boaru *et al.*, 2006; Epel *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2014). Además, en nuestro laboratorio, hemos demostrado que el intestino medio de *O. mykiss* es un órgano importante para la detoxificación de xenobióticos muy diversos entre sí, tales como MCLR y arsénico, principalmente a través de proteínas transportadoras llamadas ABC (por su nombre en inglés, *ATP-Binding Casette*) (Bieczynski *et al.*, 2013, 2014, 2016; Paineofilú *et al.*, 2019). Es por ello que resulta interesante profundizar el estudio de los efectos de las cianotoxinas y sus mecanismos de detoxificación y excreción en este órgano en peces de agua dulce.

En esta tesis se explorarán la toxicocinética y la toxicodinámica de dos tipos de cianotoxinas potencialmente presentes en Norpatagonia, en el intestino medio de la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*. En el capítulo I se estudiarán las toxinas paralizantes de moluscos (TPM) (PST por su nombre en inglés, *paralytic shellfish toxins*), aplicadas en modelos *ex vivo* e *in vitro*. En el capítulo II se abordarán los efectos *in vivo* de la microcistina-LR (MCLR). Por último, en el capítulo III, se estudiarán los efectos combinados de ambas toxinas, a través de la aplicación de MCLR *in vivo* y PST *ex vivo* o *in vitro*.

1.1. Cianobacterias

Las cianobacterias están presentes en todo tipo de ambientes alrededor del planeta, tanto acuáticos como terrestres. Son procariotas de al menos 2700 millones de años de antigüedad. Pertenecen al dominio Bacteria (eubacteria) y como tales, no poseen organelas intracelulares unidas a membrana, tampoco un núcleo definido, sus ribosomas precipitan a 70 S (en lugar de a 80 S como los ribosomas de eucariotas) y la pared celular está compuesta por peptidoglicanos (como en bacterias Gram negativas) (Bryant, 1994; Fay y Van Baalen, 1987). Entre los procariotas, son el único grupo capaz de realizar fotosíntesis oxigénica y, dada esta característica, fueron las responsables de la aparición del oxígeno en la atmósfera terrestre (Paerl y Paul, 2012; Schopf, 2002). Su principal pigmento fotosintético es la clorofila a, aunque poseen pigmentos accesorios como la ficocianina y los carotenoides. Todos ellos están localizados en los ficobilosomas

que, a su vez, se hallan en la superficie exterior de los tilacoides, los cuales se encuentran libres en el citoplasma, cerca de la periferia celular (Chorus y Bartram, 1999).

En cuanto a la organización celular, las cianobacterias comprenden formas unicelulares, colonias y filamentos multicelulares. La única forma de reproducción que poseen es la asexual. Las formas filamentosas, por ejemplo, se reproducen por fragmentación del filamento o por la formación de una homogonia. Durante el transcurso de las floraciones, las cianobacterias pueden formar mantos que se extienden sobre la superficie del cuerpo de agua. Esta característica modifica, en gran medida, variables fisicoquímicas del ambiente, *e.g.* incrementan la turbidez, restringen la penetración de la luz solar, consumen el oxígeno disponible por respiración celular, entre otras. Esto impide el crecimiento de otros componentes del ecosistema como macrófitas y microalgas bentónicas (Backer, 2002; Jeppesen *et al.*, 2007; Scheffer *et al.*, 1997).

Las cianobacterias son altamente exitosas y dominantes frente a otros organismos, dado que toleran cambios grandes en la salinidad y la temperatura. Además, son capaces de absorber y almacenar de forma eficaz el nitrógeno, el fósforo, el hierro y otros metales, por lo que pueden crecer en ambientes pobres en nutrientes (Codd *et al.*, 2016). Algunos géneros son capaces de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) como *Dolichopernum* (ex *Anabaena*), *Aphanizomenon*, *Cilindrospermopsis* y *Nodularia* (que son planctónicos), *Lyngbya*, *Hormothamnion* y algunas especies de *Oscillatoria* (que bentónicos). Los géneros que no son capaces de fijar N_2 son *Microcystis* y *Planktothrix* (ambos planctónicos) y *Phormidium*, *Symploca*, y *Oscillatoria* (bentónicos). El aprovechamiento de los nutrientes disponibles es máximo en los géneros planctónicos, dado que poseen vesículas de gas que les permiten trasladarse en la columna de agua y así proveerse de los nutrientes que se encuentran en mayor concentración a más profundidad y aprovechar la irradiación solar para realizar la fotosíntesis (van der Merwe, 2015). Otra característica de las cianobacterias es la capacidad de metabolizar los productos primarios de la fotosíntesis y producir glucógeno y lípidos, que pueden ser almacenados en vesículas (Chorus y Bartram, 1999).

Normalmente, las floraciones aportan materia orgánica al ambiente, proveen de alimento para al zooplancton o a consumidores tales como moluscos, crustáceos y peces fitoplanctófagos (Suárez Isla y Guzmán Méndez, 1992). Sin embargo, estos consumidores pueden adoptar diversos comportamientos frente a la ingesta de cianobacterias. Por ejemplo, los invertebrados filtradores pueden ser selectivos y evitar el consumo de las cianobacterias, ya que la formación de colonias y filamentos dificulta su ingesta y/o porque son reconocidas como poco nutritivas y tóxicas (Porter y Orcutt, 1980; Smith *et al.*, 2008). Por otro lado, cuando la floración entra en fase de senescencia, atrae a ciliados y otros organismos del microplancton (Hoppe, 1981), lo que las vuelve más apetecibles para consumidores superiores, *e.g.* copépodos (Engström-Öst, 2002).

Bajo ciertas condiciones genéticas y ambientales, las cianobacterias pueden producir metabolitos secundarios que resultan tóxicos, tanto para los organismos acuáticos como para los terrestres (incluidos los humanos) y, por lo tanto, reciben el nombre de cianotoxinas (Buratti *et al.*, 2017; Chorus y Bartram, 1999). Estos metabolitos son compuestos derivados de la síntesis de sus fotopigmentos (Paerl y Millie, 1996), que se encuentran contenidos en el interior de las células y son liberados en forma masiva al medio acuático cuando comienza la senescencia celular. Por otro lado, también se ha sugerido que en ciertas especies, tales como *Microcystis aeruginosa* y *Aphanizomenon flos-aquae*, las cianotoxinas pueden ser liberadas al ambiente en forma activa y controlada por el ritmo endógeno de la célula (Borowitzka, 2016; Cordiero-Araújo y Bittecourt-Oliveira, 2013). Una vez en el ambiente acuático, las cianotoxinas pueden ingresar a la red trófica, al ser incorporadas directamente desde el agua, a través de epitelios permeables del sistema respiratorio o del sistema digestivo, y/o a través de la dieta. Además, los organismos fitoplanctófagos, ramoneadores o filtradores pueden ingerir directamente las células productoras (Chen *et al.*, 2005; Ferrão-Filho, 2008). Una vez que ingresan en el organismo, las cianotoxinas ejercen efectos tóxicos y también pueden acumularse en las partes blandas, con la posibilidad de ser transferidas a niveles tróficos superiores (Eriksson *et al.*, 1990; Malbrouck *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1997).

1.2. Cianotoxinas

Las cianotoxinas se clasifican de acuerdo a su efecto tóxico (caracterizado principalmente en mamíferos) en hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatoxinas (Chorus y Bartram, 1999; Metelcaf y Codd, 2012; Sivonen y Jones, 1999; Wiegand y Pflugmacher, 2005). Dentro de la bibliografía, los grupos más estudiados son las hepatotoxinas, las neurotoxinas y las citotoxinas, dado que han sido identificadas como responsables de numerosos casos de intoxicación, tanto en animales como en humanos (Christensen y Khan, 2020; Rutkowska *et al.*, 2019).

Las hepatotoxinas producen graves daños en el hígado, desde hemorragias hasta carcinogénesis. Dentro de este grupo, se encuentran las microcistinas (MC) y las nodularinas (ND). El efecto característico de ambas es la inhibición de las enzimas proteína fosfatasa de tipo 1 y 2 (PP1 y PP2) (Mackintosh *et al.*, 1990; Runnegar *et al.*, 1995a), lo que aumenta la fosforilación de proteínas y conlleva a la desregulación de procesos celulares importantes y, eventualmente, a la apoptosis (Goldberg *et al.*, 1995, Xing *et al.*, 2006). También está descrito que estas toxinas pueden promover la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y afectar la permeabilidad de lisosomas y mitocondrias, alterando el metabolismo y los mecanismos de señalización celular (Amado y Monserrat, 2010). En mamíferos, se ha sugerido que la combinación de la inhibición de PP y el efecto prooxidante, puede llevar a la proliferación celular descontrolada o a la muerte celular (Andrinolo y Sedán, 2011; Boaru *et al.*, 2006). Las MC son sintetizadas por los géneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Dolichospermum*, entre otros. Se han descrito más de 60 variantes de MC, de las cuales, la MCLR es la más estudiada y una de las más tóxicas.

Las neurotoxinas son un grupo diverso, tanto a nivel estructural como en su modo de acción farmacológico, cuyos efectos característicos se producen en el sistema nervioso y en las uniones neuromusculares de los animales. Este grupo está compuesto por anatoxinas (ANTX), saxitoxinas (STX), ciguatoxinas (CTX) y β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), cada una de ellas con numerosas variantes o análogos (Christensen y Khan, 2020, Lance *et al.*, 2018; Yasumoto, 2005). Las ANTX y STX son alcaloides cuyo efecto tóxico se produce principalmente a nivel de la sinapsis neuromuscular (Rutkowska *et al.*, 2019).

Las STX y sus análogos, bloquean en forma selectiva los canales catiónicos dependientes de voltaje como los canales de sodio, potasio o calcio, impidiendo la despolarización de la membrana plasmática en el impulso nervioso (Dettbarn, 1971; Henderson *et al.*, 1973). Estas toxinas se clasifican dentro de las PST, dado que son la causa de numerosos casos de intoxicación y muerte por parálisis muscular en humanos, y ocurren principalmente por el consumo de ostras y mejillones que acumularon las toxinas en sus partes blandas (WHO, 1984; Wiegand y Pflumacher, 2005). Entre las neurotoxinas marinas, las PST son las únicas que son producidas por organismos pertenecientes a dos reinos totalmente distintos, en dos ambientes diferentes (Cusick y Saylor, 2013). En ambientes marinos, las PST son producidas por dinoflagelados (Eucariotas) pertenecientes a los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium*, cuyas floraciones son conocidas como mareas rojas (Wiese *et al.*, 2010). En ambientes de agua dulce, las PST son producidas por cianobacterias (Procariotas), pertenecientes a los géneros *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya* y *Cylindrospermopsis* (Andrinolo y Sedan, 2011; Al-Tebrineh *et al.*, 2010; Lagos *et al.*, 2003).

Si bien el principal efecto de las PST está descrito a nivel neuromuscular, también es posible que produzcan efectos a nivel neuroendocrino, principalmente si se plantea que pueden ser absorbidas desde el intestino por *O. mykiss*. Si estas toxinas entran en contacto con las células de la capa muscular de este órgano o con los grupos de neuronas conocidos como células de Cajal, presentes en dicha capa (Ball *et al.*, 2012; Brijs *et al.*, 2017; Olsson, 2010), se puede producir la inhibición de los canales catiónicos activados por voltaje que poseen estas células. Esta inhibición pueden reducir la capacidad de respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HPI) e inhibir la producción de hormonas como el cortisol (Baj *et al.*, 2019; Rosengren *et al.*, 2017). Esto induciría desbalances osmóticos y en el metabolismo de glúcidos, dado que en teleósteos, el cortisol cumple la función de gluco y mineralocorticoide ((McCormick, 2001; Prunet *et al.*, 2006; Wendelaar Bonga, 1997).

Las anatoxinas son un conjunto de toxinas análogas entre sí, de las cuales, las más estudiadas son la anatoxina-a (ANTX-a) y la homoanatoxina-a (HANTX-a). Estas toxinas son alcaloides agonistas de receptores nicotínicos (nAChR) de

acetilcolina y también de los receptores muscarínicos (mAChR), aunque con menor afinidad. La ANTX-a se une irreversiblemente a los receptores, con mayor afinidad que la acetilcolina, por lo cual es más potente al producir la contracción muscular (Valério *et al.*, 2010). Entre los géneros productores de anatoxinas, se encuentran *Dolichospermum*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Nostoc*, *Aphanizomenon* y *Microcystis* (Osswald *et al.*, 2007).

La anatoxina-a(s) es una toxina que causa efectos similares a la ANTX-a, en cuanto a hiperestimulación de las sinapsis colinérgicas y, por ello, en un principio, se la nombró de forma similar. Sin embargo, presentan distinta composición química con respecto al resto de las anatoxinas y, también, en cuanto a su toxicodinámica. La anatoxina-a(s) es un organofosforado natural, que inhibe a la enzima acetilcolinesterasa e impide la hidrólisis de la acetilcolina, lo que permite que permanezca unida al receptor (Valerió *et al.*, 2010). Este mecanismo es similar al de los insecticidas fosforados como metil anzinfos (Ferrari *et al.*, 2004). Se han descrito como posibles productores de anatoxina-a(s) a las especies *Dolichospermum flos-aque* y *D. lemmermanni* (Valerió *et al.*, 2010).

Dentro de las cianotoxinas que se clasifican como citotoxinas, se encuentran las cilindrospermopsinas (CYN), alcaloides sulfatados, cuyos efectos nocivos han sido descritos en órganos tales como hígado, timo y corazón, entre otros (Amé y Wunderlin, 2011). Estas toxinas producen un amplio espectro de efectos citotóxicos, entre los que se destaca la inhibición de la síntesis de proteínas, la unión covalente al ADN (lo que provoca su ruptura) y la apoptosis celular (Shen *et al.*, 2002). Se ha descrito, también, que inhiben la síntesis de glutatión reducido (GSH) y la actividad de las enzimas citocromo p450 oxidadas (CYP450) (Runnegar *et al.*, 1995b; Valerió *et al.*, 2010). La producción de CYN está asociada principalmente a *Cylindrospermopsis raciborskii*, aunque también se ha descrito que puede ser producida por otras especies de cianobacterias, tales como, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Raphidiopsis curvata*, *Anabaena bergii* y *Lyngbya wollei* (Valerió *et al.*, 2010).

En humanos, se han registrado numerosos casos de intoxicación con cianotoxinas alrededor del mundo. Las principales vías de exposición resultaron ser el consumo de agua y de alimentos contaminados, tales como productos

agrícolas, peces, langostinos y moluscos (Falconer y Humpage, 2005). En menor medida, también se han registrado intoxicaciones por vía dérmica o respiratoria por inhalación de microgotas, formadas cuando las aguas contaminadas se pulverizan en el aire. Las intoxicaciones por cianotoxinas suelen causar desde graves complicaciones a la salud, como gastroenteritis, neumonía, parálisis y carcinogénesis, hasta incluso la muerte (Falconer *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 1990). El primer caso registrado de mortalidad en humanos, se registró en 1996, en Brasil, donde 76 pacientes de diálisis murieron por complicaciones hepáticas, debido al uso de agua contaminada con MC y CYN (Carmichael *et al.*, 2001).

En general, las cianotoxinas pueden encontrarse en el ambiente como mezclas complejas, por dos factores principales: por un lado, pueden estar presentes más de una especie de cianobacteria en el mismo cuerpo de agua, y por otro, algunas especies pueden producir más de un tipo de toxina. Por ejemplo, los géneros *Microcystis*, *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* y *Raphidiopsis* son productores tanto de hepatotoxinas como de neurotoxinas (Carmichael, 1992; Sant'Anna *et al.*, 2011; Wiegand y Pflugmacher, 2005). De esta forma, se incrementa el riesgo y la complejidad de los efectos combinados de los distintos grupos de cianotoxinas sobre los organismos acuáticos. En este sentido, se abren interrogantes acerca de cómo una toxina afecta la absorción de otra, cómo es la influencia de una toxina sobre los efectos citotóxicos de la otra, y qué sucede con los mecanismos de detoxificación, cuando dos o más toxinas interactúan.

1.3. Absorción y metabolismo de cianotoxinas

Como se mencionó, los peces están expuestos a las cianotoxinas principalmente a través de la mucosa intestinal. Allí, pueden ser absorbidas, acumuladas en el intestino y/o incorporadas a la circulación sistémica y, llegar a otros órganos, *e.g.* el hígado, riñón, corazón, bazo o músculo, donde ejercerán su acción tóxica o serán acumuladas (Bieczynski *et al.*, 2013; Chorus y Bartram, 1999; Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011). La acumulación y transferencia hacia otros niveles de la red trófica, dependerá del hábito trófico de la especie, de su capacidad de detoxificación y de la naturaleza química de cada cianotoxina en

particular. Por ejemplo, la tendencia más común en los ambientes acuáticos sería hacia a la biodilución, aunque, para MC, se ha observado la tendencia hacia la biomagnificación en cadenas tróficas planctónicas, (Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011). En este sentido, la toxicocinética de los distintos grupos de cianotoxinas no está completamente dilucidada y hasta el momento la más estudiada es MCLR.

La vía de absorción de las cianotoxinas está determinada por su naturaleza química. Las microcistinas, en particular, MCLR se absorbe, en mamíferos y en peces, por transportadores del sistema biliar (Meier-Abt *et al.*, 2007; Runnegar *et al.*, 1999). Tanto en intestino como en hígado, las microcistinas pueden ser transportadas hacia el interior de los enterocitos y de los hepatocitos, por polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) (Boaru *et al.*, 2006; Feurstein *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2005). En humanos, este tipo de transportadores también se encuentran localizados en el riñón y en la barrera hematoencefálica (Hagenbuch y Meier, 2004). El sistema digestivo sería también la vía de ingreso para STX y ANTX (Andrinolo y Sedan, 2011), aunque no está del todo claro si son absorbidas a través de los enterocitos o por vía paracelular. El ingreso al organismo por vía digestiva, acumulación y posterior transferencia hacia niveles superiores de las cadenas tróficas acuáticas, está parcialmente descrito para MC y STX, pero hay muy poca información para otras toxinas (Amé y Wunderlin, 2011; Bieczynski *et al.*, 2013; Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011; Wiegand y Pflugmacher, 2005).

En cuanto a la excreción, en mamíferos, se ha demostrado que STX se excreta fundamentalmente en forma libre por vía urinaria, sin embargo, aún no se ha determinado si se conjuga con otras moléculas para su eliminación o si es transportada activamente fuera de las células. Por otro lado, se ha propuesto que MCLR es excretada por el intestino, el hígado y el riñón, como conjugados de GSH o cisteína (Cys), MC-SG y MC-Cys (Bieczynski *et al.*, 2014, 2016; Ito *et al.*, 2002; Sahin *et al.*, 1996). El conjugado MC-SG es el resultado de la reacción de biotransformación catalizada por la enzima glutatión S-transferasa (GST) (Kondo *et al.*, 1992, 1996; Pflugmacher *et al.*, 1998; Takenaka, 2001). El conjugado MC-Cys se forma a partir de MC-SG, cuando el GSH es degradado a cisteína. Ambas

moléculas, MC-SG y MC-Cys, son menos tóxicas y más polares que la MCLR nativa. En general, la conjugación con GSH permite que las células excreten una amplia variedad de compuestos, tanto endobióticos como xenobióticos (Epel *et al.*, 2008; Omiecinski *et al.*, 2011).

1.4. Metabolismo de xenobióticos

El metabolismo celular de xenobióticos involucra una amplia variedad de reacciones de biotransformación, que se pueden dividir en reacciones de fase I y fase II. Las reacciones de fase I agregan o exponen átomos polares en endobióticos o xenobióticos, mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis. En las reacciones de oxidación, enzimas deshidrogenasas transfieren electrones desde los sustratos hacia un aceptor, como NAD^+ , que cumple las funciones de cofactor de la reacción. Las enzimas involucradas más conocidas son las CYP, la alcohol deshidrogenasa y las peroxidasas, entre otras (Ryan y Levin, 1990). Las reacciones de reducción, en esta fase, involucran la transferencia de un solo electrón hacia los sustratos y están catalizadas por la enzima citocromo p450 reductasa. Por otro lado, las reacciones de hidrólisis involucran a enzimas epóxido-hidrolasas y carboxilesterasas. Las primeras catalizan la hidratación de epóxidos y óxidos de benceno o naftaleno, mientras que las segundas catalizan la hidrólisis de enlaces carboxil éster y la unión del sustrato a residuos de serina. Las carboxilesterasas están asociadas a la detoxificación de numerosos pesticidas organofosforados (Glickman *et al.*, 1982; Straus y Chambers, 1995; Wallace y Dargan, 1987).

Las reacciones de fase II tienden a aumentar la polaridad de los compuestos, hayan pasado o no por fase I, mediante el agregado o conjugación con otras moléculas. En algunos casos, las reacciones de conjugación logran ocultar ciertos grupos funcionales de los sustratos, impidiendo ciertos fenómenos de bioactivación. Las reacciones más comunes involucran reacciones de acetilación y metilación, y reacciones catalizadas por enzimas UDP-glucuronosiltransferasas (UGT), las sulfotransferasas (SULT) y las GST.

Las UGT catalizan reacciones donde se conjugan endobióticos o xenobióticos con ácido glucurónico, transferido desde el ácido UDP-glucurónico (UDPGA), un nucleótido de alta energía (Mackenzie *et al.*, 1997). A este tipo de

reacción se la llama glucuronidación y a los productos finales se los conoce como glucurónidos. Estos compuestos se clasifican de acuerdo al sustrato original. En especies acuáticas, los más comunes son los *O*-glucurónidos, formados a partir de alcoholes, fenoles y ácidos carboxílicos, y los *N*-glucurónidos, formados a partir de carbamatos, amidas y aminas. La glucuronidación constituye la vía más común para inactivar o volver más polares a los compuestos tóxicos que generalmente son excretados por vía biliar o por vía urinaria (Dutton, 1990). En peces, las UGT están expresadas principalmente en hígado e intestino, aunque se ha detectado también actividad de estas enzimas en branquias, riñón y músculo (Clarke *et al.*, 1991; George *et al.*, 1998; James *et al.*, 1998; Lahti *et al.*, 2011). En cuanto a su relación con las cianotoxinas, las UGT han sido propuestas como posibles responsables de la biotransformación de PST, luego de que estas toxinas sufran un proceso de oxidación de fase I (García *et al.*, 2010; 2009).

Las SULT catalizan la transferencia de grupos sulfonatos desde 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAP) a grupos funcionales como hidroxilos o aminos, presentes en endobióticos o xenobióticos (Coughtrie, 2002; Mulder, 1981). En los peces, la actividad de las SULT se centra principalmente en el hígado, aunque en el bagre norteamericano (*Ictalurus punctatus*), también se la detectó actividad en el intestino (Schlenk *et al.*, 2008). Los conjugados sulfatados son aniones a pH fisiológico y se excretan por vía biliar y urinaria. Los sustratos más comunes de las SULT son endobióticos tales como las hormonas estradiol y tiroxina, dopamina y xenobióticos de tipo fenólico y sus productos de fase 1, como la forma hidroxilada de hidrocarburos aromáticos policíclicos, aril aminas y sus derivados hidroxilados, entre otros. En el intestino, es posible que los conjugados sulfatados, que llegan a través de la bilis, sean susceptibles de hidrólisis por la acción de enzimas sulfatasas, lo que devuelve al compuesto a su forma nativa, quedando disponible para ser nuevamente sustrato de las SULT o de otras enzimas.

Las GST catalizan la reacción de conjugación entre el GSH y el centro electrofílico, constituido por átomos de C, N o S, de una amplia gama de sustratos. Los principales endobióticos que son biotransformados por las GST son ciertos peróxidos, que pueden ser reducidos a sus correspondientes alcoholes, y los

productos derivados del daño por estrés oxidativo sobre lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Alin *et al.*, 1985; Hubatsch *et al.*, 1998; Marnett *et al.*, 2003). La oxidación de estas macromoléculas origina productos que resultan citotóxicos y mutagénicos, dado que pueden modificar el ADN (Hayes *et al.*, 2005). En cuanto a los xenobióticos, las GST catalizan la biotransformación de diversos fármacos, *e.g.* los usados en la quimioterapia y antibióticos, insecticidas, herbicidas, metaloides, entre otros (Allocati *et al.*, 2018; Sheehan *et al.*, 2001). Por ejemplo, estas enzimas conjugan el arsénico trivalente (As^{III}) y su forma metilada, MAs^{III} , dando lugar a la formación de $\text{As}^{\text{III}}\text{-SG}$ y $\text{MAs}^{\text{III}}\text{-SG}$, respectivamente (Gregus y Gyurasics, 2000; Kala *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2007). En cuanto a las cianotoxinas, además de las MC ya mencionadas, se ha descrito la conjugación de ND con GSH, catalizada por GST, en una amplia variedad de taxones (Galanti *et al.*, 2013; Pflumacher *et al.*, 2001; Sipiak *et al.*, 2002). Para las neurotoxinas, tales como ANTX y PST, no se ha demostrado que las GST catalicen la formación de conjugados con GSH. Sin embargo, se ha descrito que la actividad de las GST puede estar condicionada por estas toxinas (Barbosa *et al.*, 2019; Calado *et al.*, 2020; Clemente *et al.*, 2010; Mitrovic *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2020).

Las GST se clasifican, de acuerdo a su ubicación en las células, en citosólicas, mitocondriales y microsomales o MAPEG (por su nombre en inglés, *Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*) (Jakobsson *et al.*, 1999; Ladner *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2004). Las GST citosólicas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en procariotas como en eucariotas, y son las más estudiadas hasta el momento (Allocati *et al.*, 2009; Board *et al.*, 2013). En peces, este grupo está conformado por GST de las clases alfa (α), mu (μ), omega (ω), pi (π), sigma (σ), theta (θ) y rho (ρ) (Konishi *et al.*, 2005; Schlenk *et al.*, 2008). En intestino e hígado de salmónidos, la clase más común es GST- π , cuyos miembros poseen alta afinidad por compuestos como el 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), un sustrato que puede ser biotransformado a 2,4-dinitrofenil-S-glutatión (DNP-SG), el cuál es utilizado comúnmente para medir la actividad GST (Habig *et al.*, 1974). Dentro de las GST mitocondriales se encuentra la clase kappa (κ), con alta afinidad por compuestos como el CDBN y el peróxido de cumeno ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2$) (Morel y Aninat, 2011). Las GST MAPEG están involucradas en la producción de eicosanoides, moléculas derivadas de ácidos grasos (Hardwick *et al.*,

2013) y se han estudiado principalmente en mamíferos, salvo por unos pocos trabajos en peces (Chen *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2009).

1.5. GSH y metabolismo oxidativo

Como se mencionó a lo largo de esta introducción general, GSH participa en reacciones de biotransformación y transporte de xenobióticos. Sin embargo, esta molécula cumple, además, un rol fundamental en la defensa antioxidante de las células, actuando como agente reductor frente a moléculas oxidantes tales como ROS (Deponte, 2013; Forman *et al.*, 2009). En principio, estas moléculas se forman como consecuencia del metabolismo aeróbico, a partir de la reducción del oxígeno molecular (O_2) en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En forma resumida, la cadena de reacciones (figura 1) comienza con la reducción del O_2 a anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que luego se reduce a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual, mediante la adición de otro electrón (e^-), se reduce a un radical hidroxilo ($\bullet OH$) y un anión oxidrilo (OH^-). La cadena de reacciones de reducción finaliza con la formación de una molécula de H_2O , cuando se añade un e^- y un protón (H^+) al $\bullet OH$ (Lushchak, 2011). Como se mencionó, la formación de ROS ocurre en la mitocondria, pero también puede ocurrir en otros sistemas de la célula e, incluso, se ha descrito que el H_2O_2 cumple funciones dentro de la señalización celular (Lushchak, 2011; Sies, 2017). Generalmente, la fuente de electrones son moléculas tales como flavinas, semiquinonas o metales, *e.g.* hierro o cobre, entre otros (Deponte, 2013).

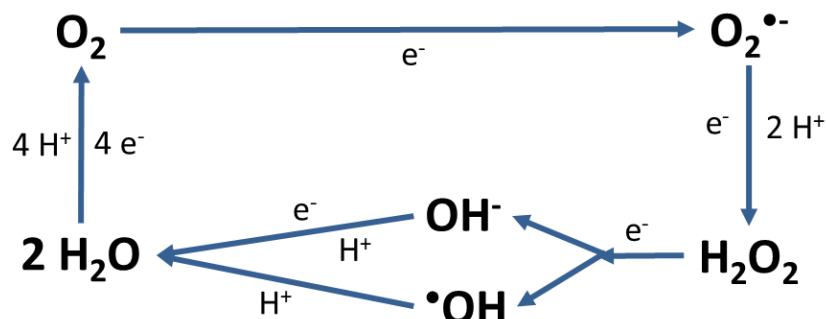


Figura 1.1. Esquema de la cadena de reacciones de reducción del oxígeno molecular (O_2), donde los electrones (e^-) se añaden en una secuencia de a uno por vez y forman especies reactivas de oxígeno (ROS): anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\bullet OH$) y anión oxidrilo (OH^-). La cadena de reacciones finaliza con la formación de agua (H_2O), al añadirse un e^- y un protón (H^+) al $\bullet OH$. Modificado de Lushchak (2011).

El GSH interactúa con las moléculas oxidantes en reacciones no enzimáticas o en reacciones catalizadas por enzimas que lo utilizan como cofactor (Buratti *et al.*, 2013). Por ejemplo, la glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción del H₂O₂ a través de una reacción irreversible que da como productos glutatión oxidado (glutatión disulfuro, GSSG), agua y/o alcoholes (Flohe *et al.*, 2011; Jozefczak *et al.*, 2012). El GSSG resulta tóxico para la célula y su formación se compensa por la acción de la flavoenzima glutatión reductasa (GR), que reduce el GSSG a dos moléculas de GSH, en una reacción dependiente de NADPH como cofactor (Forman *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). El balance entre GSH y GSSG (GSH/GSSG) resulta fundamental para el mantenimiento del balance oxidativo de la célula (Camera y Picardo, 2002; Gurer-Orhan *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009). Las defensas antioxidantes también incluyen a las enzimas que no dependen de GSH tales como la catalasa (CAT), que cataliza la reducción del H₂O₂ a H₂O y O₂, la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del O₂^{•-} en O₂ y H₂O₂, entre otras (Claiborne, 1985; Ighodaro y Akinloye, 2018; McCord y Fridovich, 1969). Las defensas antioxidantes mantienen la producción de ROS en un “estado estacionario”, en el cuál, estas moléculas se producen y se eliminan continuamente. Cuando este estado estacionario se modifica por alguna perturbación y aumenta la concentración de ROS, se produce una situación conocida como estrés oxidativo. Esta condición puede ser aguda o crónica, y causa perturbaciones en el metabolismo celular e incluso el daño de sus componentes tales como lípidos, proteínas y ADN (Ighodaro y Akinloye, 2018; Lushchak, 2011; Sies, 2020). Sin embargo, las definiciones mecánísticas precisas están aún en discusión y dependen del tipo de célula y/o del organismo (Deponete, 2013).

Las células eucariotas poseen sistemas de regulación de la defensa frente al estrés oxidativo. Por ejemplo, el Nrf2 (por su nombre en inglés, *nuclear factor-(erythroid-derived 2)-like 2*) es un factor de transcripción considerado como “regulador maestro” para las células eucariotas, que se activa en presencia de ROS y promueve la expresión de una gran cantidad de proteínas antioxidantes y detoxificantes (Seis, 2020). Los lisosomas también son considerados sistemas protectores, ya que pueden iniciar procesos de autofagia de las moléculas producidas por el daño oxidativo tales como lípidos, proteínas o ADN oxidados (Moore *et al.*, 2009). Otro tipo de defensa consiste en la actividad de la enzima GST,

que puede conjugar GSH con productos oxidados, *e.g.* *o*-quinonas, que se producen a partir de la oxidación de catecolaminas, y así evitar que produzcan sus efectos tóxicos (Baez *et al.*, 1997; Hayes *et al.*, 2005).

De acuerdo a lo mencionado hasta el momento, las cianotoxinas como MCLR y PST pueden afectar el metabolismo oxidativo de las células debido a que pueden afectar el normal funcionamiento de las defensas antioxidantes (Amado y Monserrat, 2010; Clemente *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2011). También, en forma indirecta, las cianotoxinas podrían afectar organelas como los lisosomas o las mitocondrias, cuya disfunción desencadena mayor producción de ROS (Kurz *et al.*, 2008; Li y Ma 2017). Además, una de las principales defensas antioxidantes, el GSH, se puede consumir en reacciones de biotransformación y excreción de xenobióticos, dentro de los cuales se encuentran las cianotoxinas (Aquilano *et al.*, 2014; Bard, 2000; Epel *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2014)”.

1.6. Transporte y excreción de xenobióticos

En conjunto con las enzimas de biotransformación, los efectos adversos que los xenobióticos ocasionan sobre las especies acuáticas pueden ser contrarrestados por proteínas pertenecientes al sistema MXR (Bard, 2000; Kurulec, 1997; Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2006). Este sistema está constituido por proteínas de membrana que transportan distintos tipos de moléculas desde el citoplasma de la célula hacia el exterior de las mismas (Klaassen y Aleksunes, 2010). Estos transportadores son llamados ABC y dependen de la unión e hidrólisis del ATP para su funcionamiento (Ishikawa, 1992). El fenómeno MXR fue descrito para organismos acuáticos por primera vez por Kurelec y Pivčević (1989, 1991) y se ha encontrado en moluscos, crustáceos y peces. Hasta el momento, se sabe que las proteínas ABC involucradas en el transporte tanto de endobióticos como de xenobióticos, pertenecen a las subfamilias ABCB, ABCC y ABCG, tanto en peces como en mamíferos (Leslie *et al.*, 2005; Luckenbach *et al.*, 2014; Zaja *et al.*, 2008).

Los transportadores del sistema MXR de los teleósteos poseen un gran porcentaje de homología con los transportadores del sistema de resistencia multidroga (MDR por su nombre en inglés, *multidrug resistance*) descritos en primer lugar para líneas de células tumorales de mamíferos (Annilo *et al.*, 2006;

Gottesman y Pastan, 1993). Es decir, que una gran parte de los genes que codifican para las proteínas ABC se conservaron durante la evolución y están distribuidos en un amplio número de taxones. Por otro lado, algunos genes han sufrido modificaciones en sus secuencias de aminoácidos por presiones evolutivas, dando lugar a genes ortólogos o a genes parálogos (en el caso de que hayan ocurrido duplicaciones), pero cumplen funciones similares en taxones distintos. Por ejemplo, en los teleósteos no se encontraron genes homólogos para la proteína ABCB1 de mamíferos (Dean y Annilo, 2005; Liu *et al.*, 2016). En pez cebra (*Danio reiro*), se describió que la proteína que cumple funciones similares a ABCB1 de mamíferos está expresada por genes duplicados, nombrados como Abcb1b y Abcb1a (Annilo *et al.*, 2006). Posteriormente, Fischer *et al.* (2013) sugirieron que ambas secuencias son similares a los genes de las proteínas ABCB4 y ABCB5 de mamíferos, por lo que en pez cebra, ambos genes son ortólogos de ABCB1. En *O. mykiss*, Zaja *et al.* (2008) identificaron una sola secuencia que expresa una proteína similar a ABCB1. Dicha secuencia es homóloga a ABCB4/Abcb1b (Fischer *et al.*, 2013). Por otro lado, las secuencias que codifican para los transportadores ABCC son mucho más conservadas en la evolución, y presentan pocos cambios entre taxones.

Desde el punto de vista de resistencia a xenobióticos y exportación de compuestos endógenos, los transportadores más importantes de la subfamilia ABCB son el transportador ABCB1 o Pgp1 (por su nombre en inglés, *permeability glycoprotein 1*) y el transportador de sales biliares ABCB11 o BSEP (por su nombre en inglés, *bile salt export pump*). ABCB1 constituye el primer antecedente del fenómeno MDR y su descubrimiento sirvió para explicar la baja acumulación de las drogas anticancerígenas que se usaban para el tratamiento de quimioterapia en tumores resistentes (Dano, 1972; 1973; Juliano y Ling, 1976). En peces, los ortólogos de ABCB1 están particularmente expresados en la membrana apical de los hepatocitos y enterocitos, en el riñón y en el endotelio de los capilares cerebrales (Bard *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2013; Kleinow *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002). Transportan un amplio espectro de sustratos, tales como xenobióticos que no hayan sido modificados por reacciones de fase I o II, moléculas ligeramente hidrofóbicas, anfipáticas o neutras, o moléculas orgánicas cargadas positivamente (Litman *et al.*, 2001). Por otro lado, los transportadores ABCB11 son específicos de

sales biliares y por lo general su expresión esta mayormente restringida al hígado (Trauner y Boyer, 2003).

Las proteínas de la subfamilia ABCC transportan aniones orgánicos, *e.g.* sales biliares, nucleótidos, cloruros y xenobióticos diversos. Estos transportadores también reciben el nombre de “proteínas asociadas a la resistencia a múltiples drogas” (MRP por su nombre en inglés, *multiresistance associated proteins*) y se citan al menos cinco transportadores que cumplen con esta función: ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4 y ABCC5 (Cole *et al.*, 1992; Evers *et al.*, 1998). La mayoría de los sustratos de estos transportadores son productos de reacciones de fase I y/o fase II. ABCC1 y ABCC2 transportan en mayor medida compuestos sulfatados o conjugados con GSH y glucurónidos (Deeley *et al.*, 2006). En peces, ABCC1 se encontró expresado mayoritariamente en riñón, aunque dependiendo de la especie, se lo pudo encontrar también en hígado, branquias e intestino, en una localización predominantemente en la membrana basolateral de las células (Costa *et al.*, 2012a; b; Loncar *et al.*, 2010). En tanto que ABCC2 se expresa fuertemente en riñón, intestino e hígado, donde se localiza en la membrana apical de las células (Cai *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2007; Paineofilú *et al.*, 2019). Los transportadores ABCC3, ABCC4 y ABCC5 se expresan mayoritariamente en la membrana basolateral (Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2006). En particular, tanto ABCC3 como ABCC4 poseen mayor afinidad por conjugados con glucurónidos que por conjugados con GSH, en comparación con ABCC1 o ABCC2 (Deeley *et al.*, 2006).

El miembro más estudiado de la subfamilia ABCG es el transportador ABCG2, también conocido como “proteína de resistencia al cáncer de mama” (BCRP pro su nombre en inglés, *breast cancer resistance protein*) (Doyle *et al.*, 1998; Doyle y Ross, 2003). ABCG2 está asociado al transporte de una gran variedad de drogas utilizadas en la quimioterapia, como mitoxantrona y doxorubicina, y también al transporte de conjugados de aniones orgánicos, como conjugados sulfatados de esteroides y conjugados de xenobióticos con GSH y glucurónidos (Chen *et al.*, 2003; Mao, 2005). En peces, este transportador se encuentra expresado en mayor medida en intestino, riñón, hígado y la barrera hematoencefálica (Garg *et al.*, 2015; Loncar *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2017).

La amplia distribución en diferentes tejidos epiteliales y la ubicación apical en células polarizadas, *e.g.* los hepatocitos del hígado o los enterocitos del intestino, les otorga a las proteínas ABCB1, ABCC2 y ABCG2, un rol de barrera defensiva frente a distintos xenobióticos, ya que pueden exportarlos hacia el lumen intestinal o el canalículo biliar (Epel *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2014). En cambio, los transportadores ABCC1, ABCC3, ABCC4 y ABCC5, por su ubicación basolateral, podrían exportar xenobióticos conjugados hacia la circulación sistémica, protegiendo a la célula pero comprometiendo al organismo o favoreciendo su metabolismo y excreción en otro órgano. Se ha sugerido que ABCB1 puede transportar MCLR sin conjugar, de acuerdo su afinidad por sustratos menos polares no conjugados y por productos de reacciones de biotransformación de fase I (Amé *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha encontrado evidencia que indica que, el intestino de mamíferos y peces posee una gran capacidad para funcionar como una barrera activa de defensa frente a diversos xenobióticos, mediante el sistema GST-ABCC2 (Chan, *et al.*, 2004; Mottino *et al.*, 2000). Este sistema se ha sugerido como responsable de la detoxificación de MCLR en *O. mykiss* y *Odontesthes hatcheri* (Bieczynski *et al.*, 2014; 2016), y de As^{III} en *O. mykiss* (Painefilú *et al.*, 2019).

Muchos de los xenobióticos pueden actuar como inhibidores de la actividad de los transportadores del sistema MXR. Se pueden dividir en dos categorías, inhibidores competitivos e inhibidores no competitivos. Los inhibidores competitivos son sustratos del transportador y poseen alta afinidad por el sitio de unión, de forma que impiden la unión y el transporte de otros sustratos. De esta manera ralentizan la detoxificación de los mismos, aumentado su acumulación y los efectos que pueden producir en la célula. Estos inhibidores competitivos reciben el nombre de quimiosensibilizadores y fueron descritos en primera instancia, en relación con la inhibición del transporte de ciertos fármacos utilizados en la quimioterapia (Bard, 2000; Epel *et al.*, 2008). Los inhibidores no competitivos pueden bloquear la actividad ATPasa de los transportadores, produciendo un efecto alostérico a través de diferentes vías regulatorias (Smital *et al.*, 2004).

En otro sentido, ciertos xenobióticos actúan como activadores del transporte, dado que aumentan la expresión génica de las proteínas

transportadoras, en forma directa o indirecta, o afectan la regulación postraduccional de las mismas, *e.g.* inserción en membrana o activación/inactivación por fosforilación/desfosforilación (Stolarczyk *et al.*, 2011). En hígado de killifish (*Fundulus heteroclitus*) e intestino medio de *O. mykiss*, se ha demostrado que As^{III} aumenta la expresión génica de ABCC2, luego de 48 h de exposición *in vivo* (Painefilú *et al.*, 2019; Shaw *et al.*, 2007). Además, este incremento en la expresión de ABCC2 en intestino de *O. mykiss* está asociado con un aumento en el transporte de sustratos de esta proteína y en la resistencia a la toxicidad de MCLR (Painefilú *et al.*, 2019). Por otro lado, Miller *et al.* (2007) demostraron que As^{III} modula la actividad de ABCC2 en túbulos renales de *F. heteroclitus* por un mecanismo postraduccional. En cuanto a las cianotoxinas, se sabe muy poco acerca de cómo pueden modificar los sistemas de detoxificación. Más aún, se desconoce si la presencia de una cianotoxina en particular puede afectar el metabolismo y excreción de otras cianotoxinas.

1.7. Problemática de las cianobacterias en Argentina

En Argentina, se han registrado casos de intoxicación por floraciones desde 1944, cuando ocurrió un evento de mortandad masiva de animales de granja y silvestres, que habían bebido agua de un lago donde se desarrollaba una floración de *Dolichospermum* (Mullor, 1945). Desde ese momento, se han registrado casos de mortandad de peces (Ringuelet *et al.*, 1955) y floraciones varias en distintos puntos del país (Aguilera *et al.*, 2018, Echenique *et al.*, 2014) (figura 2). De acuerdo a la literatura, las regiones más afectadas por floraciones de cianobacterias en Argentina, de mayor a menor, son la región Chaco-pampeana, las Sierras Peripampeanas y el norte de la Meseta Patagónica. Los géneros detectados hasta el momento pertenecen a los órdenes Chroococcales (*Microcystis* y *Radiocystis*), Nostocales (*Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis* y *Raphidiopsis*), Oscillatoriales (*Oscillatoria*, *Planktothrix* y *Pseudoanabaena*) y Synechococcales (*Coelosphaerium*, *Planktolyngbya*, *Cyanodictyon*, entre otros) (Aguilera *et al.*, 2018).

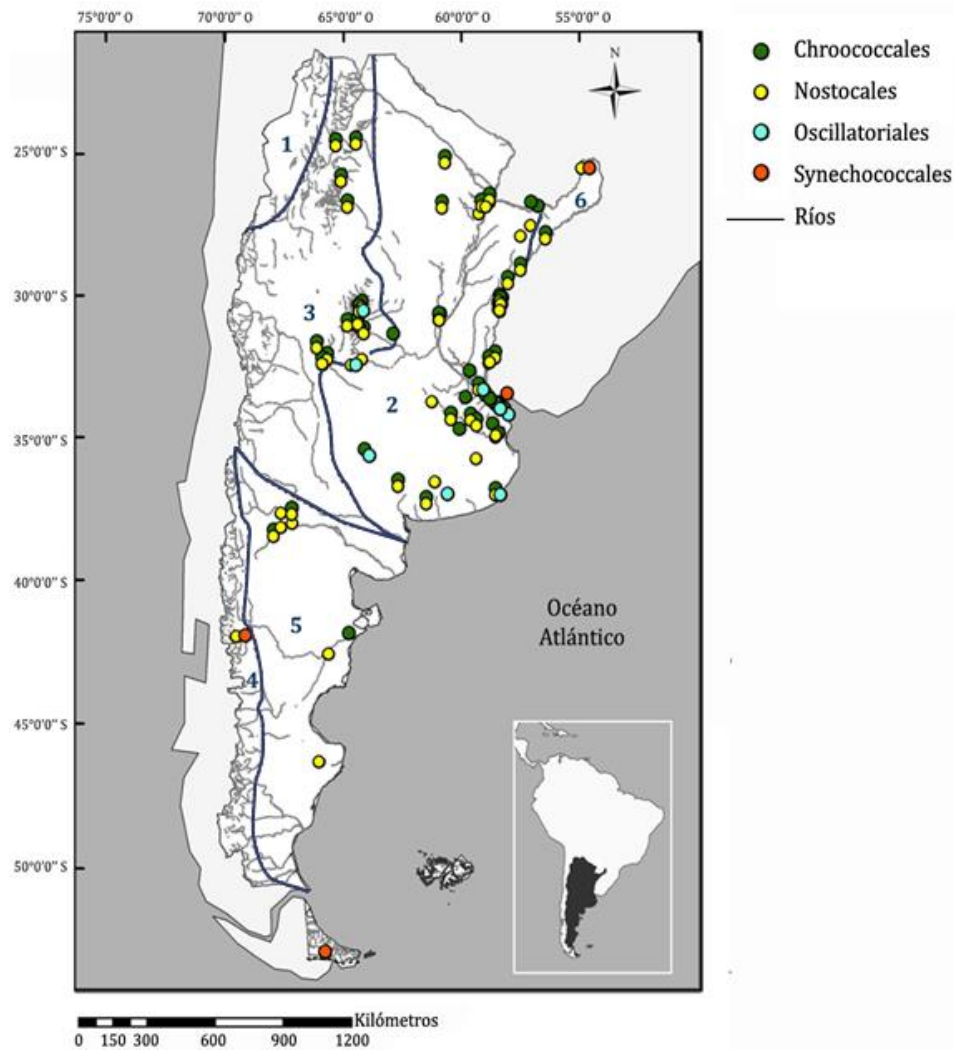


Figura 1.2. Mapa de distribución de las floraciones de cianobacterias informadas en Argentina, durante el periodo 1945–2014, donde se detallan los géneros hallados. Los números indican las regiones geográficas definidas por Quirós y Drago (1999): 1. Puna; 2. Planicie Chaco-Pampeana; 3. Sierras Peripampeanas; 4. Patagonia Andina; 5. Meseta Patagónica; 6. Meseta Misionera. Modificado de Aguilera *et al.* (2018).

Las cianotoxinas detectadas en mayor medida son las MC, y en menor grado las neurotoxinas ANTX, STX y la citotoxina CYN. Por ejemplo, MCLR se ha detectado en concentraciones desde $8,6 \mu\text{g L}^{-1}$ a $37,7 \mu\text{g L}^{-1}$, en floraciones asociadas a *M. aeruginosa*, en la cuenca del río Paraná (Giannuzzi *et al.*, 2012; Forastier *et al.*, 2016) y $48,6 \mu\text{g L}^{-1}$ en la represa de Salto Grande, asociadas a *M. aeruginosa* y *M. wesenbergii*. En cuanto a neurotoxinas, existe un claro antecedente de detección de STX en la cuenca del Río Salado, asociado a *Raphidiopsis curvata*, *R. mediterranea*, *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Planktothrix agardhii*, con una concentración de $105,33 \mu\text{g STXeq L}^{-1}$ (Otaño, 2009). Este antecedente es el primero reportado para ambientes de agua dulce de Argentina. En el Mar

Argentino, se ha informado de numerosas floraciones y eventos tóxicos relacionados con el dinoflagelado *Alexandrium tamarense/catenella* (Montoya, 2019), donde se registraron concentraciones desde los 110 hasta los 1270 mg STXeq kg⁻¹, en bivalvos costeros y marinos (Benavides *et al.*, 1995; Carreto *et al.*, 1981, 1998; Santinelli, 2013).

La escasa información presentada en los reportes y trabajos de investigación acerca de la presencia de neurotoxinas con respecto a la disponible para MC, en Argentina, puede estar condicionada a que existe un mayor número de laboratorios enfocados en la detección de MC que en otras cianotoxinas (Aguilera *et al.*, 2018). El hecho de que existan géneros potencialmente productores de otras toxinas, además de las MC, es un indicio de que las mismas pueden estar presentes en las floraciones y no están siendo detectadas. En Sudamérica, se han reportado numerosos casos de detección de ANTX, STX, anatoxina-a(s) y CYN (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2011; 2014; Bonilla *et al.*, 2016; Monserrat *et al.*, 2001; Mowe *et al.*, 2015), por lo que es de esperar que estas cianotoxinas se encuentren presentes en Argentina, en mayor medida de lo que se ha evidenciado hasta ahora. Por lo tanto, las neurotoxinas deben ser tenidas en consideración a la hora de evaluar efectos tóxicos sobre los organismos expuestos a floraciones.

En este trabajo de tesis se define a la zona norte de la Meseta Patagónica y de la Patagonia Andina como región Norpatagónica. En ella, se han detectado floraciones de *Dolichospermum circinale*, *D. flos-aquae*, *D. spiroides*, *D. lemmermannii* y *Aphanizomenon sp.*, siendo todas estas especies potenciales productoras de MC y neurotoxinas, *e.g.* STX (Alcalde *et al.*, 1996; Echenique *et al.*, 2014; Otaño *et al.*, 2012, Pizzolon, 1999). El primer evento de floraciones de cianobacterias tóxicas se detectó en 1978, en el río Limay (38°59'35" S, 68°00'18" O), a partir del cual se han sucedido numerosos eventos de floraciones a lo largo del tiempo (Alcalde *et al.*, 1998; Guarrera *et al.*, 1995; Guarrera y Echenique, 1981). Otros cuerpos de agua afectados por las floraciones en la región son los embalses del río Limay, *e.g.* Ramos Mexía (39°17'00" S, 68°48'00" O) y Mari Menuco (38°35'49" S, 68°32'41" O), este último ubicado en la cuenca del río Neuquén (Alcalde *et al.*, 1996; Othaz Brida *et al.*, 2010).

Desde 1995, se han implementado varios programas dedicados al monitoreo de las floraciones, llevados adelante por la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro (AIC), en conjunto con otros organismos del área temática. Durante el desarrollo de estos programas de monitoreo, se ha utilizado el criterio de densidad algal para determinar la toxicidad de las floraciones. Uno de estos programas se enfocó en el monitoreo en sectores clave del río Limay, desde el Embalse Arroyito hasta la ciudad de Neuquén. En el mismo, se detectaron especies tóxicas pertenecientes al ensamble *Dolichospermum spp.*, cuya densidad algal osciló ente 1100 y 3500 células mL⁻¹, en promedio, dependiendo de la época del año (Echenique *et al.*, 2014). A partir de ensayos de toxicidad aguda realizados en ratón, donde los mismos murieron luego de 70 minutos de ser inyectados, se determinó la presencia de neurotoxinas (Alcalde *et al.*, 1996). En otro monitoreo, realizado entre 2005 y 2010, se detectaron floraciones de *D. circinale*, *D. spiroides* y *D. lemmermannii*, cuyas densidades algales oscilaron entre 500 y 2000 células mL⁻¹ (Othaz Brida *et al.*, 2010).

Recientemente, en muestreos realizados sobre el río Chimehuín (40°01'28" S, 71°05'29"O), entre diciembre de 2016 y abril de 2017, se determinó la presencia de *Planktothrix agardhii* (Iummato *et al.*, 2018). Esta cianobacteria es un posible productor de MCLR, aunque no se encontraron floraciones en la región. En este trabajo se analizó la actividad de la enzima PP1, en un homogenato de hígado de *O. mykiss*, empleando agua filtrada del sitio donde se hallaron las cianobacterias. La actividad de la enzima se inhibió 14% en relación con el control, lo que indicaría la presencia de MC en este cuerpo de agua.

Si bien los eventos descriptos no significaron un problema para el abastecimiento de agua potable de la región (Iummato *et al.*, 2018; Othaz Brida *et al.*, 2010), se debe tener en consideración la presencia de géneros potencialmente tóxicos, cuyos efectos nocivos pueden incrementarse en el contexto de cambio climático. Este fenómeno y el aporte de nutrientes derivado de la actividad humana sugieren la potencialidad de que una o varias de estas toxinas se hagan presentes en concentraciones significativas.

Objetivo General

En esta tesis se plantea investigar la toxicocinética y los mecanismos implicados en la detoxificación de cianotoxinas potencialmente presentes en las floraciones de cianobacterias que ocurren en ambientes de agua dulce norpatagónicos, como MCLR y PST, en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*. Se estudiarán las respuestas de las proteínas involucradas en la biotransformación y transporte asociadas con el sistema MXR, a fin de interpretar sus efectos individuales y combinados.

Objetivos particulares

1. Evaluar los efectos de las PST sobre marcadores de daño intracelular y estrés oxidativo y sobre el sistema MXR en el intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*.
2. Estudiar los efectos citotóxicos de MCLR en exposiciones *in vivo* de corto término y sus efectos sobre la modulación del sistema MXR.
3. Estudiar los efectos individuales y combinados de MCLR y PST sobre marcadores citotóxicos y de estrés oxidativo, y sobre el transporte de xenobióticos en intestino de *Oncorhynchus mykiss*.

Hipótesis general

Las cianotoxinas presentes en los cuerpos de agua dulce de Norpatagonia son capaces de afectar la función del intestino medio de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, interfiriendo con los mecanismos de resistencia a múltiples xenobióticos y produciendo efectos citotóxicos en los enterocitos.

2. Metodología general

2.1. Reactivos

Los extractos de PST se purificaron a partir de floraciones de *Alexandrium catenella* y *A. ostenfeldii* de las costas de Escocia, en el mar del Norte y fueron provistos gentilmente por el Dr. Bernd Krock del *Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research*. El extracto de MCLR se purificó a partir de una floración de *Microcystis aeruginosa* en el Rio de la Plata y fue provista gentilmente por la Lic. Carolina González (AYSA). CDNB, MK571, GSH, ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), ditioneitol (DTT), albúmina de suero bovino (BSA), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida, NADPH), colorante rojo neutro, colorante azul tripán (*Trypan blue*) y 2',7'-Diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) se compraron a Sigma-Aldrich (St Louis, MO). El GSSG se adquirió de Santa Cruz Biotechnology (USA). Tris (hidroximetil) aminometano (Tris), fue comprado a Serva (Alemania). El ácido 5-Sulfosalicílico (SSA) se compró a Mallinckrodt Chemicals (Irlanda). El reactivo Folin Ciocalteu se compró a Biopack (Argentina). El ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) y el ácido acético se adquirieron en Cicarelli (Argentina). Ácido tricloroacético (TCA), ácido tiobarbitúrico (TBA), para-nitrofenil fosfato sal disódica (pNPP), MgCl₂ y HCl se compraron a Merck (Alemania). butilhidroxitolueno (BHT). El dimetil-sulfóxido (DMSO) y el KCl se adquirieron en Anedra (Argentina). MnCl₂ se compró a Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ). El citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇) se compró a Stanton (Argentina). *Lysing matrix D* se compró a MP Biomedicals (USA).

2.2. Peces

Para todos los experimentos, se utilizaron ejemplares de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de la piscicultura del Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), Junín de los Andes, Argentina. Hasta el momento del experimento, los peces se mantuvieron en acuarios (8 kg m⁻³), con circulación continua de agua proveniente del río Chimehuín, con niveles óptimos de oxigenación. La dieta general de los peces consistió en alimento balanceado comercial para trucha (Ganave). Antes de cada experimento, los peces se mantuvieron en ayuno durante 24 horas. Los protocolos de todos los diseños experimentales y la manutención de los animales en laboratorio fueron aprobados

por el comité de bioética de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina (6060/116).

El tamaño de los peces que se utilizaron dependió de cada experimento y será detallado en los capítulos correspondientes. Los peces se trasladaron desde la piscicultura hasta el laboratorio para ser sacrificados y extraerles el intestino medio. El sacrificio se realizó por medio de un golpe en la cabeza y decapitación, seguida de la ruptura inmediata del centro nervioso por medio de un corte longitudinal. Para asegurar la viabilidad del intestino medio, se procuró realizar la disección en condiciones de frío y utilizando solución salina para peces (solución Cortland, ver tabla 1), también en frío. Esta misma solución se utilizó para realizar varios enjuagues del intestino, para así remover el contenido remanente. Se definió como intestino medio a la sección comprendida entre los ciegos pilóricos (intestino anterior o sección proximal) y la porción más gruesa del tracto digestivo (intestino posterior) (figura 2.1).

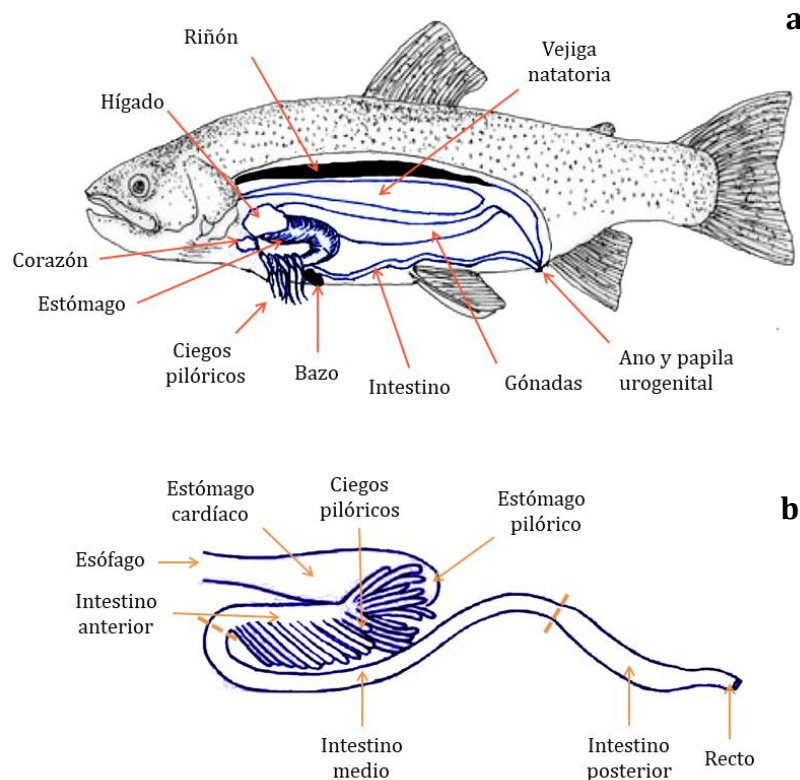


Figura 2.1. Esquema general de las vísceras (a) y detalle del tracto digestivo (b) en *Oncorhynchus mykiss*. Líneas intermitentes indican los límites del intestino medio. Modificado de Kamalam *et al.* (2020) y Woynarovich *et al.*, (2011).

2.3. Modelos experimentales

El uso de diferentes modelos permite abordar distintos enfoques desde los más globales, como los efectos de la toxina aplicada en el alimento y la biotransformación de las toxinas acoplada a su transporte en el órgano entero, hasta los más detallados como la detección de efectos intracelulares puntuales en enterocitos aislados. Las exposiciones a las cianotoxinas se realizaron *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, dependiendo del experimento. Las preparaciones *ex vivo/in vitro* se usaron para estudiar los efectos de MCLR y PST en un intervalo muy corto de tiempo, como 1 h de exposición, sobre las proteínas de transporte, de biotransformación y marcadores intracelulares. La elección de los modelos *ex vivo/in vitro* a utilizar supone ventajas y desventajas dependiendo de la variable a medir. Para ciertas variables, como el transporte de 2,4-dinitrofenil-S-glutatión (DNP-SG), que sirve para estimar actividad de transportadores ABCC, o la determinación de la actividad enzimática, es conveniente utilizar preparaciones como los segmentos intestinales, las tiras de intestino o el epitelio aislado de la capa muscular (modelos *ex vivo*). En cambio, para variables como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o la estabilidad de la membrana lisosomal, el uso de suspensiones de células aisladas (modelos *in vitro*) resulta más adecuado.

2.3.1. Segmentos intestinales

Este tipo de preparaciones permite obtener información más específica acerca de los efectos que las toxinas pueden producir sobre la actividad de los transportadores ABCC, distinguiendo entre la cara apical (luminal) y la cara basolateral del intestino. La confección de estas preparaciones se realizó siguiendo el protocolo de Bieczynski *et al.* (2014). Los segmentos evertidos se utilizaron para estudiar el transporte apical, los segmentos no evertidos se usaron para estudiar el transporte basolateral. Para ambos tipos de preparaciones, luego de la disección, se limpió íntegramente el contenido del segmento intestinal por lavado con solución Cortland y se lo cortó transversalmente en dos partes, una para ser utilizada como control y otra para ser expuesta a la toxina. Los segmentos no evertidos se ligaron por ambos lados a fin de aislar el interior del exterior. Para la preparación de los segmentos evertidos, se introdujo una aguja de crochet dentro

del segmento, para ligarla a uno de los extremos y de esta forma evertirlo suavemente, haciendo uso de una pinza de precisión para manipular el extremo contrario. Una vez que evertido, el segmento también se ligó por ambos lados. Según correspondiera, el segmento se rellenó con solución Cortland sola o con el agregado de la toxina correspondiente, mediante una jeringa tipo Hamilton (Kloehn #3500), provista de una cánula de Teflón.

2.3.2. Tiras intestinales

Este tipo de preparaciones permiten trabajar con baños de incubación de volumen pequeño, lo que posibilita utilizar menor cantidad de reactivos y de toxina. Por otro lado, permite utilizar menos cantidad de individuos por cada experimento, debido a que de un sólo intestino se pueden obtener varias preparaciones y realizar experimentos de medidas repetidas como, por ejemplo, 2 tratamientos control + 6 concentraciones de toxina.

Para la preparación de las tiras intestinales se abrió el intestino en forma longitudinal, se limpió el contenido y se lo cortó en tiras longitudinales. Cada tira se pesó en una balanza de precisión. Cuando se utilizaron peces pequeños (*e.g.* 10 g), el intestino se abrió y se utilizó como una única preparación o a lo sumo se dividió sólo en dos tiras.

2.3.3. Epitelio aislado

El intestino medio de *O. mykiss*, de apical a basolateral, está compuesto por *tunica mucosa*, *tunica submucosa*, *tunica muscularis* y *tunica serosa* (Vendile *et al.*, 2020; Wilson y Castro, 2011) (figura 2.2a). En este trabajo se define como “epitelio aislado” a las preparaciones de intestino medio que consisten sólo de la *tunica mucosa* del intestino, que comprende a los enterocitos y la *lamina propia* (figura 2.2b). La remoción de la capa muscular asegura un acceso más directo de toxinas y reactivos a la cara basolateral del epitelio. Esto resulta especialmente importante cuando se trabaja con toxinas que pueden unirse a componentes de la capa muscular, *e.g.* las PST, que se pueden unir a canales activados por voltaje, de sodio, potasio o calcio, que están presentes en células musculares y nerviosas.

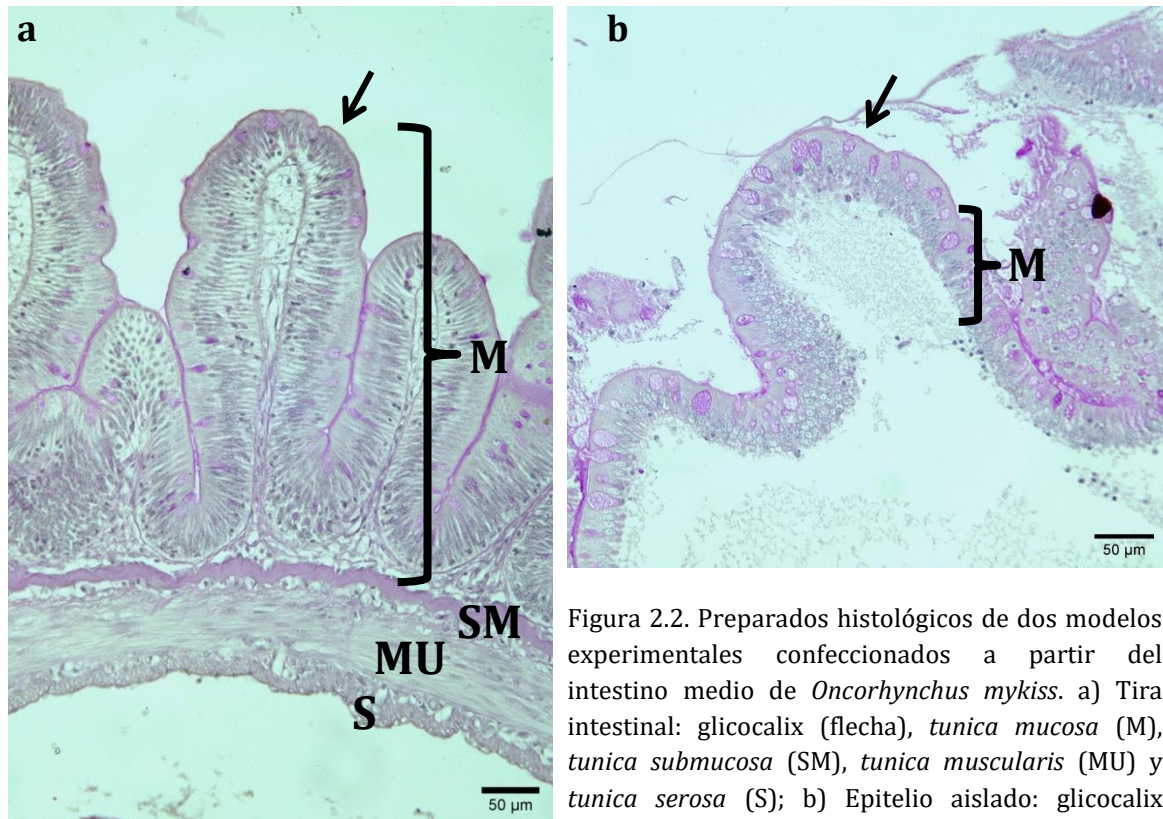


Figura 2.2. Preparados histológicos de dos modelos experimentales confeccionados a partir del intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*. a) Tira intestinal: glicocalix (flecha), *tunica mucosa* (M), *tunica submucosa* (SM), *tunica muscularis* (MU) y *tunica serosa* (S); b) Epitelio aislado: glicocalix (flecha) y *tunica mucosa* (M) (PAS 200 x).

Con el objetivo de determinar la viabilidad y factibilidad del uso de epitelio aislado, se realizaron ensayos donde se midió la tasa de transporte de DNP-SG de estas preparaciones y se la comparó con las tiras intestinales. De acuerdo a los resultados observados, las lecturas que se obtienen con el epitelio aislado son más sensibles que con las tiras intestinales ($t_6 = 6,80$, $p < 0,001$, $n = 4$, figura 2.3a). También se midió el contenido de proteínas en el baño de incubación, para comprobar que no hubiera una cantidad significativa de proteínas provenientes de la ruptura de células y que pudieran generar interferencias. Con este ensayo se corroboró que el procedimiento de separación del epitelio de la capa muscular fue efectivo y sin rotura aparente de los enterocitos ($t_8 = 6,12$; $p < 0,001$, $n = 9$, figura 2.3b).

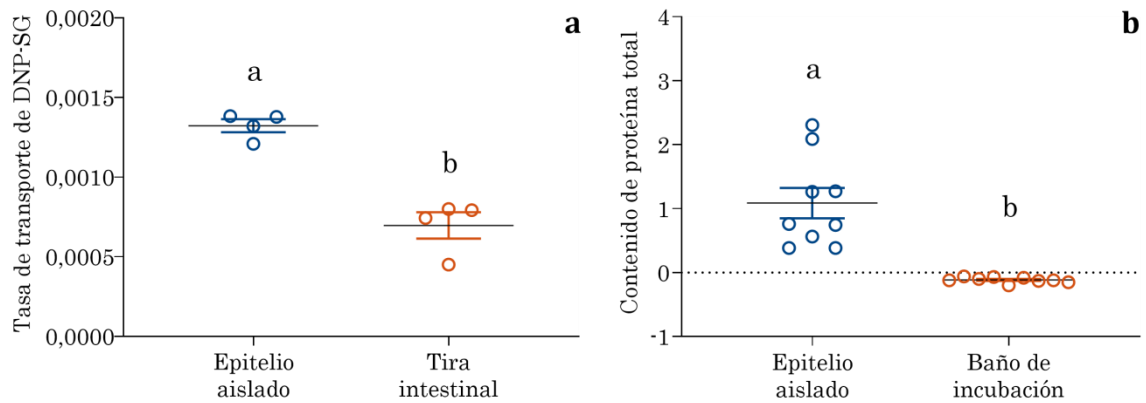


Figura 2.3. a) Tasa de transporte de DNP-SG en epitelio aislado y tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*. Los datos se expresan como nmol DNP-SG min⁻¹ mg proteína⁻¹ (n = 4). b) Contenido de proteína total en epitelio aislado de intestino medio y en el baño de incubación *ex vivo*. Los datos se expresan como mg de proteína (n = 9). Todos los resultados están expresados como media \pm EE. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre determinaciones ($p < 0,001$).

Para separar el epitelio intestinal de la capa muscular, se cortaron tiras intestinales como se describe en la sección 2.3.2. De cada tira, se separó el epitelio del resto de los tejidos del intestino, utilizando una lámina de PVC de 170 μ m de grosor. Estas preparaciones se manipularon cuidadosamente con pinzas de precisión debido a su gran fragilidad. Es importante destacar que este procedimiento sólo se pudo realizar con éxito en intestinos provenientes de peces de más de 50 g. En peces de menor talla, el tamaño del intestino es muy pequeño para lograr separar, en forma íntegra, el epitelio del resto de los tejidos que componen el intestino.

El epitelio retiene cierta cantidad de líquido en exceso, que en parte, ayuda a mantener la integridad del tejido y no se puede eliminar, por lo tanto, no se puede pesar con precisión. Por esta razón, los resultados obtenidos en los experimentos se estandarizaron en base al contenido total de proteínas (sección 2.5.8). Para ello, el epitelio se homogeneizó en buffer Tris 40 mmol L⁻¹ + KCl 150 mmol L⁻¹, pH 8,6, con un homogeneizador eléctrico Cole-Parmer® 10000 a 33000 rpm (50-60 Hz).

2.3.4. Células aisladas

Utilizar células aisladas abre la posibilidad de medir variables que, por los protocolos que se utilizan, serían imposibles de determinar con otros modelos de

exposición o conllevarían a un gran error de medición. Este es el caso de la estabilidad de la membrana lisosomal, donde la permeabilidad del colorante es mayor cuando las células están disgregadas en una suspensión y puede observarse la coloración de cada célula individual. Lo mismo sucede con la producción de ROS, que también puede medirse en homogenatos, aunque la realización del mismo puede disparar la producción de ROS, generando resultados artificiales. En la figura 2.4 se muestra una suspensión de enterocitos aislados, en un microscopio óptico Olympus a 400 x.

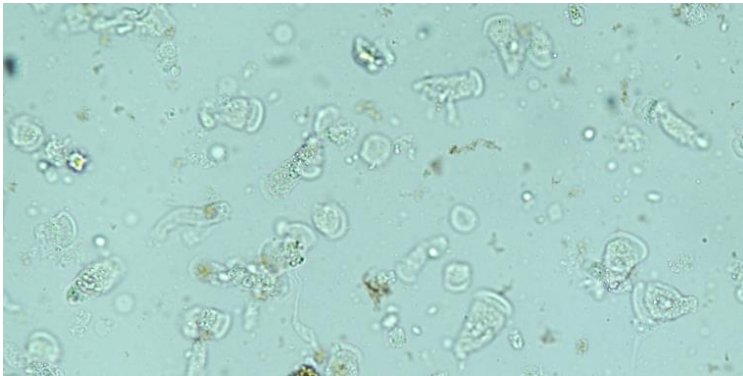


Figura 2.4. Suspensión de enterocitos aislados a partir de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* Colorante rojo neutro (400 x).

Las suspensiones de enterocitos aislados se prepararon de acuerdo al protocolo de Kwong y Niyogi (2012) con algunas modificaciones. El intestino medio se cortó en tiras, que luego se incubaron durante 5 min en 5 mL de buffer citrato, pH 7,4 y durante 20 min en 5 mL en buffer de aislación, pH 7,4 (tabla 1). Ambas incubaciones se realizaron dentro de placas de Petri, en condiciones de frío y agitación. Al concluir la incubación con buffer de aislación, los enterocitos se separaron de la capa muscular mediante un raspador de células. En forma muy cuidadosa, los cúmulos de células remanentes se separaron con una pipeta Pasteur y se filtró la suspensión en un filtro descartable de poliéster de 200 μm . La suspensión se centrifugó a 600 x g durante 4 min, a 4°C. Al finalizar la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se agregó solución Cortland, con el objetivo de lavar el buffer de aislación y deshacerse de los restos de células rotas. Esta operación se repitió 3 veces, siempre en condiciones de frío. Al finalizar los lavados, el pellet se resuspendió una vez más en solución Cortland y se filtró a través de un filtro descartable de poliéster de 75 μm . Esta suspensión de células se utilizó para los experimentos. La viabilidad y la densidad celular se estimaron a

partir del método de exclusión de azul tripán (0,1%), en una cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad, por medio de un microscopio óptico Olympus a 400 x. En promedio, la viabilidad celular luego del procedimiento siempre fue superior al 90%.

Tabla 1. Composición de la solución Cortland y de los buffers usados en los experimentos. Se expresan concentraciones en mmol L⁻¹.

Solución Cortland		Buffer citrato		Buffer de aislación	
pH = 7,4		pH = 7,4		pH = 7,4	
NaCl	159,90	NaCl	96,00	NaCl	154,00
KCl	2,55	KCl	1,50	Na ₂ HPO ₄	10,00
CaCl ₂	1,56	KH ₂ PO ₄	8,00	EDTA	2,00
MgSO ₄	0,93	Na ₂ HPO ₄	5,60	DTT	2,00
NaH ₂ PO ₄	2,97	Citrato Na ₃	27,00	Glucosa	5,50
NaHCO ₃	5,00				
Glucosa	5,55				

2.4. Transporte de DNP-SG

La actividad de los transportadores ABCC se estimó a través de la medición de la tasa transporte de DNP-SG, un sustrato específico de esta superfamilia de proteínas (Evers *et al.*, 2000; Gotoh *et al.*, 2000, Mottino *et al.*, 2001; Rebbeor *et al.*, 2000). El DNP-SG se forma a partir de la conjugación de CDNB con GSH, en una reacción catalizada por la enzima GST. El CDNB puede difundir a través de la membrana celular pero, una vez conjugado, sólo se exporta a través de ABCC y se puede detectar espectrofotométricamente (Bieczynski *et al.*, 2014).

El transporte de DNP-SG se determinó en preparaciones de segmentos intestinales, tiras intestinales y epitelio aislado. Todas ellas, se incubaron en tubos con 3 mL de solución con CDNB 200 mmol L⁻¹ en solución Cortland sola (controles) o con el agregado de la toxina a estudiar (tratados). Cada 5-10 min, se tomaron muestras de 1 mL del baño de incubación para medir la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Hach DR3000 (Bieczynski, 2014). Luego de cada medición,

la muestra se devolvió al baño para mantener constante el volumen de trabajo. Durante todo el tiempo que duró el experimento (70 min), los tubos se mantuvieron con aireación constante para mantener niveles constantes de oxígeno y asegurar la mezcla de los solutos. La identidad del producto detectado como DNP-SG por espectrofotometría en este tipo de experimentos con intestino de *O. mykiss*, fue comprobada previamente por HPLC, utilizando un estándar de DNP-SG (Bieczynski et al., 2014). La tasa de transporte de DNP-SG se calculó a partir de la pendiente de absorbancia acumulada vs. tiempo, el coeficiente de extinción molar del DNP-SG ($9,6 \text{ mmol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el camino óptico de la cubeta (1 cm). Este resultado se refirió a los g de tejido o al contenido de proteínas, según el tipo de preparación, como se describe en las secciones anteriores. Los cálculos descriptos se resumen en la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de transporte DNP-SG} = \frac{\text{Pendiente} \times \text{Vol. cubeta} \times \left(\frac{\text{Vol. baño}}{\text{Vol. muestra}} \right) \times \epsilon \times \text{Camino óptico}}{\text{mg de proteína o g de tejido}}$$

(nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹)
(nmol min⁻¹ g tejido⁻¹)

$$\epsilon = \text{Coeficiente de extinción molar del DNP-SG} = 9,6 \text{ mmol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Camino óptico = 1 cm

Como se mencionó anteriormente, la muestra para medir la absorbancia del DNP-SG se tomó siempre del baño de incubación. Esto permitió que, al utilizar distintas preparaciones de segmentos intestinales, sólo fuera necesario modificar el lugar de aplicación de la toxina. Es decir, la toxina podía estar presente en el baño de incubación o en el interior del segmento intestinal. De esta forma, los segmentos intestinales sin evertir posibilitaron estudiar la actividad de los transportadores de la cara basolateral del intestino (figura 2.5a), mientras que utilizar segmentos evertidos posibilitó estudiar la actividad de los transportadores de la cara apical (lumen intestinal, figura 2.5b). En los segmentos sin evertir, fue posible introducir la toxina en el interior del segmento, para simular una absorción desde la cara apical, o aplicarla en el baño, junto al CDNB y estudiar su posible interferencia en el transporte basolateral. De la misma forma, los segmentos evertidos permitieron estudiar los efectos sobre el transporte apical, cuando las

toxinas de aplicaron en el interior del segmento (absorción basolateral) o en el baño de incubación (absorción apical).

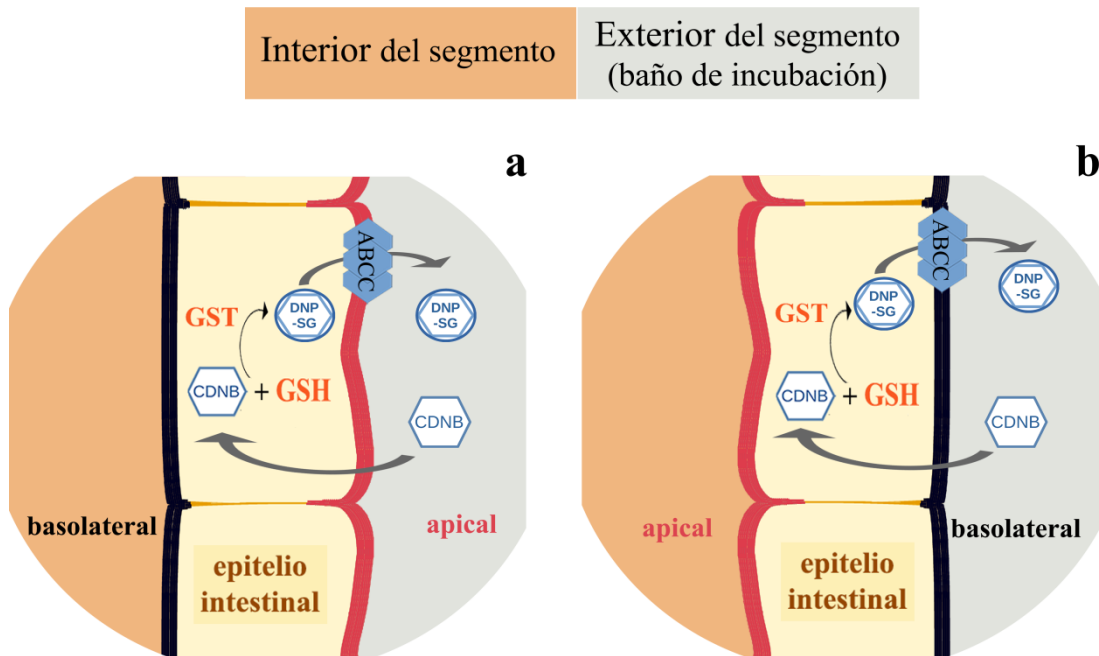


Figura 2.5. Esquema de los modelos de exposición *ex vivo* usados para el estudio polarizado del transporte de DNP-SG en el intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* a) Segmentos evertidos b) Segmento no evertidos.

2.5. Determinaciones bioquímicas

Para la mayoría de las determinaciones bioquímicas, excepto para la cuantificación de la producción de ROS, se prepararon homogenatos a partir de muestras de intestino de peces expuestos *in vivo* o de preparaciones intestinales expuestas *ex vivo* a las toxinas. Se utilizó un homogeneizador eléctrico Cole-Parmer® 10000 a 33000 rpm (50-60 Hz). Las muestras se centrifugaron a 12000 x g por 15 min, a 4°C. El sobrenadante de cada muestra se separó del pellet y se usó en las mediciones bioquímicas.

Dependiendo de la variable a medir, las muestras de intestino se homogeneizaron en un buffer adecuado para asegurar el rendimiento óptimo de la reacción bioquímica involucrada. Para estimar el contenido de GSH y la actividad de enzimas relacionadas con GSH, las muestras se homogeneizaron en buffer

K_2HPO_4 143 mmol L⁻¹ + EDTA 6,3 mmol L⁻¹, pH 7,5. Para determinar la actividad CAT y la peroxidación lipídica, las muestras se homogenizaron en buffer Tris 40 mmol L⁻¹ + KCl 150 mmol L⁻¹, mientras que para determinar la actividad proteína fosfatasa 1 (PP1), se homogenizaron en buffer Tris 40 mmol L⁻¹ + KCl 20 mmol L⁻¹ + Cl₂Mg 30 mmol L⁻¹, pH 8,6 (Stock PP1). De cada sobrenadante se reservó una fracción para medir el contenido de proteínas.

2.5.1. Contenido de Glutati6n

2.5.1.1. Glutati6n reducido (GSH)

La concentraci6n de GSH se estim6 acorde al m6todo de Ellman (1959), modificado por Venturino *et al.* (2001). El fundamento de esta t6cnica consiste en cuantificar la formaci6n de 2-nitro-5-thiobenzoato (TNB²⁻) a partir de la reacci6n del grupo tiol (SH) del GSH con el DTNB (figura 2.6). Para esta t6cnica se utilizaron las siguientes soluciones:

- ⇒ Buffer fosfato 250 mmol L⁻¹, pH 8.
- ⇒ Soluci6n sustrato: DTNB 2,6 mmol L⁻¹, disuelto en buffer fosfato 250 mmol L⁻¹, pH 8.
- ⇒ Soluciones de SSA 5 y 10 %.
- ⇒ Soluci6n est6ndar de GSH 0,8 mmol L⁻¹ en SSA 5%.

Para la determinaci6n, cada muestra se desproteiniz6 agregando partes iguales de SSA 10% (*e.g.* 100 μ L SSA 10% + 100 μ L muestra) y centrifugando a 10000 x g durante 10 min, a 4 °C. Despu6s de la centrifugaci6n, se descart6 el pellet y se utiliz6 el sobrenadante para la medici6n. Se mezclaron 300 μ L de soluci6n de DTNB y 100 μ L de sobrenadante desproteinizado y se los incub6 durante 5 min antes de la medici6n. Adem6s, se confeccion6 una curva de calibraci6n de GSH de 1 nmol L⁻¹ a 16 nmol L⁻¹, mezclando las al6cuotas correspondientes de soluci6n de GSH con 300 μ L de soluci6n de DTNB y el volumen necesario de SSA 5% para completar 400 μ L de volumen final. En todos los casos, la concentraci6n final de DTNB fue 2 mmol L⁻¹. Se utiliz6 una cubeta de vidrio de 400 μ L para leer la absorbancia a 412 nm en espectrofot6metro UV-visible. Estas mediciones se realizaron por duplicado y el resultado se refiri6 a la concentraci6n de prote6na total de la muestra. Si bien GSH no es una prote6na y lo m6s correcto hubiera sido

estandarizar por g de tejido, no es posible pesar el epitelio intestinal con precisión. Los cálculos se realizaron acorde a la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido GSH (nmol GSH mg proteína}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{ABS muestra} - \text{ABS blanco}) \times \text{Factor} \times \text{Dilución}}{\text{Vol. muestra} \times \text{mg proteína mL}^{-1}}$$

$$\text{Factor} = 1 / \text{pendiente de la curva de calibración de GSH}$$

2.5.1.2. Glutación total

Esta técnica se basa en la reducción del GSSG presente en la muestra a GSH, en una reacción catalizada por la enzima GR. A continuación, la concentración de GSH acorde al método de Ellman (1959), modificado por Venturino *et al.* (2001), como se explica en 2.5.1.1. Para esta técnica se utilizaron las siguientes soluciones:

- ⇒ Buffer fosfato de potasio 143 mmol L⁻¹ + EDTA 6,3 mmol L⁻¹ a pH 7,5.
- ⇒ Solución de reacción: NADPH 2,1 mmol L⁻¹ en buffer fosfato de potasio + EDTA a pH 7,5
- ⇒ Solución de trabajo: GR 5 U mL⁻¹ en buffer fosfato de potasio, pH 7,5.
- ⇒ Buffer fosfato 250 mmol L⁻¹, pH 8.
- ⇒ Solución sustrato: DTNB 2,6 mmol L⁻¹, disuelto en buffer fosfato 250 mmol L⁻¹, pH 8.
- ⇒ Soluciones de ácido sulfosalicílico (SSA) 5 y 10%.
- ⇒ Solución estándar de GSH 0,8 mmol L⁻¹ en SSA 5%.

Para realizar la reacción de reducción del GSSG presente en una muestra, se incubaron 50 µL de homogenato provenientes de la misma muestra utilizada en la sección 2.5.1.1, con 10 µL de solución NADPH, 10 µL de solución GR y 30 µL buffer fosfato de potasio para completar el volumen. La incubación se realizó en tubos Eppendorf, durante 30 min, por duplicado. Concluido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con el agregado de 100 µL de SSA 10%. Los tubos se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min, a 4°C. El sobrenadante resultante se utilizó para la cuantificación de GSH en forma idéntica a la descrita en la sección 2.5.1.1 mediante el uso de DTNB como sustrato. En paralelo, se realizó una curva

de GSSG a modo de control de la reacción. Los cálculos se realizaron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido total de GSH (nmol GSH mg proteína}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{ABS muestra} - \text{ABS blanco}) \times \text{Factor} \times \text{Dilución}}{\text{Vol. muestra} \times \text{mg proteína mL}^{-1}}$$

$$\text{Factor} = 1 / \text{pendiente de la curva de calibración de GSH}$$

Una vez que se estimó la cantidad de glutatión total presente en una muestra y la cantidad de GSH que se estimó en la sección 2.5.1.1, fue posible calcular la cantidad de GSSG presente en dicha muestra, despejando la ecuación:

$$\text{Glutatión total} = \text{GSH} + 2 \text{ GSSG}$$

Con el dato de GSSG también es posible calcular el balance GSH/GSSG, que aporta información acerca del estado oxidativo del órgano o del consumo de GSH por otras reacciones, *e.g.* la conjugación. En la figura 2.6 se esquematizan las reacciones bioquímicas involucradas en las determinaciones vinculadas a GSH, que se utilizaron en el presente trabajo.

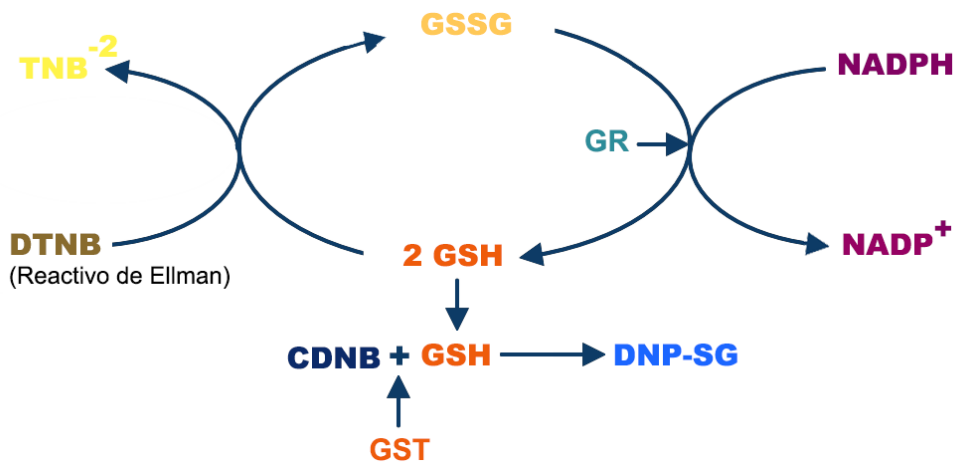


Figura 2.6. Esquema de las reacciones implicadas en las determinaciones bioquímicas relacionadas con el glutatión. 2-nitro-5-thiobenzoato (TNB⁻²), 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), glutatión oxidado (GSSG), glutatión reducido (GSH), glutatión reductasa (GR), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida, NADPH), Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidada, NADP⁺), 2,4-dinitroclorobenceno (CDNB), 2,4-dinitrofenil-S-glutatión (DNP-SG), glutatión S-transferasa (GST).

2.5.2. Actividad Glutación-S-Transferasa (GST)

La actividad de la enzima GST se estimó de acuerdo al protocolo de Habig *et al.* (1974). Se cuantifica la formación de DNP-SG a lo largo del tiempo, a partir de la conjugación entre CDNB y GSH (figura 2.6). Los reactivos utilizados fueron:

- ⇒ Buffer fosfato 100 mmol L⁻¹ a pH 6,5.
- ⇒ Solución de GSH 100 mmol L⁻¹ en buffer fosfato a pH 6,5.
- ⇒ Solución de CDNB 100 mmol L⁻¹ disuelto en etanol.

En cubetas plásticas descartables de tipo semimicro, aptas para lecturas en espectrofotómetro UV, se mezclaron 980 µL de buffer fosfato, 5 µL de solución GSH, 10 µL de muestra y 5 µL de CDNB. También se realizó un blanco de la reacción, donde se mezclaron 990 µL de buffer fosfato, 5 µL de solución GSH y 5 µL de CDNB. En ambos casos, se mezcló inmediatamente y se registró la absorbancia a 340 nm cada 30 s, durante 5 min, a 25°C. Cada muestra se midió por duplicado. Las absorbancias registradas se graficaron en función del tiempo para calcular las regresiones lineales de cada muestra. Las pendientes obtenidas se utilizaron para calcular la actividad enzimática. La misma se expresó en nmol s⁻¹ mg proteína⁻¹, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad GST} \quad (\text{nmol s}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}) = \frac{(\text{Pendiente muestra} - \text{Pendiente blanco}) \times \text{Vol. cubeta}}{\text{Vol. muestra} \times \epsilon \times \text{Camino óptico} \times \text{mg proteína mL}^{-1}}$$

$$\begin{aligned} \epsilon &= \text{Coeficiente de extinción molar del DNP-SG} = 9,6 \text{ mmol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \text{Camino óptico} &= 1 \text{ cm} \end{aligned}$$

2.5.3. Actividad Glutación Reductasa (GR)

La enzima GR cataliza la reducción de GSSG a GSH y consume NADPH como cofactor. La actividad enzimática se estimó de acuerdo al protocolo de Schaedle y Bassham (1977), con modificaciones de Venturino *et al.* (2001). El fundamento de la técnica consiste en cuantificar el consumo de NADPH, que se oxida a NADP⁺, a lo largo del tiempo (figura 2.6). Los reactivos que se utilizaron fueron:

- ⇒ Buffer fosfato de potasio 143 mmol L⁻¹ + EDTA 6,3 mmol L⁻¹ a pH 7,5.

⇒ Buffer de reacción NADPH 0,13 mmol L⁻¹ en buffer fosfato de potasio a pH 7,5.

⇒ Solución de GSSG 10 mmol L⁻¹ en buffer fosfato de potasio.

Para considerar el consumo inespecífico de NADPH, por cada medición se realizó un blanco de muestra con 340 µL de buffer de reacción y 50 µL de muestra y se registró la absorbancia del NADPH a 340 nm, cada 15 s. durante 5 min. Una vez concluida la medición, en la misma cubeta y sin descartar el contenido, se agregaron 10 µL de solución de GSSG para dar inicio a la reacción específica de la enzima GR y registrar la absorbancia durante otros 5 min, cada 15 s. Este procedimiento se realizó por duplicado. Los cálculos se realizaron en base a la pendiente que se obtiene de la regresión lineal de absorbancia en función del tiempo. Tanto para el blanco de reacción como para la medición de la actividad específica de GR en la muestra. La actividad enzimática se expresó en nmol s⁻¹ mg proteína⁻¹ y los cálculos se realizaron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad GR} \quad = \quad \frac{(\text{Pendiente muestra} - \text{Pendiente blanco muestra}) \times \text{Vol. cubeta}}{\text{Vol. muestra} \times \epsilon \times \text{Camino óptico} \times \text{mg proteína mL}^{-1}}$$

(nmol s⁻¹ mg proteína⁻¹)

ϵ = Coeficiente de extinción molar del NADPH: 6220 mol⁻¹ L⁻¹ cm⁻¹
Camino óptico = 1 cm

2.5.4. Actividad Catalasa (CAT)

La CAT es una enzima antioxidante que cataliza la descomposición del H₂O₂ en H₂O y O₂ (Claiborne, 1985). El fundamento de esta técnica consiste en cuantificar la descomposición del H₂O₂, a través del registro de la absorbancia, en función del tiempo. Esta determinación se realizó acorde al protocolo de Aebi *et al.* (1984). Para ello, se utilizaron las siguientes soluciones:

⇒ Buffer fosfato de potasio 50 mmol L⁻¹, pH 7.

⇒ Solución de H₂O₂ 0,3 mol L⁻¹.

En una cubeta de cuarzo se mezclaron 1,92 mL de buffer fosfato de potasio, 40 µL de solución de H₂O₂ y 40 µL de muestra. La mezcla se incubó durante 10 s y

se registró la absorbancia a 240 nm cada 2 s, durante 30 s, a 25°C. Con la pendiente resultante de la regresión lineal entre la absorbancia y el tiempo, se estimó la actividad enzimática, expresada como $\text{nmol s}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$. Los cálculos se realizaron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad CAT} \quad (\text{nmol s}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}) = \frac{\text{Pendiente} \times \text{Vol. cubeta}}{\text{Vol. muestra} \times \epsilon \times \text{Camino óptico} \times \text{mg proteína mL}^{-1}}$$

$$\begin{aligned} \epsilon &= \text{Coeficiente de extinción molar del H}_2\text{O}_2 = 40 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \text{Camino óptico} &= 1 \text{ cm} \end{aligned}$$

2.5.5. Peroxidación lipídica

Los lípidos son sensibles a la oxidación por ROS, la estimación de la producción de peróxidos lipídicos por la técnica de TBARS es un buen indicador del daño oxidativo a lípidos que sufre el tejido. Como resultado de la peroxidación lipídica, se forman compuestos como el malondialdehído (MDA) que, en determinadas condiciones de pH y temperatura, reaccionan con el TBA y producen un compuesto de color rosado con pico de absorción a 532 nm, que indica el contenido de sustancias reactivas al TBA (método de TBARS). Esta cuantificación se realizó acorde al protocolo de Beuge y Aust (1978), sin la cuantificación de estándar. Se utilizó la siguiente solución:

⇒ Solución de reacción con TCA 15%, TBA 26 mmol L^{-1} , HCl 2% y BHT 100 mmol L^{-1} .

En tubos Khan, se mezclaron 150 μL de sobrenadante de homogenato de muestra, 150 μL de buffer de homogeneización y 500 μL de la solución de reacción. Se incubó durante 15 min a 95°C y luego se dejó enfriar y se trasvasó a tubos Eppendorf. La incubación de cada muestra se realizó por triplicado. Los tubos se centrifugaron a 11000 x g durante 15 min. Se descartó el pellet y se utilizó el sobrenadante para las mediciones. La absorbancia se midió en una cubeta de vidrio de 400 μL a 532 nm. Los cálculos se realizaron según la siguiente fórmula:

$$\text{TBARS} \quad (\mu\text{mol mg proteína}^{-1}) = \frac{(\text{ABS muestra} - \text{ABS blanco}) \times \text{Vol. cubeta}}{\text{Vol. muestra} \times \epsilon \times \text{Camino óptico} \times \text{mg proteína mL}^{-1}}$$

$$\epsilon = \text{Coeficiente de extinción molar del MDA} = 1.56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Camino óptico} = 1 \text{ cm}$$

2.5.6. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

La producción de especies reactivas de oxígeno se estimó en suspensiones de enterocitos aislados (10^5 células viables mL^{-1}) acorde a Amado *et al.* (2009) y a Moss y Allam *et al.* (2006), con modificaciones. El fundamento de la técnica consiste en utilizar la DCFH-DA, un reactivo no fluorescente que puede difundir dentro de las células, donde es desacetilada por enzimas esterases, formando 2',7'-Diclorofluorescina (DCFH). Este compuesto se oxida rápidamente, en presencia de H_2O_2 , a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), cuya fluorescencia puede medirse a 488/525 nm de excitación/emisión. Para la medición se utilizaron las siguientes soluciones:

- ⇒ Buffer de Reacción: HEPES, 30 mmol L^{-1} ; KCl 200 mmol L^{-1} y MgCl_2 1 mmol L^{-1} , a pH 7,2.
- ⇒ Solución de DCFH-DA 0,8 mmol L^{-1} .

La reacción se realizó en tubos de reacción para el fluorómetro QUBIT®, mezclando 50 μL de suspensión de enterocitos aislados, con 10 μL de solución DCFH-DA y 140 μL de buffer de reacción. Los tubos se incubaron durante 12 min a 35°C . Finalizada la incubación, se registró la fluorescencia a lo largo del tiempo con un fluorómetro QUBIT®, con lecturas cada 10 min, durante 60 min. A partir de la regresión no lineal entre la absorbancia y el tiempo, se calculó el área bajo la curva. Los valores obtenidos se relativizaron a cada control, lo que permitió calcular el porcentaje de producción de ROS.

La concentración de células para esta medición se definió de acuerdo a ensayos previos de puesta punto (Figura 2.7). Si bien la concentración máxima de células en dicho ensayo fue de 5×10^4 , se decidió duplicar este valor para ensayos

posteriores en base a que se observó una marcada tendencia en el aumento de la sensibilidad en la detección de DCF, a medida que aumenta la cantidad de células.

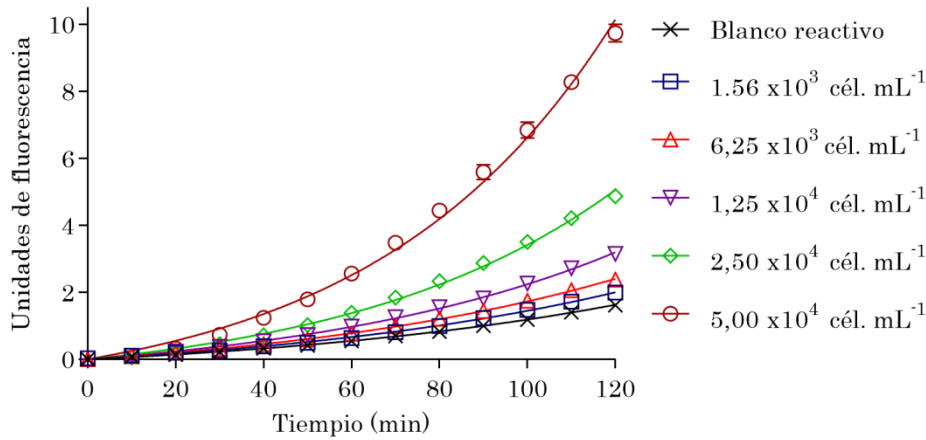


Figura 2.7. Puesta a punto de concentración de células en suspensión para el ensayo de cuantificación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Se grafican Unidades de fluorescencia vs. tiempo.

2.5.7. Actividad proteína fosfatasa 1 (PP1)

La actividad de la enzima PP1 se estimó de acuerdo a Carmichael y An (1999), con modificaciones de Bieczynski *et al.* (2013). El fundamento de la técnica consiste en registrar la formación de paranitrofenol a lo largo del tiempo a 405 nm, producto de la acción enzimática de las PP a partir del pNPP. Para esta determinación, se utilizaron los siguientes reactivos:

- ⇒ Buffer Stock PP1: Tris 40 mmol L⁻¹; KCl 20 mmol L⁻¹, MgCl₂ 30 mmol L⁻¹, pH 8,6.
- ⇒ Buffer de reacción: DTT 3 mmol L⁻¹; BSA 1,5 mg mL⁻¹; MnCl₂ 1,5 mmol L⁻¹, disueltos en buffer stock.
- ⇒ Solución de pNPP 15 mmol L⁻¹ disuelto en buffer de reacción.

Para la reacción, se mezclaron 10 µL de sobrenadante de homogenato, 90 µL de buffer de reacción y 100 µL de solución pNPP. La mezcla se incubó durante 5 min y luego se registró la absorbancia cada 5 min durante 40 min, a 22°C. Cada muestra se midió por duplicado o triplicado. A partir de la regresión lineal de la absorbancia en función del tiempo, se obtuvo la pendiente para calcular la actividad enzimática de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad PP1} \quad = \frac{\text{Pendiente} \times \text{Vol. cubeta}}{\text{Vol. muestra} \times \epsilon \times \text{Camino óptico} \times \text{mg proteína mL}^{-1}}$$

(nmol s⁻¹ mg proteína⁻¹)

$$\epsilon = \text{Coeficiente de extinción molar del pNPP} = 1800 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Camino óptico} = 0.5 \text{ cm}$$

2.5.8. Contenido de Proteínas

El contenido total de proteínas solubles de las muestras analizadas, se estimó de acuerdo al método de Lowry (1951), el cual utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu como sustrato. En medio alcalino y en presencia de tartrato, los iones de Cu⁺² forman complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos de la proteína, lo que provoca el desdoblamiento de la estructura tridimensional y deja expuestos a los residuos fenólicos de tirosina. Estos residuos producen la reducción del ácido fosfomolibdotúngstico presente en el reactivo de Folin-Ciocalteu, lo que forma un complejo de color azul, cuya intensidad estará condicionada por el contenido de proteína de la muestra. A mayor concentración de proteínas, mayor intensidad del color. Para las reacciones se utilizaron las siguientes soluciones:

- ⇒ Solución NaOH 0,2 eq. L⁻¹.
- ⇒ Solución de reacción de Lowry: Na₂CO₃ 2%, diluido en solución NaOH 0,1 eq L⁻¹; CuSO₄ 0,5%; Tartrato de potasio 1%
- ⇒ Solución de Folin-Ciocalteu 50%
- ⇒ Solución BSA 1 mg mL⁻¹

En tubos de Kant, se mezclaron, por triplicado, 100 µL de solución NaOH 0,2 eq L⁻¹, 90 µL de agua destilada y alícuotas de muestra de 5, 10 y 15 µL, a fin de corroborar la efectividad del método usando la linealidad entre alícuotas. La mezcla se incubó durante 10 min a 25°C. Transcurrido este tiempo, se agregaron 100 µL de solución de Folin-Ciocalteu y se lo dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente de 25°C. Al cabo de este tiempo, se midió inmediatamente la absorbancia a 750 nm, en una cubeta de vidrio de 1 mL. Este procedimiento se realizó para todas las muestras y para la curva de calibración de albúmina de suero

bovino. El contenido de proteína de cada muestra se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de proteínas (mg proteína mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{ABS muestra} - \text{ABS blanco}) \times \text{Factor}}{\text{Vol. muestra}} \times \text{Dilución}$$

Factor = 1 / Pendiente de la curva de calibración de albúmina

2.6. Ensayos de viabilidad celular

2.6.1. Azul tripán

El azul tripán es un colorante vital que atraviesa rápidamente las membranas de células muertas o inviables, en cambio, las células sanas no se colorean. Se ha observado que los enterocitos viables pueden absorber una pequeña porción del colorante aplicado y concentrarlo en una vesícula, mientras el resto de la célula permanece incoloro. A estos casos se los consideró como células viables. A las células que presentaban una coloración azul mucho más intensa y que abarcaba sectores fuera de la vesícula, se las consideró no viables. Esta determinación se realizó para evaluar la viabilidad de las suspensiones de enterocitos, luego del proceso de aislamiento y antes de realizar las exposiciones a las toxinas. Siempre se trabajó con suspensiones celulares que tenían una viabilidad superior al 90%.

La cuantificación de células viables se realizó de acuerdo al protocolo de Rymuszka *et al.* (2007). Se utilizó solución de azul tripán 0,2%, disuelta en solución Cortland, a 4°C. En tubos eppendorf, se mezclaron 30 µL de suspensión de enterocitos aislados y 30 µL de azul tripán. Los tubos se incubaron durante 5 min, a 4°C. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra. De cada tubo, se pipetearon 10 µL de la mezcla y se realizó el recuento en cámara de Neubauer, sin sobrepasar los 15 min de conteo por tubo. Luego del conteo, se calculó la viabilidad como porcentaje de células viables sobre el total de células. La concentración de células viables se expresó en células viables mL⁻¹.

2.6.2. Tiempo de Retención del Rojo Neutro 50 (NRRT50)

El análisis consiste en determinar el tiempo al que el 50% de las células observadas se colorean con rojo neutro. Se fundamenta en la capacidad que poseen las células viables de incorporar el colorante vital, el cual difunde en forma pasiva a través de las membranas celulares y se concentra en los lisosomas. A pH fisiológico, el rojo neutro es levemente catiónico, muy cercano a la neutralidad, pero en el interior de los lisosomas el colorante se carga positivamente y es capaz de unirse a grupos aniónicos como los fosfatos. Este cambio de carga se debe al ambiente ácido de la matriz lisosomal. Por ende, la capacidad del lisosoma de absorber y retener el colorante dependerá de su capacidad de mantener su pH.

El análisis se realizó acorde a Mamaca *et al.* (2005) y Dayeh *et al.* (2003). En tubos eppendorf, se mezclaron 50 μL de suspensión de enterocitos aislados y 50 μL de solución de rojo neutro $132 \mu\text{mol L}^{-1}$, disuelto en solución Cortland, y la mezcla se dejó incubar por 5 min, a 4°C . Este procedimiento se realizó por duplicado por cada muestra. Concluida la incubación, se tomó una alícuota de la mezcla y se la extendió sobre un portaobjetos para realizar el conteo celular con un microscopio óptico Olympus a 400 x. Cada 10 min, se contaron los enterocitos teñidos de rojo, ponderando sobre la cantidad total de enterocitos, hasta alcanzar el 50% de células coloreadas. Entre conteo y conteo, los portaobjetos se mantuvieron en cámara húmeda para asegurar la viabilidad celular y evitar que se secase el preparado. Los resultados se expresaron como NRRT50, min.

Capítulo I.

Efectos de las PST sobre marcadores de estrés oxidativo, función lisosomal y actividad de los transportadores ABCC

CI.1. Introducción

Las PST son un conjunto de neurotoxinas análogas estructurales entre sí, que bloquean canales iónicos de membrana activados por voltaje, con distinta afinidad. Poseen un anillo de tetrahidropurina en común y presentan diversas sustituciones en los carbonos 11 (C11) y 13 (C13), y en el nitrógeno 1 (N1) (figura CI.1). Las PST se clasifican en toxinas deoxydecarbamoiladas, decarbamoiladas, N-sulfocarbamoiladas, y carbamoiladas (o carbamatos) según la naturaleza del sustituyente R4 (Cusick y Sayler, 2013; FAO, 2005; Raposo *et al.*, 2020). En este capítulo, y en la tesis en general, se usaron extractos de PST que contenían principalmente toxinas N-sulfo-carbamoiladas (B1 y C1/C2) y carbamoiladas (GTX 1/4, GTX 2/3, NeoSTX y STX) (Tabla CI.1). De todas ellas, la STX y la NeoSTX son consideradas las más neurotóxicas, dada su alta afinidad por los canales de sodio activados por voltaje (Thottumkara *et al.*, 2014). Esta afinidad se debe a los grupos de guanidina, cargados positivamente y a los grupos hidroxilo que posee la molécula (Ritchie y Rogart, 1977; Shen *et al.*, 2018) y se reduce en la medida que se agregan sustituyentes, especialmente cuando están presentes grupos sulfatados en el C11 (Llewellyn, 2006; Vale, 2008)

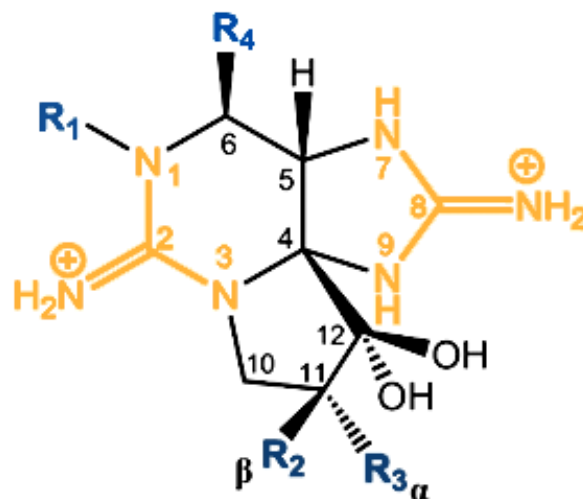


Figura CI.1. Estructura básica de las PST, donde se identifican los principales sitios de sustitución, R1-4 (en azul) y los grupos funcionales de guanidina (en naranja). Modificado de Raposo *et al.* (2020).

Tabla CI.1. Análogos de las toxinas paralizantes de moluscos (PST) presentes en los extractos utilizados en este capítulo. Se detallan nombres, sinónimos, fórmula molecular, masa molecular (g mol^{-1}) y estructura molecular. Tabla confeccionada a partir de Raposo *et al.* (2020); FAO (2005) y <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

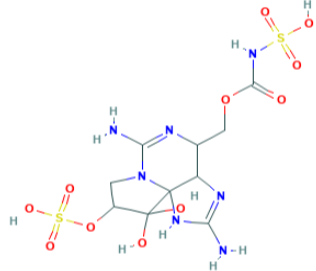

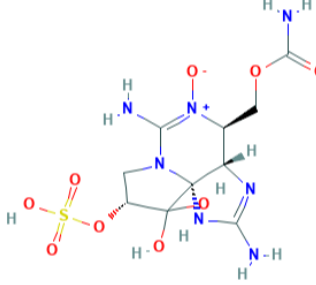
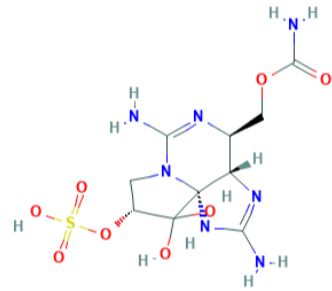
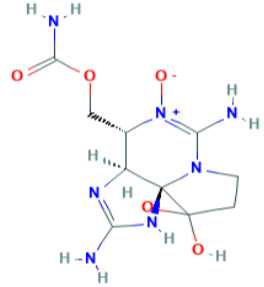
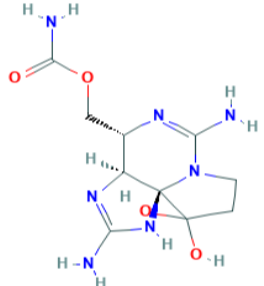
Abreviatura	Nombre completo y sinónimos Fórmula molecular	Masa molecular (g mol^{-1})	Estructura molecular
Toxinas N-sulfocarbamoiladas,	Protogoniautoxina I N-sulfocarbamoilgoniautoxina C <hr/> C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₁₁ S ₂	475,40	
	C1/C2		
Toxinas N-sulfocarbamoiladas,	Toxina B1 Gonyautoxina-5 <hr/> C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₇ S	379,35	
	B1		
Toxinas cabamoiladas	Goniautoxina 1/4 <hr/> C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₉ S	411,35	
GTX 1/4			

Tabla CI.1. Continuación

Abreviatura	Nombre completo y sinónimos	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Estructura molecular
	Fórmula molecular		
Toxinas cabamoiladas	Goniautoxina 2/3	395,35	
	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₈ S		
	GTX 2/3		
Toxinas cabamoiladas	Neosaxitoxina	315,29	
	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₅		
	NeoSTX		
Toxinas cabamoiladas	Saxitoxina	299,29	
	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₄		
	STX		

Como se mencionó en la introducción general, las PST son producidas tanto por dinoflagelados marinos como por cianobacterias de agua dulce (Kellmann *et al.*, 2013; Lagos, 2003). En el contexto de las FAN, estos organismos alcanzan grandes concentraciones y afectan la calidad del agua de bebida, las actividades productivas como la acuicultura o las actividades recreativas (Testai *et al.*, 2016a). Las PST son altamente polares, no volátiles, solubles en agua y resistentes al calor a tal punto que no son destruidas durante la cocción de los alimentos que pudieran estar contaminados (Wiese *et al.*, 2010). El primer evento de intoxicación en humanos se registró en 1927 en San Francisco (USA), y fue ocasionado por consumo de bivalvos contaminados con PST producidas por el dinoflagelado *Alexandrium catenella* (Sommer y Meyer, 1937). A partir de entonces, se han establecido programas de monitoreo y detección de PST y otras biotoxinas de riesgo potencial para la salud humana, como así también se han establecido valores guía tanto para el consumo de alimentos como para el agua potable (Ferreira *et al.*, 2008). El valor límite para alimentos es 800 $\mu\text{g STXeq kg carne}^{-1}$, mientras que para el consumo de agua potable, se establece un valor máximo de 3 $\mu\text{g STXeq L}^{-1}$ para niños y 20 $\mu\text{g STXeq L}^{-1}$ para adultos (Testai *et al.*, 2016a; WHO, 2019).

Desde un punto de vista ecológico, las PST pueden ser incorporadas a la cadena trófica al ser acumuladas por los organismos acuáticos a partir del plancton (Ferrão-Filho y Kozlowsky-Suzuki, 2011; Lopes *et al.*, 2014; Madigan *et al.*, 2018; Suárez-Isla *et al.*, 2016). Los bivalvos, como almejas y mejillones, son los principales vectores en la acumulación de PST, aunque también se ha detectado la acumulación de estas neurotoxinas en gasterópodos, crustáceos y peces (Deeds *et al.*, 2008; Etheridge *et al.*, 2010). Los consumidores que mayormente se ven afectados por la acumulación de estas toxinas, son los vertebrados como los peces carnívoros, las aves ictiófagas y los mamíferos, incluyendo a los seres humanos (Flewelling *et al.*, 2005; Landsberg, 2002).

En mamíferos, los problemas más comunes relacionados con la intoxicación por PST abarcan desde parálisis, afecciones gastrointestinales y dificultad para respirar, hasta el paro cardio-respiratorio y la muerte (Andrinolo *et al.*, 1999; Long *et al.*, 1990; Montebruno, 1993). En peces, la neurotoxicidad producida por las PST

afecta la natación (Bakke *et al.*, 2010; Bakke y Horsberg, 2007; Lefebvre *et al.*, 2004), aunque también se ha registrado que estas toxinas pueden producir estrés oxidativo (Clemente *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2011) y muerte (Montoya *et al.*, 1997; White, 1980).

Las PST podrían ser incorporadas al organismo a través de epitelios permeables, como el epitelio intestinal o el epitelio branquial. En el intestino, se ha sugerido que las PST pueden ser absorbidas por vía paracelular (Andrinolo *et al.*, 2002a; Andrinolo *et al.*, 2002b; Torres *et al.*, 2007), mientras que la vía transcelular no ha sido aún estudiada, ni tampoco los posibles daños en el órgano o los mecanismos relacionados con la excreción de las toxinas. Se ha descrito que, una vez en la circulación sistémica, las PST pueden ser transportadas a otros órganos donde ejercerán sus efectos o serán eliminadas, *e.g.* pueden ser eliminadas en el riñón (Stafford y Hines, 1995). También se ha detectado que las PST son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y producir efectos neurotóxicos en el cerebro (Cianca *et al.*, 2007; Naseem *et al.*, 1996).

En peces de agua dulce, las mayores concentraciones de PST se han encontrado en el contenido intestinal y en el hígado (Deeds *et al.*, 2008), aunque también existen registros de acumulación en el músculo de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y en la castañeta (*Geophagus brasiliensis*) (Calado *et al.*, 2019; Galvão *et al.*, 2009), dos especies de importancia para el consumo humano. Bakke y Horsberg (2010) han demostrado que, en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y el bacalao común (*Gadus morhua*), las PST son absorbidas desde el agua y movilizadas entre los órganos, con una mínima acumulación en el músculo. Si bien estos autores describieron que las PST son excretadas por vía urinaria, los mecanismos involucrados en su biotransformación y excreción aún no están claros. Considerando que varias especies de peces que son utilizadas en la acuicultura pueden estar expuestas a PST, adquiere especial relevancia conocer la capacidad que poseen los peces de biotransformar y excretar estas toxinas, para poder predecir y reducir riesgos de intoxicación (Etheridge *et al.*, 2010).

Se ha descrito que, organismos como bacterias, invertebrados marinos y mamíferos son capaces de biotransformar las PST mediante reacciones de glucuronidación, oxidación, epimerización o reducción (Bricelj y Shumway, 1998;

Garcia *et al.*, 2010, 2004; Lukowski *et al.*, 2019). En peces, se ha descrito que el sargo común (*Diplodus sargus*) incorpora, a través de la dieta, toxinas N-sulfocarbamoiladas como las toxinas C y es capaz de biotransformarlas en toxinas B1 y saxitoxina decarbamoilada (dcSTX) (Costa *et al.*, 2011). Este tipo de biotransformación también ocurre en bivalvos y bacterias, con la participación de tioles como los presentes en el GSH (Asakawa *et al.*, 1987; Sakamoto *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2000). Estas reacciones incluyen conjugación con GSH catalizadas por enzimas de la familia de las GST y/o reducción de la toxina acoplada a la oxidación de GSH a GSSG. El sistema antioxidante celular puede balancear rápidamente los niveles de GSH reduciendo el GSSG, en una reacción catalizada por la enzima GR. Se ha registrado que las PST pueden inducir la actividad de GST en peces, lo que sugiere la participación de esta enzima en la conjugación de esta toxina con GSH (Costa *et al.*, 2012b; Gubbins *et al.*, 2000).

No existe mucha información con respecto a la permeabilidad del epitelio intestinal de los peces a las PST, ni sobre su capacidad de biotransformación y excreción de estas toxinas. En la literatura, se ha descrito que compuestos que bloquean los canales de sodio activados por voltaje, como la oxaliplatina, pueden ser excretados por transportadores ABCC (Grolleau *et al.*, 2001; Myint *et al.*, 2019), pero para las PST, estos mecanismos de excreción no han sido estudiados. Resulta de particular interés el estudio del transporte de PST a través de ABCC, mediante experimentos fisiológicos y toxicológicos en un modelo como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), que es uno de los principales recursos para la acuicultura en la Argentina, sobre todo en los embalses de agua dulce de la Patagonia Norte, donde es frecuente la aparición de floraciones de cianobacterias del género *Dolichospermum*, potenciales productoras de PST

Objetivo

En este capítulo se plantea evaluar la absorción y los efectos tóxicos intracelulares de las PST en las células epiteliales del intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*, evaluando la integridad de la membrana lisosomal, la producción de ROS, el contenido de GSH, la actividad de las enzimas GR y GST, y la peroxidación lipídica. Además, se estudia la interacción entre las PST y el sistema MXR, mediante experimentos de transporte ABCC en preparaciones tanto *ex-vivo* como *in vitro*.

Hipótesis

Las PST ingresan a los enterocitos del intestino medio de *O. mykiss*, producen diversos efectos intracelulares y son exportadas de las células por transportadores ABCC.

P1: Los marcadores enzimáticos y no enzimáticos indicarán un mayor nivel de estrés oxidativo en el epitelio expuesto a PST que en el no expuesto.

P2: El daño a la membrana lisosomal será mayor en el epitelio expuesto a PST, que en el no expuesto.

P3: La tasa de transporte de DNP-SG por transportadores ABCC será menor cuando el intestino esté expuesto a las PST.

CI.2. Metodología

CI.2.1. Extractos de PST

Los extractos de PST se obtuvieron a partir de cultivos de *Alexandrium catenella* (PST1) y *A. ostenfeldii* (PST2 y PST3) (Tabla CI.2). A partir de estos cultivos, se obtuvieron pellets celulares que se lisaron con 500 μL de ácido acético 0,03 eq L^{-1} y 0,9 g de *Lysing matrix D* (FastPrep®) en un homogeneizador FastPrep® (Thermo Savant, Illkirch, Francia) a 6,5 m s^{-1} durante 45 s. Luego de la homogeneización, las muestras se centrifugaron a 16100 x g durante 15 min, a 4°C. El sobrenadante se pasó por un filtro de 0,45 μm y se centrifugó a 800 x g durante 30 s. El extracto se conservó en ácido acético 0,03 eq L^{-1} .

Tabla CI.2. Perfiles de los extractos de las toxinas paralizantes de moluscos (PST) usados en los experimentos, expresados como porcentajes. Las concentraciones están expresadas como μg de equivalentes de toxicidad de STX L^{-1} ($\mu\text{g STXeq L}^{-1}$), μmol de equivalentes de neurotoxicidad de STX L^{-1} ($\mu\text{mol STXeq L}^{-1}$) de acuerdo a FAO/WHO (2016) y como $\mu\text{mol PST L}^{-1}$.

	<i>A. catenella</i>	<i>A. ostenfeldii</i>	
	PST1	PST2	PST3
C1/C2	35,13	92,64	87,79
GTX1/4	39,19	0,00	0,00
GTX2/3	0,27	0,00	5,23
B1	0,03	1,23	1,16
NEO	23,67	0,00	0,00
STX	1,61	6,13	5,82
Total ($\mu\text{g STXeq L}^{-1}$)	37,39	5,65	5,47
Total ($\mu\text{mol STXeq L}^{-1}$)	0,11	0,016	0,015
Total ($\mu\text{mol PST L}^{-1}$)	0,13	0,11	0,11

El contenido de toxinas en los extractos fue caracterizado por HPLC/FLD de acuerdo al método de Van de Waal *et al.* (2015), usando una columna Phenomenex Luna (5 μm CI8 250 x 4,6 mm). La salida se registró por fluorescencia a 333

nm/395 nm, excitación/emisión. Los picos de las distintas toxinas se cuantificaron utilizando los estándares apropiados.

CI.2.2. Peces y preparaciones

En estos experimentos se utilizaron individuos de *O. mykiss* de 280 ± 40 g, que se mantuvieron 24 h en ayuno, antes de sacrificarlos y removerles el intestino. El tamaño de estos peces permite obtener suficiente cantidad de tejido de intestino medio a partir de un solo individuo. Además, permite comparar correctamente los resultados obtenidos con los de trabajos anteriores de nuestro laboratorio sobre la participación de transportadores ABCC y enzimas de biotransformación asociadas en la detoxificación de MCLR y As^{III} (Bieczynski *et al.*, 2014, 2016; Paineofilú *et al.*, 2019). Se usaron epitelio intestinal aislado y segmentos intestinales (evertidos y sin evertir), como modelos experimentales *ex vivo*, y enterocitos aislados, como modelo *in vitro*. La descripción de las preparaciones se detalla en la metodología general (sección 2.3).

El epitelio aislado se utilizó para evaluar marcadores de estrés oxidativo y la actividad de los transportadores ABCC, en incubaciones de 1 h en viales de vidrio con 3 mL de solución Cortland (control), o con extracto PST1 (tratados). Después de las incubaciones, el epitelio se homogeneizó en buffer Tris 40 mmol L⁻¹; KCl 150 mmol L⁻¹; 0,5 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,6, con un homogeneizador Cole-Parmer LabGen 7 a 35000 rpm. Los homogenatos se centrifugaron a 9700 x g durante 15 min, a 4°C y los sobrenadantes se usaron para la estimación de los marcadores de estrés oxidativo y la cuantificación de proteínas.

Las preparaciones de segmentos intestinales evertidos y sin evertir se usaron para profundizar la información que se obtuvo con el epitelio aislado, acerca de la actividad de los transportadores ABCC en presencia de PST. Las distintas preparaciones se detallan en la sección CI.2.5.2. Las incubaciones se realizaron durante 1 h en viales de vidrio con 3 mL de solución Cortland (control), o con extracto PST1 (tratados).

Las suspensiones de células aisladas se utilizaron para estimar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la integridad de la membrana lisosomal, por medio del método de tiempo de retención de rojo neutro (NRRT50).

Las incubaciones se realizaron durante 1 h en viales de vidrio con 1 mL (ROS) o 0,5 mL (NRRT50) de solución Cortland (control) o con extracto PST1 (tratados).

Para la preparación de los baños de incubación con toxina, el ácido acético de los extractos se evaporó con nitrógeno y las PST se resuspendieron en solución Cortland. Las concentraciones utilizadas se definieron de acuerdo a concentraciones que pueden ser encontradas en el ambiente, teniendo en cuenta el contenido celular de PST y la concentración de células encontrada en floraciones de dinoflagelados (Cembella et al., 2002; Sephton et al., 2007; Testai et al., 2016b).

CI.2.3. Marcadores de estrés oxidativo

CI.2.3.1. Glutación y enzimas asociadas

El contenido de GSH, la actividad GST, GR, CAT y la peroxidación lipídica (según el método de TBARS), se estimaron en epitelio intestinal incubado *ex vivo* durante 1 h con 3 mL de solución Cortland (control), o con extracto PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (50 $\mu\text{g L}^{-1}$) o 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (500 $\mu\text{g L}^{-1}$) (tratados). Para las determinaciones se usó el sobrenadante del homogenato, de acuerdo a los protocolos que fueron descritos en la metodología general (sección 2.5). Los resultados se refirieron al contenido de proteínas del epitelio (sección 2.5.8). Para estimar la producción de ROS, se usaron suspensiones de enterocitos aislados con una concentración de 10^5 células viables mL^{-1} (sección 2.5.6), incubadas durante 1 h en viales de vidrio con 1 mL de solución Cortland (control), o con extracto PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (50 $\mu\text{g L}^{-1}$) o PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + MK571 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (tratados).

CI.2.3.2. Actividad CAT, peroxidación lipídica y producción de ROS

Se determinó la actividad de la enzima CAT y la peroxidación lipídica según el método de TBARS (sección 2.5.5) en sobrenadante de homogenatos derivados de epitelio intestinal incubado 1 h en viales de vidrio con 3 mL de solución Cortland, en el caso de los controles, y con extracto PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (50 $\mu\text{g L}^{-1}$) o 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (500 $\mu\text{g L}^{-1}$), para los tratados. Las soluciones se prepararon de la misma forma que en la sección CI.2.3.1. Los resultados se refirieron al contenido de proteínas del epitelio (sección 2.5.8). Para estimar la producción de ROS, se usaron suspensiones de enterocitos aislados con una concentración de 10^5 células viables mL^{-1} (ver sección 2.5.6), incubadas durante 1 h en viales de vidrio con 1 mL de

solución Cortland, en el caso de los controles, o con extracto PST1 $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) o PST1 $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ + MK571 $3 \mu\text{mol L}^{-1}$.

CI.2.4. Estabilidad de la membrana lisosomal

La estabilidad de la membrana lisosomal se analizó mediante el registro del NRRT50 (ver sección 2.6.2). Se usaron suspensiones de enterocitos aislados a una concentración final de 10^6 células viables mL^{-1} , incubados previamente durante 1 h, en viales de vidrio con 0,5 mL de solución Cortland con extracto de PST1 a concentraciones crecientes de 0 a $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$.

CI.2.5. Actividad de transportadores ABCC

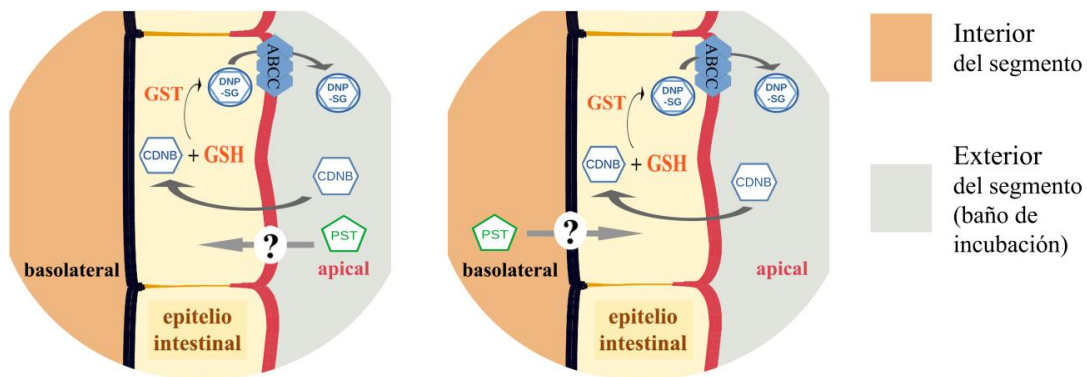
CI.2.5.1. Transporte de DNP-SG en epitelio aislado

En este experimento, se estudió el efecto de tres extractos PST1, PST2 y PST3, sobre la tasa de transporte de DNP-SG en epitelio intestinal aislado, con la finalidad de evaluar el efecto de las toxinas sobre la función de los transportadores ABCC. Los epitelios se incubaron en viales de vidrio con 3 mL de CDNB $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ disuelto en solución Cortland (control) y con 3 mL CDNB $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ + PST (tratados). Todos los extractos se aplicaron a una concentración final de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, aunque la concentración molar difirió levemente entre extractos: $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ para PST1 y $0,11 \mu\text{mol L}^{-1}$ para PST2 y PST3. El transporte de DNP-SG, se registró como se describió en la metodología general (sección 2.4), mediante el registro de la absorbancia cada 5 min, durante 70 min. Los resultados se refirieron al contenido de proteínas del epitelio (sección 2.5.8).

CI.2.5.2. Transporte de DNP-SG en segmentos intestinales

Los efectos de las PST sobre el transporte de DNP-SG en la cara apical (luminal) y basolateral del intestino, se estudiaron en segmentos evertidos y no evertidos, respectivamente. En todas las preparaciones, el CDNB se aplicó en el baño de incubación mientras que las PST se aplicaron en la cara apical o basolateral del segmento. Dependiendo de la preparación, la toxina se aplicó en el baño de incubación o en el interior del segmento (figura CI.2). Para este experimento se decidió utilizar el extracto PST2, ya que resultó ser el más efectivo para inhibir el transporte de DNP-SG en los experimentos con epitelio aislado.

a) Segmento evertido



b) Segmento sin evertir

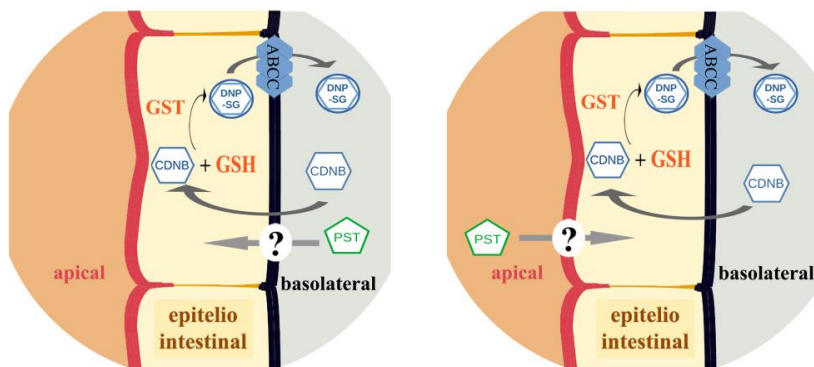


Figura CI.2. Esquema de los modelos de exposición *ex vivo* usados para el estudio polarizado del transporte de DNP-SG en el intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*. Cada modelo permitió estudiar las rutas posibles por las que las PST son absorbidas y exportadas desde la célula. a) Segmentos evertidos b) Segmento no evertidos. En todas las preparaciones, el DNP-SG fue medido a partir del baño de incubación.

CI.2.5.3. Efectos de la inhibición del transporte ABCC sobre la citotoxicidad de las PST.

Para indagar sobre el posible transporte de las PST a través de transportadores ABCC, se utilizó a la estabilidad de la membrana lisosomal como marcador de toxicidad. Esta variable se analizó mediante el registro NRRT50, como se explicó en la metodología general (sección 2.6.2), en enterocitos aislados expuestos a PST y/o MK571, un inhibidor específico de los transportadores ABCC. La suspensión de enterocitos aislados (10^6 cel. viables mL^{-1} , concentración final) se incubó durante 1 h con PST1 $0,0033 \mu\text{mol L}^{-1}$, con o sin MK571 $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, disuelto en DMSO. Esta concentración de MK571 fue seleccionada en base a resultados de ensayos previos de NRRT50, donde se evaluó el efecto de este inhibidor en enterocitos aislados (Figure CI.7a), y en base a los experimentos de transporte de DNP-SG en epitelio aislado (Figure CI.7b). En los ensayos de NRRT50

se incluyó un control de DMSO (utilizado para solubilizar MK571), ya que es muy probable que afecte la permeabilidad de la membrana lisosomal. La concentración de DMSO estuvo por debajo del 0,002% en este y en todos los ensayos de transporte DNP-SG en que fue necesario.

CI.2.6. Análisis estadístico

La homogeneidad de varianzas se analizó con el test de Bartlett y la normalidad con el test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre tratamientos se probaron utilizando el test t de Student o mediante ANOVA de medidas repetidas de un factor. En este último caso, se usó el test *a posteriori* de Dunnett para las comparaciones contra el control, y el test *a posteriori* de Tukey para las comparaciones entre tratamientos. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con $p < 0,05$ (Zar, 1999). Para el análisis estadístico de los casos en que se comparan porcentajes, se utilizó la transformación de arcoseno de la raíz de la proporción. Los resultados se expresan como media \pm error estándar (EE).

CI.3. Resultados

CI.3.1. Marcadores de estrés oxidativo

CI.3.1.1. Glutación y enzimas asociadas

La exposición *ex vivo* por 1 h al extracto PST1 alteró parte del metabolismo intracelular del glutación en el epitelio intestinal aislado. El contenido de GSH disminuyó significativamente un 16% con respecto al control, tanto en la exposición a PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ como en PST1 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (ANOVA de un factor, medidas repetidas y comparaciones *post hoc* de Dunnett, $F_{1,2; 9,3} = 1,50$, $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, $n = 9$, figura CI.3a). La actividad GST decreció 19% después de la exposición a PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (ANOVA de un factor, medidas repetidas y comparaciones *post hoc* de Dunnett, $F_{1,9; 11,6} = 4,64$, $p < 0,05$, $n = 7$) pero no cambió con la exposición a PST1 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (figura CI.3b). La actividad de GR tendió a aumentar un 14% con PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$, aunque no en forma significativa, y 16% con PST1 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, en forma estadísticamente significativa (ANOVA de un factor, medidas repetidas y comparaciones *post hoc* de Dunnett, $F_{1,7, 11,6} = 6,48$, $p < 0,05$, $n = 8$, figura CI.3c).

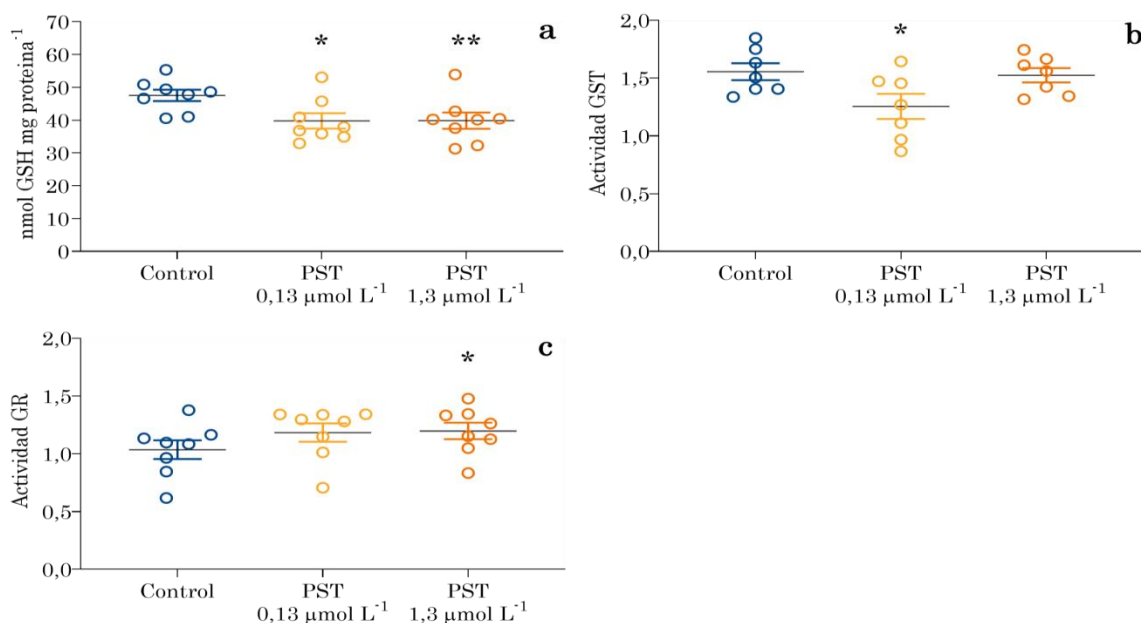


Figura CI.3. Epitelio aislado de intestino medio *Oncorhynchus mykiss*, luego de exposiciones *ex vivo* durante 1 h con PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a) Contenido de glutación (GSH) ($n = 9$); b) actividad de glutación S-transferasa (GST), expresada como $\text{nmol s}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ ($n = 7$); c) glutación reductasa (GR), expresada como $\text{nmol s}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ ($n = 8$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Todos los resultados se expresan como media \pm EE.

CI.3.1.2. Actividad CAT, producción de ROS y peroxidación lipídica

No hubo efectos significativos de la incubación con el extracto PST1 sobre la actividad CAT ni en la peroxidación lipídica estimada como TBARS, en el epitelio intestinal aislado (figura CI.4a y b). La producción de ROS en enterocitos aislados no aumentó significativamente luego de la exposición a PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$, ni tampoco cuando se expuso a los enterocitos a PST1 + MK571 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (figura CI.4c). Por otro lado, la producción de ROS disminuyó significativamente en los enterocitos tratados sólo con MK571 con respecto a los tratados con PST1 y con PST1 + MK571 (ANOVA de un factor, medidas repetidas y comparaciones *post hoc* de Tukey, $F_{1,9; 17,92} = 11,64, p < 0,001 n = 10$, figura CI.4c).

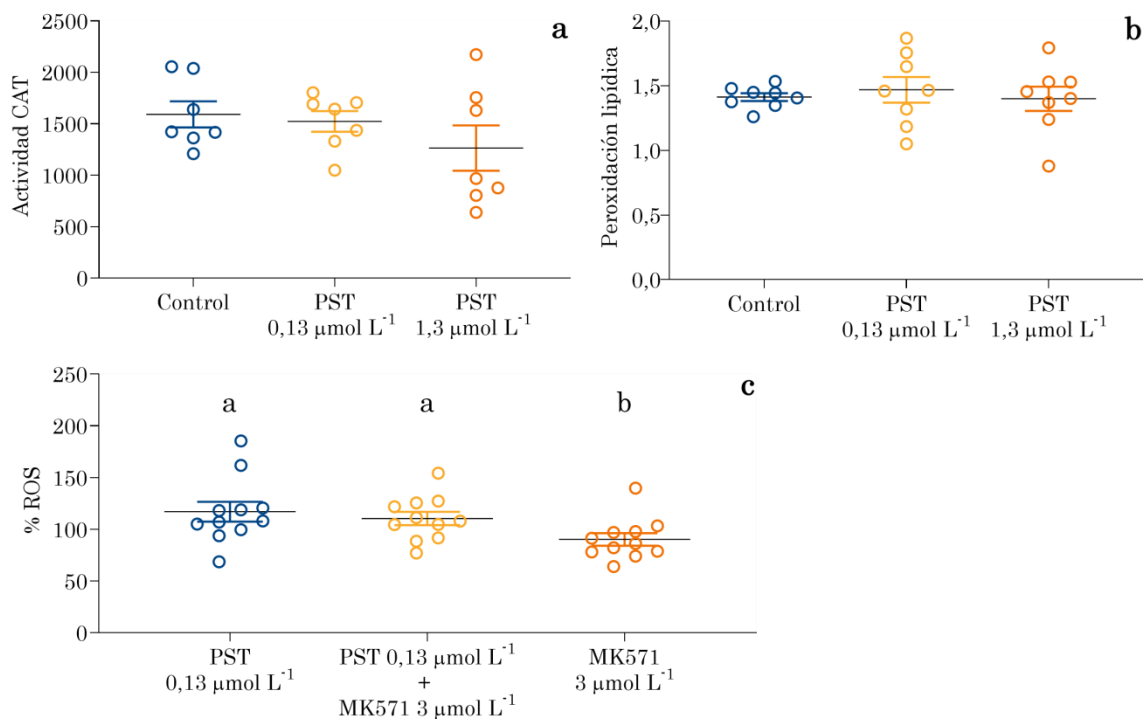


Figura CI.4. Biomarcadores de estrés oxidativo en epitelio aislado de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*, expuesto *ex vivo* durante 1 h con PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a, b) y en enterocitos expuestos *in vitro* con PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PST1, 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + MK571 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y MK571 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (c). a) Actividad catalasa (CAT), expresada como $\text{nmol s}^{-1} \text{mg prote}^{-1}$ ($n = 7$); b) peroxidación lipídica, expresada como $\mu\text{mol TBARS mg prote}^{-1}$ ($n = 8$); c) Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como porcentaje del control ($n = 7$); las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). Todos los resultados se expresan como media \pm EE.

CI.3.2. Estabilidad de la membrana lisosomal

La estabilidad de la membrana lisosomal se evaluó con el objetivo de hallar un marcador intracelular sensible a los efectos producidos por las PST. Se registró un efecto dependiente de la concentración de PST1, que se ajustó a una regresión no lineal de NRRT50 (como porcentaje del control) vs. el logaritmo de la concentración de PST1 ($CI_{50} = 0,0045 \mu\text{mol L}^{-1}$ PST1; IC 95% = 0,0016 - 0,0125; $r^2 = 0,80$; $n = 6-7$, figura CI.5).

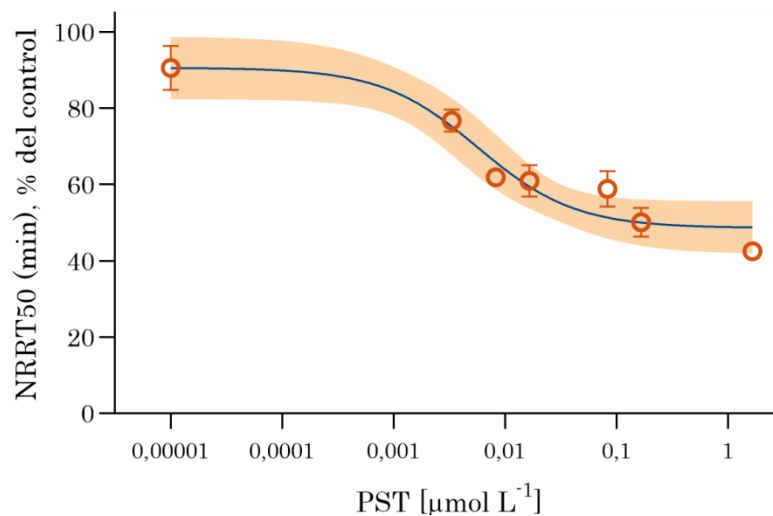


Figura CI.5. Estabilidad de la membrana lisosomal en enterocitos aislados de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*, luego de exposición *in vitro* por 1 h a PST1. Regresión no lineal de tiempo de retención del rojo neutro 50 % (NRRT50, en min) vs. log [PST en $\mu\text{mol L}^{-1}$]. Los datos se expresan como porcentaje del control; media \pm EE ($n = 6 - 7$), $CI_{50} = 0,0045 \mu\text{mol L}^{-1}$ PST1, 95% CI = 0,0016 a 0,0125 (área coloreada), $r^2 = 0,80$.

CI.3.3. Función de los transportadores ABCC

CI.3.3.1. Transporte de DNP-SG

Todos los extractos de PST analizados inhibieron el transporte de DNP-SG en epitelio intestinal aislado (30, 51 y 32% para PST1, PST2 y PST3, respectivamente), (ANOVA de medidas repetidas de un factor y comparaciones post hoc de Dunnett, $F_{2,2; 13,1} = 16,82$, $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente, $n = 7$, figura CI.6).

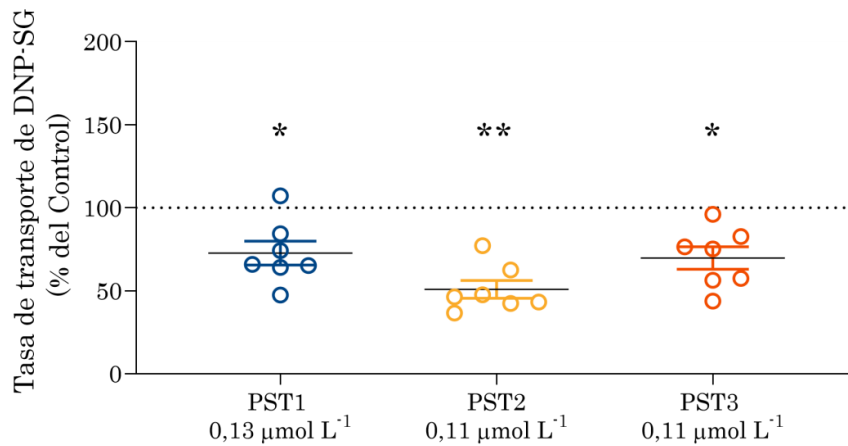


Figura CI.6. Inhibición de la tasa de transporte de DNP-SG en epitelio aislado de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* expuesto a tres extractos de toxinas paralizantes de moluscos (PST). Los datos están expresados como porcentaje del control, media \pm EE (n = 7). Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y su correspondiente control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

En base a estos resultados, se eligió PST2 para los ensayos subsiguientes realizados con segmentos intestinales. Este extracto inhibió un 18% el transporte basolateral de DNP-SG, en segmentos no evertidos, sólo cuando la toxina se aplicó en el interior del segmento, en contacto con la cara apical (test t de Student pareado, $t_7 = 3,99$, $p < 0,01$, n = 8, figura CI.7). Por otra parte, no hubo efecto significativo sobre al transporte apical de DNP-SG cuando la toxina se aplicó en contacto con la cara apical ni cuando se la aplicó en contacto con la cara basolateral del segmento.

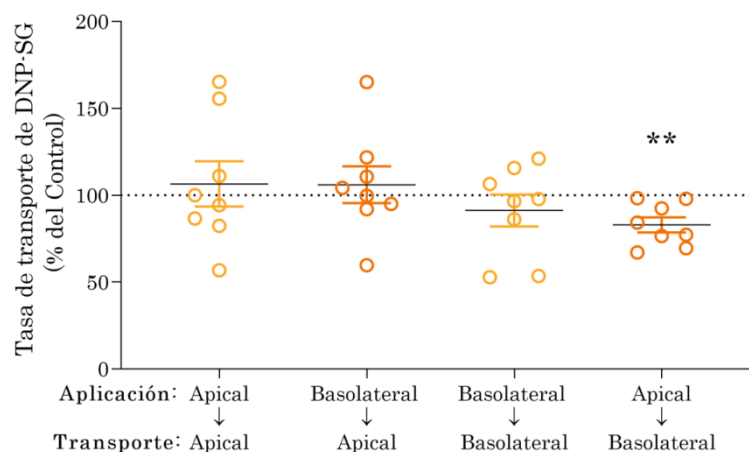


Figura CI.7. Transporte DNP-SG en segmentos evertidos y no evertidos de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*, expuestos al extracto 2 de toxinas paralizantes de moluscos (PST2). En el eje X se especifican las vías de aplicación y de medición del transporte. Los datos están expresados como porcentaje del control, media \pm EE (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y su correspondiente control (** $p < 0,01$).

CI.3.3.2. Efectos de la inhibición del transporte ABCC sobre la citotoxicidad de las PST.

En ensayos preliminares con enterocitos aislados, la exposición a MK571 a concentraciones de 0,1-3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, disminuyó el NRRT50 en forma dependiente de la concentración (figura CI.8a). Por otro lado, MK571 inhibió efectivamente el transporte de DNP-SG a 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($p < 0,05$, $n = 6-9$) (figura CI.8b). Se eligió la concentración de MK571 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para los ensayos de efectos de la inhibición del transporte ABCC sobre la toxicidad de las PST, debido a que afectó en menor medida la integridad de la membrana lisosomal.

En enterocitos aislados expuestos a MK571 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, NRRT50 se redujo 18% en relación con el control, pero este efecto no fue estadísticamente significativo. En cambio, en enterocitos aislados expuestos a PST1 0,0033 $\mu\text{mol L}^{-1}$, el NRRT50 se redujo un 51% en relación con el control (test de Tukey, $F_{3; 15} = 27,99$, $p < 0,0001$, $n = 6$). En la exposición a PST1 0,0033 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + MK571 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, NRRT50 se redujo un 66% en relación con el control (test de Tukey, $F_{3; 15} = 27,99$, $p < 0,0001$, $n = 6$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre PST1 y PST1 + MK571 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (figura CI.8c).

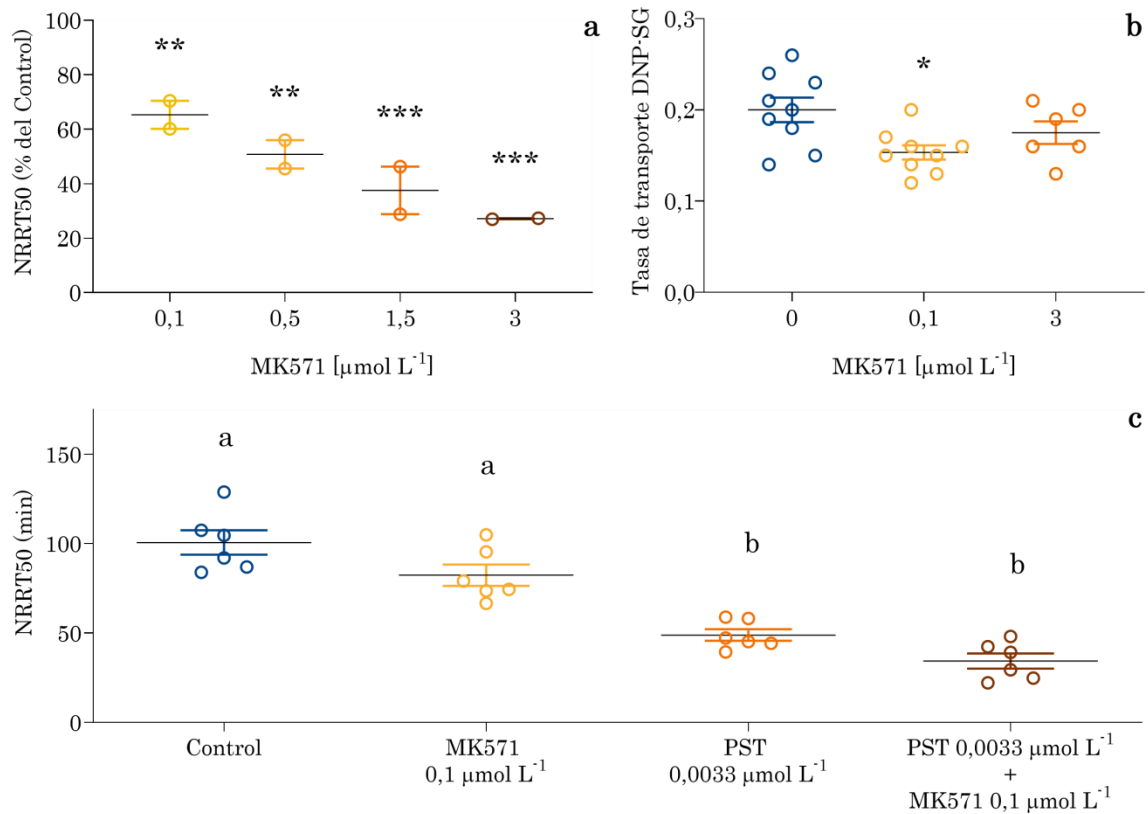


Figura CI.8. Tiempo de retención del rojo neutro 50% (NRRT50) y tasa de transporte de DNP-SG en intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*. a) NRRT50 en enterocitos aislados expuestos *in vitro* a MK571 de 0,1-3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n = 2). Datos expresados como porcentaje del control. b) Tasa de transporte de DNP-SG en epitelio aislado expuesto *ex vivo* a MK571 de 0,1-3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n = 5-9). Los datos se expresan como nmol DNP-SG min^{-1} mg proteína $^{-1}$. Los asteriscos indican diferencias significativas en relación con el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). c) NRRT50 en enterocitos aislados expuestos *in vitro* a MK571 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, PST1 0,0033 $\mu\text{mol L}^{-1}$ o PST1 0,0033 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + MK571 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, por 1 h. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$, n = 6). Todos los resultados se expresan como media \pm EE.

CI.4. Discusión

En este capítulo se presenta evidencia acerca de la absorción de las PST por el epitelio del intestino medio de *O. mykiss*, obtenida en experimentos *ex vivo* e *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran, por primera vez, que estas neurotoxinas pueden ser absorbidas por las células epiteliales del intestino de los peces, que afectan parte del metabolismo del glutatión y que producen efectos citotóxicos después de una exposición corta de una 1 hora a concentraciones más bajas que las recomendadas como valores guía para el consumo de agua potable. También se muestra, por primera vez, que las PST interfieren en el sistema de defensa a múltiples xenobióticos del intestino mediante la inhibición de transportadores ABCC.

En la literatura se ha descrito que, en mamíferos, incluidos los humanos, las PST serían absorbidas por el intestino, por vía paracelular (Andrinolo *et al.*, 2002a; Andrinolo *et al.*, 2002b; Torres *et al.*, 2007) y que, en la mayoría de los casos, son eliminadas por vía urinaria (Stafford y Hines, 1995). Por otro lado, algunos trabajos han registrado presencia de PST en bilis (García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2010; Gessner *et al.*, 1997) y otros han descrito el transporte de STX mediado por el transportador ABCB1 (Pgp) en líneas celulares del hipocampo de ratón (Ramos *et al.*, 2018). Esto sugiere que las PST podrían ser transportadas por una vía transcelular que incluye transporte activo por proteínas transportadoras de membrana como las de la superfamilia ABC.

En el caso de los peces, se sabe poco acerca de la absorción intestinal de las PST. Gao *et al.* (2019) muestran que el pez globo de mar *Takifugu pardalis*, al ser alimentado con tetrodotoxina (TTX) y STX, acumula rápidamente TTX en tejidos específicos mientras que la mayor parte de la STX permanece en el contenido del intestino. Lo opuesto ocurre en el pez globo de agua dulce *Pao suvattii*, el cual puede acumular STX en el tegumento, las gónadas y el intestino, pero conserva poco o nada de TTX en el cuerpo. Estos estudios no analizan los mecanismos implicados en la absorción de la toxina a través de la pared del intestino, pero muestran una clara selectividad del intestino por el tipo de toxina, que sugiere la participación de mecanismos celulares. Sin embargo, hasta ahora no hay registros

sobre la absorción transcelular de las PST en intestino de vertebrados, ni sobre los efectos intracelulares en este órgano.

En general, la disminución del GSH intracelular y el aumento de la actividad de la enzima GR se consideran indicadores de condiciones prooxidantes, dado que, el GSH se oxida a GSSG en presencia de ROS y GR cataliza la reducción de GSSG a GSH, lo que contribuye a mantener el balance oxidativo de la célula (Deponte, 2013; Meister y Anderson, 1983; Stephensen *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004). En este capítulo, la exposición a PST1 $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ causa un moderado pero significativo descenso en el contenido del GSH intracelular. Sin embargo, este efecto no se hace más pronunciado a la mayor concentración de PST ($1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$). En forma simultánea, la actividad GR se incrementa con la concentración de PST1, lo que podría explicar la ausencia de un efecto dependiente de la concentración en la disminución del contenido de GSH frente a la exposición a PST1. El aumento en la tasa de reducción de GSSG podría equiparar la tasa de disminución de GSH. Si bien, aparentemente, el aumento de la actividad GR estabiliza el contenido de GSH en la célula, no se llegan a recuperar los niveles del control. Aunque estos resultados indican que las PST favorecerían ciertas condiciones de estrés oxidativo en los enterocitos, no se observa mayor producción de ROS, peroxidación lipídica, ni respuesta de la actividad CAT.

La disminución inicial de GSH observada, también podría deberse a que esta molécula se consumió en reacciones de biotransformación. En este sentido, Sato *et al.* (2000) y Sakamoto *et al.* (2000) han demostrado que es posible la conversión entre análogos de PST como GTX a STX, con la formación de conjugados intermedios, en la que participan tioles como el glutatión, en bacterias y en reacciones *in vitro*. En bivalvos, las toxinas N-sulfo-carbamoiladas (*e.g.* B1, C1 y C2) son reducidas a toxinas carbamoiladas (*e.g.* GTX1/4, NeoSTX y STX) (Asakawa *et al.*, 1987; Cembella, 1994). En peces, este tipo de biotransformaciones fueron sugeridas por Gubbins *et al.* (2000) para el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y por Costa *et al.* (2011) para el sargo común (*Diplodus sargus*). Considerando que PST1 contiene 39% de GTX1/4 y 35% de C1/2, la disminución del contenido de GSH observada en este capítulo podría reflejar la ocurrencia de reacciones de biotransformación, que incluyen conjugación u oxidación de GSH, en los

enterocitos de *O. mykiss*. Otra explicación alternativa puede ser que la disminución del contenido de GSH esté relacionada con la excreción, ya que GSH puede actuar como cosustrato para el transporte de xenobióticos mediado por proteínas de tipo ABCC (Deelay *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2014).

Siguiendo la idea de que el GSH puede ser utilizado en reacciones de conjugación, se debe analizar la participación de la enzima GST en la detoxificación de las PST, la cual no está clara hasta ahora. Por ejemplo, se ha registrado que la actividad GST aumenta en *Geophagus brasiliensis* expuesto en agua con PST 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Clemente *et al.*, 2010) y en *Salmo salar* expuesto por inyección intraperitoneal (i.p.) a PST 4,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Gubbins *et al.*, 2000). También se ha registrado que la actividad de esta enzima disminuye en *Sparus aurata* expuesto a 27,2 $\mu\text{g STXeq kg}^{-1}$ (Barbosa *et al.*, 2019) y en *Hoplias malabaricus* a 0,8 $\mu\text{g STXeq kg}^{-1}$ (da Silva *et al.*, 2011), ambos expuestos a través de la dieta. En cambio, se ha registrado que las PST no poseen ningún efecto sobre la actividad GST, *e.g.* en ratones expuestos por i.p. a GTX 2/3 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Hong *et al.*, 2003) y en *Daphnia pulex* y *D. similis* expuestas en la dieta a STX 0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Ferrão-Filho *et al.*, 2017). El incremento en la actividad GST puede estar relacionado con un incremento en la actividad antioxidante o de biotransformación (Calado *et al.*, 2020; Gubbins *et al.*, 2000; Paineofilú *et al.*, 2019; Stephensen *et al.*, 2002).

Si bien en la literatura se ha sugerido en ocasiones la disminución de la actividad GST está asociada con la disminución de GSH (Pathania *et al.*, 2018), el método utilizado en este trabajo para medir la actividad GST no permite hacer este tipo de correlaciones, ya que el GSH es uno de los cofactores que se agregan para dar inicio a la reacción en el laboratorio, junto con el reactivo CDNB. Otra alternativa consistiría en que alguno de los análogos que componen el extracto de PST1 actúa como modulador negativo de la actividad GST. Algunos autores, han sugerido que ciertos quimiomoduladores pueden alterar tanto la actividad GST como la de los transportadores ABCC, pertenecientes al sistema de resistencia a múltiples xenobióticos (MXR) (Milutinović *et al.*, 2019; Hayeshi *et al.*, 2008). Los resultados de esta tesis muestran inhibición de GST (PST 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$), pero no a una concentración mayor como PST 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. En este sentido, se han descrito efectos similares para MK571, un inhibidor específico de proteínas ABCC, en líneas

celulares de *O. mykiss*, que, a ciertas concentraciones, inhibe el transporte por proteínas ABCC, pero que a concentraciones mayores, produce la recuperación de la actividad (Fisher *et al.*, 2011).

Todos los extractos de PST que se probaron, inhibieron el transporte de DNP-SG. De acuerdo a su composición (ver tabla CI.2), PST2 y PST3 son 6 veces menos neurotóxicas que PST1. Sin embargo, PST2 resultó ser el inhibidor más potente para el transporte de DNP-SG (50% a $0,11 \mu\text{mol L}^{-1}$). En el experimento con preparaciones polarizadas, PST2 inhibió el transporte basolateral de DNP-SG, pero no tuvo ningún efecto en el transporte apical, a diferencia de lo que sucede con MCLR o con el As^{III} , que inhiben el transporte de DNP-SG a ambos lados del epitelio intestinal de *O. mykiss* (Bieczynski *et al.*, 2014; Paineofilú, 2016; Paineofilú *et al.*, 2019). En particular, el As^{III} sólo inhibe el transporte de DNP-SG en ABCC apicales, cuando se lo aplica en la cara basolateral del intestino, lo que indica un escenario donde el tóxico se absorbe desde la circulación sanguínea, previa absorción por otro órgano, *e.g.* las branquias y/o el tegumento. En el presente trabajo, como PST2 inhibió el transporte basolateral sólo cuando se aplicó la toxina del lado apical del intestino, se sugiere que al menos una de las toxinas contenidas en el extracto PST2 podría cruzar la membrana apical del enterocito e inhibir la función de los ABCC basolaterales, tanto como un sustrato (inhibidor competitivo) o como un inhibidor no competitivo. De darse el caso de que la absorción de PST ocurriera en otros órganos distintos al intestino, como las branquias o el tegumento, las PST no podrían ingresar al intestino desde la circulación sanguínea.

García *et al.* (2009; 2010) han propuesto que las PST pueden ser detoxificadas por oxidación seguida de reacciones de glucuronidación, una vía considerada de importancia para los procesos de detoxificación de xenobióticos en *O. mykiss* (Clarke *et al.*, 1991; Lahti *et al.*, 2011). En este sentido, los conjugados de glucurónidos se han descrito como sustratos de transportadores basolaterales de tipo ABCC, *e.g.* ABCC3 y ABCC4 (Bai *et al.*, 2004; Deeley *et al.*, 2006; Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006). En humanos, los transportadores ABCC basolaterales, en especial ABCC3, poseen mayor afinidad por los conjugados de glucurónidos que por conjugados de GSH como el DNP-SG, a diferencia del transportador apical ABCC2 (Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006). De esta forma, el posible transporte de

conjugados de glucurónidos con PST a través de ABCC3 y/o ABCC4 en *O. mykiss* merece mayor atención y análisis en trabajos posteriores.

Para obtener más evidencias sobre el posible transporte de PST o sus metabolitos a través de proteínas ABCC basolaterales, se estudió el efecto de PST1 combinada con MK571 en enterocitos aislados. En los tratamientos donde se aplicó solo PST1, el NRRT50 se redujo considerablemente, pero el agregado de MK571, no incrementó este efecto, como se esperaría si las PST fueran transportadas fuera de las células por proteínas ABCC (Bieczynski *et al.*, 2014; 2016). En ese caso, las PST se hubieran concentrado dentro de la célula y hubiera aumentado su efecto tóxico. Este resultado hace suponer que todos o algunos de los componentes del extracto de PST pueden inhibir el transporte de los ABCC basolaterales mediante mecanismos de tipo no competitivo. Sin embargo, como el extracto de PST contiene seis toxinas diferentes, no puede descartarse que la toxina que inhibe el transporte de DNP-SG sea incapaz de afectar la estabilidad de la membrana lisosomal. Por lo tanto, la identidad de la proteína de membrana basolateral responsable del posible flujo transcelular de las PST en el intestino de los peces debería investigarse en futuros experimentos.

El marcado efecto dependiente de la concentración del extracto PST1 sobre la membrana lisosomal (NRRT50, $CI_{50} = 0,0045 \mu\text{mol L}^{-1} = 1,34 \mu\text{g STXeq L}^{-1}$) evidencia que estas toxinas pueden ser absorbidas por las células del intestino medio de *O. mykiss* y producir efectos citotóxicos a concentraciones más bajas que los valores guía para agua potable ($3 \mu\text{g STXeq L}^{-1}$ para niños y $20 \mu\text{g STXeq L}^{-1}$ para adultos, WHO, 2019). Además de las consideraciones para la salud humana, estos resultados muestran que las floraciones productoras de PST pueden afectar el sistema digestivo de los peces, particularmente en lugares de producción, a concentraciones que no resultan neurotóxicas, de acuerdo a los valores guía publicados por FAO/WHO (2016) y Testai *et al.* (2016b). Los efectos citotóxicos observados podrían estar relacionados con la unión de alguna de las toxinas presentes en el extracto a canales de Na^+ y/o Ca^+ activados por voltaje, de la membrana lisosomal, lo que modificaría el potencial de dicha membrana y su capacidad para mantener el pH ácido de la organela y, consecuentemente, comprometería en forma severa el funcionamiento lisosomal y el de la célula

(Repetto *et al.*, 2008; Xu y Ren, 2015). Por otro lado, los resultados obtenidos en estos experimentos indican que NRRT50 es un marcador sensible para estudiar la toxicología de las PST en los enterocitos de *O. mykiss* y para analizar rápidamente la toxicidad de floraciones potencialmente productoras de PST.

De todos modos, no puede descartarse que los efectos discutidos arriba sean causados por las PST mediante una inhibición de transportadores iónicos de la membrana apical, que podría generar un desbalance iónico en la célula y/o desencadenar algún sistema de transducción intracelular. Sin embargo, el consumo de GSH, el daño a lisosomas y la inhibición del transporte de DNP-SG en la membrana basolateral de los enterocitos son efectos muy diversos, que, en conjunto, sugieren que alguna de las PST ingresa a los enterocitos. Más aún, la inhibición del transporte iónico apical es muy poco probable, debido a que, en el intestino de los peces, la absorción de cationes está mediada por intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, el cotransportador Na^+ , K^+ 2Cl^- y cotransportadores Na^+ o H^+ /nutriente (*e.g.* Flik *et al.*, 1990; Griffith, 2017; Grosell, 2010; Movileanu *et al.*, 1998). Hasta el momento, no se ha descrito en la bibliografía que las PST inhiban esas proteínas.

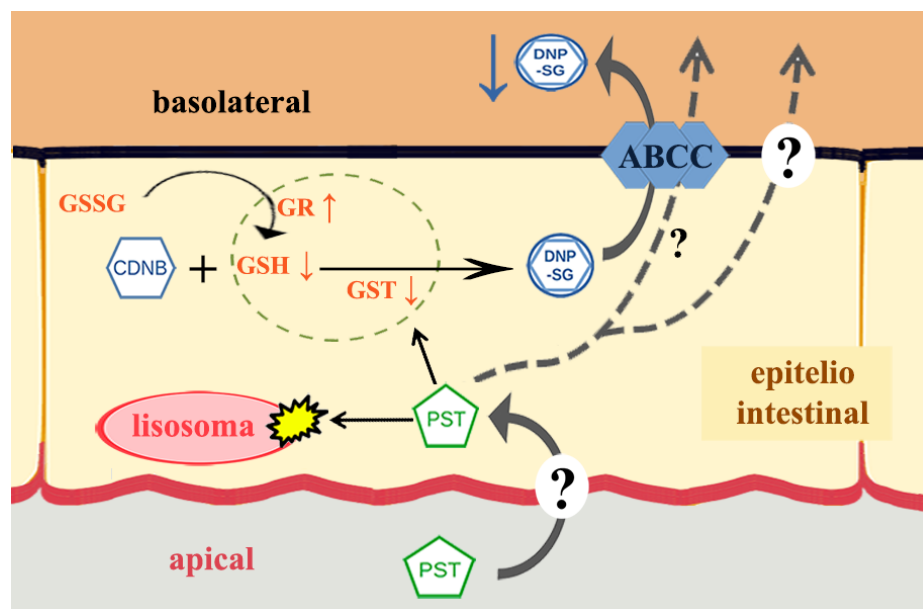


Figura CI.9. Resumen de los principales resultados obtenidos en el intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*, en distintas exposiciones a toxina parálitica de moluscos (PST). Se detalla una posible forma de absorción apical de tipo transcelular para PST, los principales efectos tóxicos intracelulares y la modulación sobre el transporte de DNP-SG, mediado por proteínas ABCC, en la membrana basolateral de los enterocitos. Las flechas punteadas representa un flujo basolateral hipotético y los signos de interrogación indican que no se conoce la identidad de las proteínas involucradas en el transporte de las PST.

CI.5. Conclusiones

En la trucha arcoíris, *O. mykiss*, las PST presentes en el lumen intestinal son absorbidas por los enterocitos, donde producen efectos citotóxicos, incluso a bajas concentraciones. Esto implica que la fisiología digestiva de los peces puede ser alterada cuando son expuestos a floraciones de organismos productores de PST como, por ejemplo, en instalaciones de acuicultura. Estas alteraciones producirían consecuencias adversas para la salud y el crecimiento de los peces, en ausencia de signos visibles de neurotoxicidad. Además, el hecho de que las PST puedan inhibir el transporte a través de los ABCC basolaterales, sugiere que estas toxinas pueden aumentar la toxicidad frente a otras toxinas, retrasando su transporte fuera de los enterocitos.

Las PST no son exportadas hacia la luz del intestino de *O. mykiss* a través de transportadores ABCC apicales, por lo tanto, estas proteínas no participan en la excreción de PST en el intestino. En este sentido, para una mayor comprensión de los mecanismos de detoxificación de las PST y su distribución en el pez, es necesario profundizar sobre la participación de otros transportadores de xenobióticos, que también pueden estar expresados en el intestino y otros órganos como ABCB1 y ABCG2, al igual que enzimas de biotransformación asociadas.

Capítulo II.

Efectos sobre el sistema de resistencia a múltiples xenobióticos y daños intracelulares, en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* alimentados con MCLR.

CII.1. Introducción

Como se mencionó en la introducción general (sección 1.4), las MC son hepatotoxinas producidas por cianobacterias de los géneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Oscillatoria* y *Dolichospermum*, entre otros (Carmichael, 1992; Sivonen y Jones, 1999). Las microcistinas en general, poseen una estructura cíclica compuesta por 7 aminoácidos, formando un heptapéptido con la estructura D-alanina¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-glutamato⁶-Mdha⁷. Los aminoácidos Mdha⁷ (N-metildehidroalanina) y Adda⁵ (3-amino-9-metoxi-2-6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico) solo se encuentran en las MC y no fueron descritos en otros organismos distintos a las cianobacterias (Carmichael, 1992; Wiegand y Pflugmacher, 2005). Actualmente se conocen más de 60 variantes de MC, que se diferencian dependiendo de las sustituciones de L-aminoácidos que se produzcan en las posiciones X² y Z⁴. La variante MCLR posee L-Leucina² y L-Arginina⁴ en estas posiciones (figura CII.1).

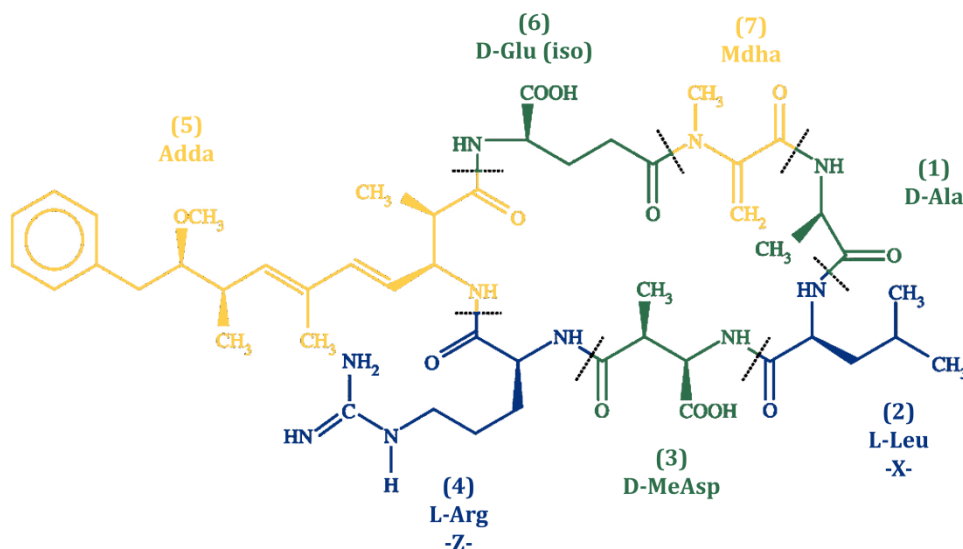


Figura CII.1. Estructura de la molécula de microcistina-LR (MCLR). En verde, los aminoácidos D-Alanina¹, D-eritro-β-metilAsp³ y D-glutamato⁶, en azul, L-Leucina² y L-Arginina⁴ y en naranja, Adda⁵ y Mdha⁷. Modificado de Weigand y Pflugmacher (2005).

En los animales expuestos a floraciones de cianobacterias tóxicas, las superficies permeables más expuestas son los epitelios branquial e intestinal. Dado

su tamaño y polaridad, la MCLR (y las MC en general) no puede atravesar por difusión simple la membrana plasmática de las células de dichos epitelios, sino que son incorporadas a las células, especialmente en el intestino, por transportadores de sales biliares de tipo OATP (por su nombre en inglés, *organic anion transporting polypeptide*), que están presentes tanto en mamíferos como en peces (Eriksson *et al.*, 1990, Fischer *et al.*, 2005; Meier-Abt *et al.*, 2007). En la trucha arcoíris, la expresión de este transportador es elevada en el intestino, por lo que la MCLR es incorporada por este órgano y así ingresa en el organismo (Bury *et al.*, 1998; Poste *et al.*, 2011; Steiner *et al.*, 2016). En el intestino, la toxina puede ser acumulada, excretada hacia el medio externo o bien transportada hacia otros órganos como el hígado, donde se ha estudiado, mayormente, su acumulación y efectos tóxicos (Tencalla y Dietrich, 1997). MCLR también puede ser acumulada y/o causar daños en la estructura y funcionamiento del riñón, el bazo, el corazón, las gónadas y el músculo esquelético (Ferreira *et al.*, 2010; Jos *et al.*, 2017; Kotak *et al.*, 1996). Las branquias también serían una posible ruta de absorción para MCLR, dado que diversos autores observaron efectos tóxicos en ellas (Cazenave *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2005) y expresión de transportadores OATP en la cara apical del epitelio branquial, aunque en un nivel muy bajo en comparación con otros órganos (Steiner *et al.*, 2016).

El efecto tóxico característico de la MCLR es la inhibición de las enzimas proteína fosfatasa (PP) 1 y 2A (Goldberg *et al.*, 1995; MacKintosh *et al.*, 1990). La toxina interactúa con las PP a través de los aminoácidos Mdha⁷ y Adda⁵. El grupo carbonilo del residuo Mdha⁷ se une covalentemente a la subunidad catalítica cisteína-273 de la PP1 y cisteína-266 de la PP2A (MacKintosh *et al.*, 1995; Runnegar *et al.*, 1995a), mientras que el residuo Adda⁵ interactúa con la región hidrofóbica del sitio activo de las PP, produciendo la inhibición de la función catalítica (Abdel-Rahman *et al.*, 1993; Goldberg *et al.*, 1995). Dado que las PP cumplen la función de desfosforilar residuos de serina y treonina de otras proteínas (Kim *et al.*, 1993; Matthews, 1995), su inhibición provoca la desregulación de numerosos procesos celulares como el control del ciclo y del crecimiento celular, la transcripción génica, el metabolismo de carbohidratos y lípidos, la estabilidad del citoesqueleto, entre otros (Jia, 1997; Oliver y Shnolikar, 1998; Shenolikar, 1994). La desregulación de estas funciones desencadena

importantes trastornos como la necrosis de los tejidos, la promoción de tumores y la carcinogénesis, especialmente si la exposición es prolongada.

Otro de los efectos tóxicos atribuidos a la MCLR es la producción de estrés oxidativo, aunque los mecanismos involucrados están aún en discusión. En mamíferos, está descrito que MCLR promueve la producción de ROS, debido a que altera el potencial de la membrana mitocondrial (Ding *et al.*, 2000). Este efecto estaría asociado a la inhibición de la subunidad β de la enzima ATP sintasa por parte de MCLR (La-Salette *et al.*, 2008; Mikhailov *et al.*, 2003). La producción de ROS aumenta la desestabilización de la membrana mitocondrial (Mikhailov *et al.*, 2003) a través de la interacción con grupos sulfhidrilo de las ATPasas que intercambian iones, *e.g.* la ATPasa Na^+/K^+ y la ATPasa $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, desregulando su actividad (Ding *et al.*, 1998; Gaete *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2008). En peces, la exposición subcrónica a MCLR altera los marcadores enzimáticos y no enzimáticos de estrés oxidativo, *e.g.* actividad de las enzimas GST y GR, contenido de GSH y peroxidación lipídica, aunque los resultados son variables en distintos estudios (Amado y Monserrat, 2010; Chen *et al.*, 2012; Paskerová *et al.*, 2012).

La función de los lisosomas también puede estar alterada por la exposición a MCLR, tanto en mamíferos como en peces, aunque los estudios se limitan sólo a hígado, riñón y gónadas (Boaru *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2013; Pichardo *et al.*, 2005). En el intestino de ratas expuestas a MCLR por *i.p.*, Moreno *et al.* (2003) sugieren que los lisosomas serían afectados, ya que observan aumento en la actividad de la enzima fosfatasa ácida, a la cual describen como un marcador ligado a la función de la membrana de los lisosomas. Por otro lado, se ha descrito que en mamíferos (en células hepáticas y de Sertoli), MCLR desestabiliza la membrana lisosomal por estrés oxidativo (Alverca *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2016). El H_2O_2 puede difundir con facilidad hacia la matriz lisosomal y reaccionar con el Fe^{II} , el cual está muy concentrado dentro de los lisosomas (Kurz *et al.*, 2011). A través una reacción de Haber-Weiss, el Fe^{II} y el H_2O_2 producen radicales hidroxilo $\cdot\text{OH}$ que provocan la peroxidación de la membrana lisosomal (Kurz *et al.*, 2008; Pourahmad *et al.*, 2010). La MCLR también podría afectar la función de los lisosomas por medio de la hiperfosforilación de la dineína citoplasmática, lo que provoca la inhibición de la función ATPasa de dicha proteína, que es necesaria para

la unión de la membrana lisosomal a los microtúbulos del citoesqueleto (Boaru *et al.*, 2006; Runnegar *et al.*, 1999). En otros estudios, se observó proliferación de lisosomas en hepatocitos expuestos a MCLR y se sugirió que estas organelas podrían participar en la remoción de la toxina (Atencio *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007).

Los lisosomas están muy relacionados con las mitocondrias, debido a que la alteración de la función de una de estas organelas altera la función de la otra. La producción de ROS por parte de la mitocondria promueve la desestabilización de la membrana lisosomal y esto, a su vez, hace que los lisosomas liberen ROS y enzimas lisosomales que desestabilizan la membrana mitocondrial (Menezes *et al.*, 2013; Pourahmad *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2003). La desestabilización de las funciones lisosomales y mitocondriales promueve las señales celulares que dan inicio al proceso de muerte celular por apoptosis, como la liberación de citocromo c, que provoca la activación de las enzimas caspasas iniciadoras y ejecutoras (Brunk *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2016; Li y Ma, 2017). Los estudios de la relación entre MCLR y la apoptosis celular se han abordado sólo en hígado y riñón de mamíferos y peces, pero no en el intestino (Qin *et al.*, 2010; Zegura *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015).

A través de una reacción de conjugación catalizada por la enzima GST, el GSH se une al grupo carbonilo α,β -insaturado de Mdha⁷ de la MCLR, (Kondo *et al.*, 1992; Pflumacher *et al.*, 1998; Takenaka, 2001). Diversos autores han sugerido que el consumo de GSH en la conjugación con MCLR es una causante adicional de estrés oxidativo, ya que las células quedan limitadas en su capacidad antioxidante frente a ROS (Gehring, 2003; Pace *et al.*, 1991; Peuthert y Wiegand, 2004). El conjugado MC-SG es menos tóxico que la MCLR nativa dado que tiene un mayor tamaño molecular que provoca un impedimento estérico para la unión con la subunidad catalítica de las PP (Metcalf *et al.*, 2000; Pflumagher *et al.*, 2001). Además, el conjugado MC-SG puede ser transportado fuera de la célula por transportadores de membrana pertenecientes a la subfamilia ABCC, lo cual le aporta a las células la resistencia frente a la MCLR (Deeley *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2002; Malbrouck y Kestemont, 2006).

Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que en el intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* y *Odontesthes hatcheri*, MCLR se conjuga con GSH y se

excreta hacia el lumen intestinal, lo que sugiere la participación del transportador ABCC2 (Bieczynski *et al.*, 2014; 2016). Los ejemplares de *O. hatcheri* alimentados con la toxina, muestran una cierta compensación del efecto tóxico de la MCLR sobre la enzima PP1 (Bieczynski *et al.*, 2013; 2016). Esta compensación del efecto tóxico sugiere que el sistema de defensa GST-ABCC sería modulado por MCLR. En experimentos previos, demostré que este tipo de modulación ocurre en el intestino medio de *O. mykiss*, luego de la exposición *in vivo* a As^{III}, un sustrato de GST y ABCC2 (Painefilú *et al.*, 2019). En tiras intestinales, el As^{III} aumenta la actividad y la expresión génica del transportador ABCC2, llegando a compensar totalmente los efectos tóxicos de la MCLR sobre la PP1. A partir de estos antecedentes, en este trabajo se plantea la interrogante de si MCLR también actúa como un modulador de la expresión génica y/o la actividad del sistema de detoxificación GST-ABCC2 en el intestino medio de *O. mykiss*. Cabe aclarar que en este trabajo, los términos “expresión génica”, “expresión de ARNm” o “regulación génica” hacen referencia a la transcripción de ADN a ARNm. Por otro lado, el término “regulación postraduccional” hace referencia a aquellos mecanismos que provocan cambios en la actividad de las proteínas.

La expresión de los genes que codifican para las proteínas que intervienen en el metabolismo y excreción de xenobióticos es controlada por factores de transcripción (Baldwin, 2019). Estas proteínas se encuentran inactivas en el citoplasma y se activan cuando interactúan con sus ligandos específicos, que pueden ser xenobióticos o compuestos endógenos (ligandos fisiológicos), o existen condiciones celulares como estrés oxidativo, y se desplazan hacia el núcleo (Lehmann *et al.*, 1998; Robinson-Rechavi *et al.*, 2003). En el núcleo, forman heterodímeros con otras moléculas que les permiten unirse a secuencias del ADN, denominadas “elementos de respuesta”, que promueven la transcripción de ADN a ARNm de los genes blanco (Hariparsad *et al.*, 2009; Robinson-Rechavi *et al.*, 2003).

Los factores de transcripción que se activan por ligando y tienen un ligando fisiológico conocido se denominan receptores nucleares. Ejemplos de receptores nucleares son PXR (por su nombre en inglés, *pregnane X receptor*), AhR (*Aryl hydrocarbon receptor*) y LXR (*liver X receptor*) y también receptores hormonales citoplasmáticos como ER (receptor de estrógenos). Cuando un ligando se une a

alguno de estos receptores, los mismos se desprenden moléculas co-represoras, que los mantienen en el citoplasma y ganan afinidad por las moléculas co-activadoras presentes en el núcleo y se desplazan hacia el interior del mismo (Baldwin *et al.*, 2019). Por otro lado, un ejemplo de factor de transcripción que se activa en respuesta al estrés oxidativo es Nrf2. En el citoplasma, Nrf2 está unido a la proteína represora Keap1 (por su nombre en inglés, *Kelch ECH associating protein 1*), la cual se inactiva por compuestos electrófilos prooxidantes, lo que provoca el desplazamiento de Nrf2 hacia el núcleo de la célula (Kansanen *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2004).

Las moléculas con las que los factores transcripción forman heterodímeros dentro del núcleo son variadas. PXR y LXR forman heterodímeros con RXR (por su nombre en inglés, *retinoid X receptor*), AhR se une a ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*) y Nrf2 se une a la proteína Maf. Tanto PXR-RXR como AhR-ARNT se unen a elementos de respuesta a xenobióticos (XRE, *xenobiotic response element*) (Ihunnah *et al.*, 2011; Rushmore y Kong, 2002). En cambio, LXR-RXR se une a elementos de respuesta específicos llamados LXRES (*LXR response elements*). Nrf2-Maf se unen al elemento de respuesta antioxidante (ARE, *antioxidant response element*) (Baldwin *et al.*, 2019).

Algunos de los genes aguas abajo que son regulados por los factores de transcripción son exclusivos de un solo factor, pero otros pueden ser regulados por más de un factor de transcripción. PXR modula la transcripción de enzimas de fase I como CYP3A4, CYP2B, de fase II como UGT, SULT y GST (Fan *et al.*, 2011; Kodama y Negishi, 2013; Shelby y Klaassen, 2006; Wagner *et al.*, 2005), y de los transportadores ABCB1, ABCC2 y ABCC3 (Rosenfeld *et al.*, 2003; Wassmur *et al.*, 2010). AhR por otro lado, activa la expresión de genes que codifican para enzimas de fase I como CYP1A, del transportador de membrana ABCG2 y de sí mismo (Denison *et al.*, 2011; Halwachs *et al.*, 2014; Schmidt y Bradfield, 1996). PXR y AhR son activados por xenobióticos variados. Por ejemplo PXR, es activado por rifampicina, clotrimazole, benzopireno, entre otros (Ihunnah *et al.*, 2011), mientras que AhR se activa comúnmente por hidrocarburos aromáticos policíclicos y halogenados (Machala *et al.*, 2001).

LXR está citado, en general, como parte importante del metabolismo de lípidos, principalmente en el hígado de peces y mamíferos (Chisaki *et al.*, 2009; Cruz-García *et al.*, 2009). Allí, activa la transcripción de transportadores ABC como ABCA1 y ABCG1 (entre otros), implicados en el transporte de colesterol (Kennedy *et al.*, 2005; Venkateswaran *et al.*, 2000). Sin embargo, Chisaki *et al.* (2009), demostraron que la activación de LXR α aumenta la transcripción de ABCC2 en líneas celulares hepáticas de mamíferos. Otros autores sugieren que LXR puede mediar en la remodelación de los fosfolípidos de la membrana plasmática, provocando cambios en las características biofísicas de la misma y así modificar la función de las proteínas insertas en ella, como los ABC (Hegadüs *et al.*, 2015; Rong *et al.*, 2013). La activación de LXR ocurre cuando interactúa con ligandos como los oxisteroles (formas oxidadas de colesterol). *Salmo salar* y *O. mykiss* expresan sólo una variante de LXR, la cual es homóloga a LXR α de mamíferos (Cruz-García *et al.*, 2009). Estos autores también describen que LXR está expresada en mayor proporción en el intestino que en el hígado.

Por otra parte, Nrf2 modula la expresión de genes de enzimas antioxidantes y de regulación del metabolismo del glutatión (Aleksunes y Klaassen, 2012, Kansanen *et al.*, 2013; Unoki *et al.*, 2020). Nrf2 interviene en el metabolismo del glutatión induciendo la expresión de la ligasa glutamato-cisteína (GCL) (la enzima limitante en la síntesis de GSH) y también promueve la expresión génica de las enzimas GST y GR (Kobayashi *et al.*, 2009; Kumagai y Sumi, 2007). Nrf2 también activa los transportadores de membrana ABCB1 (Jeddi *et al.*, 2018; Sadeghi *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014), ABCC1 (Hayashi *et al.*, 2003; Ibbotson *et al.*, 2017), ABCC2 (Maher *et al.*, 2007; Rigalli *et al.*, 2018; Tanaka *et al.*, 1999; Vollrath *et al.*, 2006) y ABCG2 (Singh *et al.*, 2010). La mayor parte de los estudios sobre Nrf2 están enfocados en mamíferos y en órganos como el hígado (Fontagné-dicharry *et al.*, 2014; Yanaka, 2018).

Diversos autores, sugieren la posibilidad de fenómenos de sinergismo y/o regulación cruzada (*crosstalk*) entre los factores de transcripción mencionados. En túbulos renales de mamíferos PXR y AhR son activados por la micotoxina ocratoxina y PXR, a su vez, activa a Nrf2 (Lee *et al.*, 2018). En líneas celulares hepáticas de ratón, AhR modula la expresión de Nrf2 a través de la unión del

heterodímero AhR-ARNT al elemento XRE (Kwak *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2005). Aleksunes y Klaassen (2012) sugieren que la expresión aumentada de los genes que codifican para proteínas como NAD(P)H quinona óxido-reductasa (Nqo1), así como para varias isoformas de GST, ABCC2, ABCC3 y ABCC4, está afectada por el incremento conjunto de la expresión de PXR, AhR y Nrf2. Por otro lado, también existen *crosstalk* negativas, donde la activación de un factor, inactiva a otro. Por ejemplo, Cui *et al.* (2017) demostraron que la activación de PXR inhibe la activación de AhR en células hepáticas humanas. En hígado de ratón, el aumento de la expresión ARNm de Abcc2 está asociado al aumento la expresión de ARNm de AhR y Nrf2, y a la disminución de la expresión de ARNm de PXR (Maher *et al.*, 2005). En cuanto a MCLR, solo Li *et al.* (2013) han descripto que la exposición *in vivo* a MC puede aumentar la transcripción de ARNm de PXR y AhR en el hígado del pez cebra (*Danio rerio*). Por esta razón, se plantea la interrogante de si MCLR puede modular la expresión de los receptores nucleares mencionados en este capítulo, en el intestino de *O. mykiss*.

Objetivo

En este capítulo se planteó estudiar los efectos de MCLR en el intestino medio *Oncorhynchus mykiss* luego de la administración de esta toxina a través de la dieta durante 12, 24 y 48 h, mediante el análisis del contenido de GSH y glutatión total, la actividad de las enzimas GR, GST y PP1, y la integridad de la membrana lisosomal. Además, se estudió el efecto sobre el sistema MXR en experimentos donde se evaluó el transporte a través de proteínas ABCC del sustrato específico DNP-SG y se complementó con el estudio de la expresión de ARNm de ABCC2, GST- π , GST- ω , y de los factores de transcripción Nrf2, PXR, AhR, ARNT y LXR.

Hipótesis

La MCLR, absorbida en el intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*, modula la función y la expresión de proteínas involucradas en el sistema MXR.

P1: El transporte de DNP-SG y la actividad GST serán mayores en los peces alimentados con MCLR, entre las 12 y 48 horas de exposición.

P2: La expresión de ARNm de las proteínas ABCC2, GST- π y GST- ω será mayor en los peces alimentados con MCLR y se acrecentará entre las 12 y 48 horas de exposición.

P3: La expresión de ARNm de uno o más de los factores de transcripción Nrf2, PXR, AhR, ARNT y LXR será mayor en los peces alimentados con MCLR.

P4: Los efectos citotóxicos, como la inhibición de la actividad PP1 y el daño a la membrana lisosomal, serán cada vez menores a medida que transcurra el tiempo de exposición a MCLR, entre las 12 y 48 horas.

CII.2. Metodología

CII.2.1. Extracto de MCLR

La MCLR se extrajo a partir de un cultivo de *Microcystis aeruginosa*, siguiendo el protocolo puesto a punto por la Lic. María Carolina González (González, tesis doctoral en redacción). Para la extracción de la toxina, se obtuvieron muestras a partir del cultivo, que se acidificaron a pH 3 con ácido acético y luego se lisaron en un baño de ultrasonido de 1,3 L (Aquasurvey Inc.®) por inmersión durante 90 min, a 24°C. Cada muestra se filtró a través de filtros Whatman GF/C y luego a través de cartuchos de extracción en fase sólida C-18 (Phenomenex. 500 mg x 6 mL). Cada cartucho se acondicionó con 2 mL de una solución 70:30 de hexano + metanol y luego con 5 mL de solución 70:30 de metanol + agua destilada. Luego de pasar las muestras, los cartuchos se lavaron sucesivamente con 10 mL de agua destilada, 10 mL de metanol 10% y 5 mL de metanol 20%. Finalmente, se dejaron secar mediante aspiración de aire durante 20 min y la toxina se eluyó con metanol 90%.

El extracto se caracterizó mediante un análisis completo por HPLC-UV y espectrometría de masa. Para ello, se evaporó el metanol de la muestra y el residuo se resuspendió en 1 mL de agua destilada. De esta muestra, se inyectaron 10 µL en una columna analítica Luna C18.3m (Phenomenex), montada en un equipo HPLC-UV de fase reversa (Hewlett Packard). La fase móvil consistió en acetonitrilo/acetato de amonio 0,01 mol L⁻¹, pH 5,2. El pico de absorbancia para MCLR se registró a 238 nm (Figura CII.1a). Mediante un barrido de longitudes de onda se corroboró la existencia de un solo pico significativo, correspondiente a la MCLR (figura CII.1b). Para el análisis por espectrometría de masas se inyectaron 10 µL de muestra y se utilizó un equipo UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000, acoplado a un espectrómetro de masa TSQ Quantum Access Max y a un ionizador por electropulverización. Se confirmó la identidad de la toxina mediante la detección de la señal molecular (m/z 995,5) y de los fragmentos (m/z 599,5).

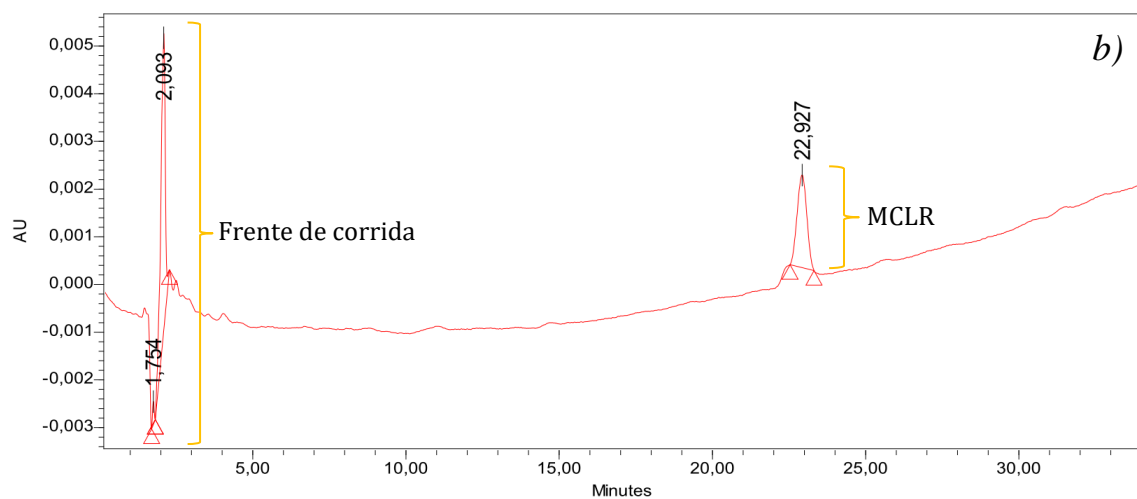
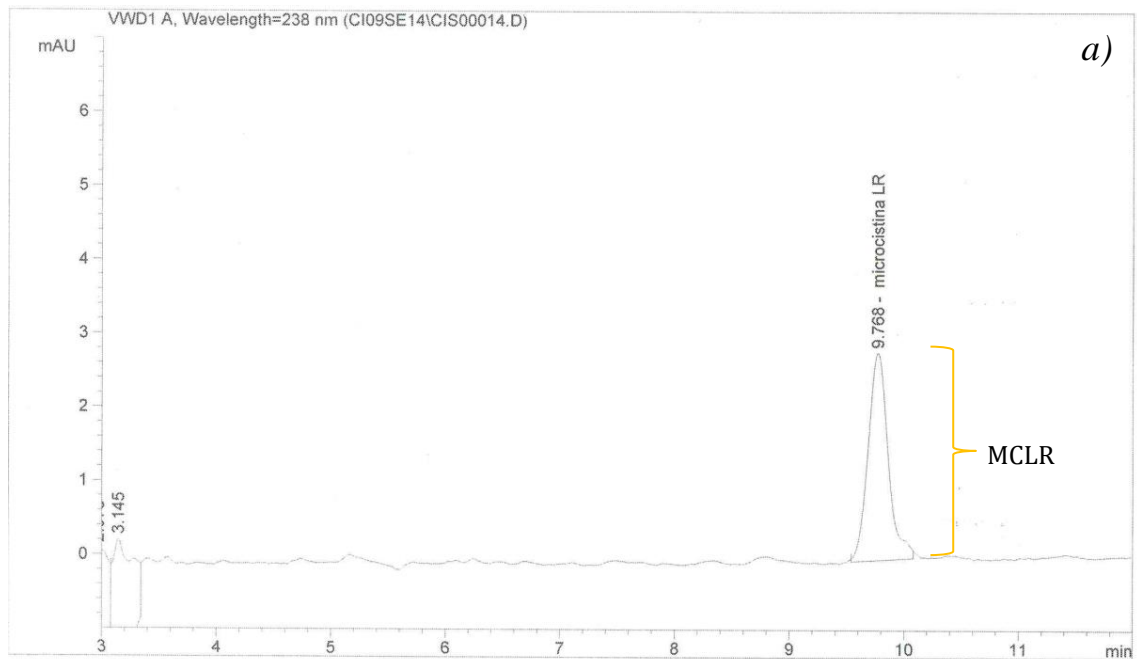
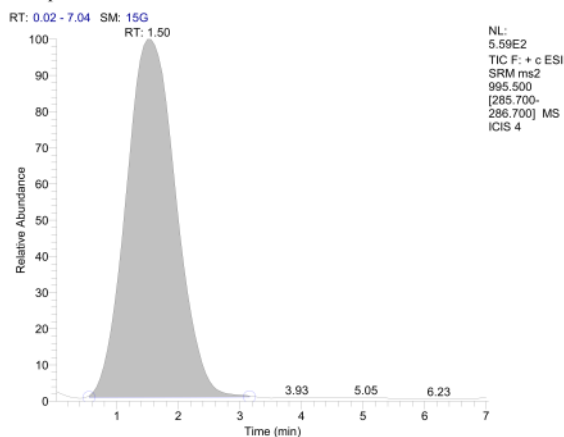


Figura CII.2. Los cromatogramas muestran los picos de absorción para microcistina-LR (MCLR) a 238 nm (a) y en un barrido a varias longitudes de onda (b).

Component Name: MCLR

a



Details

Component Name: N/A

Actual RT(min): 1.5
Specified Amount: N/A
Calculated Amount: 65107.95000
%Diff: N/A
Response: 31227.29843
Response Ratio: 31227.298
Base Line: BB
Signal To Noise: 147.04
Saturated: No
Peak Status: Response High
System Suitability: Not Tested: S R W T O B N C D
Data Flags: NA
Calibration Flags: NA

Calibration Curve

b

Component Name: MCLR

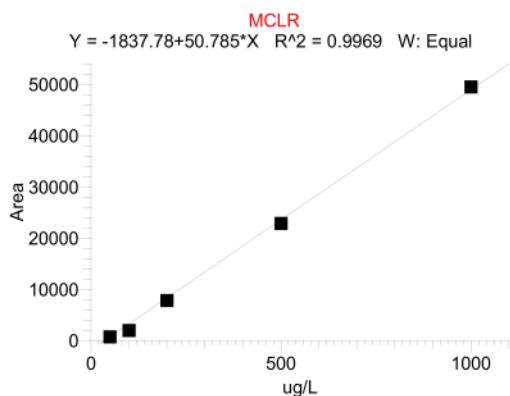


Figura CII.3. Informe cuantitativo del espectrómetro de masa TSQ Quantum Access Max. a) Cromatograma de los iones detectados por MS/MS (m/z 995,5). b) Curva de calibración para la cuantificación de microcistina-LR (MCLR), regresión lineal del área de los picos de absorción vs. concentración de estándar de MCLR ($\mu\text{g L}^{-1}$).

CII.2.2. Peces y exposición *in vivo*

Para los experimentos de este capítulo, se seleccionaron juveniles de *O. mykiss* de $10,35 \pm 1,34$ g de masa corporal, de la piscicultura del CEAN (para detalles de los acuarios, ver metodología general, sección 2.2). Este tamaño de peces resultó adecuado porque permitió utilizar relativamente poca cantidad de toxina y se pudieron colocar varios peces por pecera. Los individuos se distribuyeron en acuarios de vidrio de 70 L c/u. Una vez distribuidos en los acuarios, los peces se mantuvieron en ayuno, durante un periodo de aclimatación de 48 h. Transcurrido el mismo, se realizó un recambio de agua y se comenzó con el experimento. Durante la aclimatación y el experimento, los acuarios se mantuvieron a una temperatura de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Se definieron tres tiempos de exposición, 12, 24 y 48 h, y los peces se alimentaron cada 12 h, con restricción alimentaria de 0,5% de la masa corporal. Los controles recibieron alimento comercial (Control) y los tratados recibieron alimento comercial embebido en $0,5 \mu\text{g MCLR g pez}^{-1}$ (MCLR) (tabla CII.1). La concentración de MCLR se seleccionó a partir de la literatura (Kotak *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2005). Para cada tiempo de exposición se utilizaron dos acuarios, uno para los peces control y otro para los peces alimentados con MCLR. Cada acuario contó con una carga máxima de 10 peces.

CII.2.3. Preparación del alimento embebido en MCLR

Se pulverizaron pellets de alimento comercial Ganave en un mortero y se agregó solución de MCLR hasta formar una pasta, que se utilizó para formar pellets de tamaño adecuado y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 h en oscuridad. Esta técnica se puso a punto en un trabajo anterior de nuestro laboratorio (Bieczynski *et al.*, 2013), en el cual se pudo comprobar su eficacia para liberar la toxina en el tubo digestivo.

Tabla CII.1. Esquema de alimentación (A) y muestreos (M) de individuos de *Oncorhynchus mykiss* ($10,35 \pm 1,34$ g) expuestos *in vivo* durante 12, 24 y 48 h. Los controles recibieron alimento comercial (Control) y los tratados recibieron alimento comercial embebido en $0,5 \mu\text{g MCLR g pez}^{-1}$ (MCLR).

Tratamiento <i>in vivo</i> (Control y MCLR)	Tiempo del experimento (h)				
	0	12	24	36	48
12 h	A	M			
24 h	A	A	M		
48 h	A	A	A	A	M

Al finalizar cada exposición, los peces se sacrificaron con un golpe en la cabeza y destrucción inmediata del sistema nervioso. El intestino se removió y se cortó en tiras para las distintas determinaciones. En la figura CII.4 se esquematizan los marcadores de efectos bioquímicos intracelulares y de la función de los transportadores ABCC, en relación con la exposición a MCLR a través del alimento.

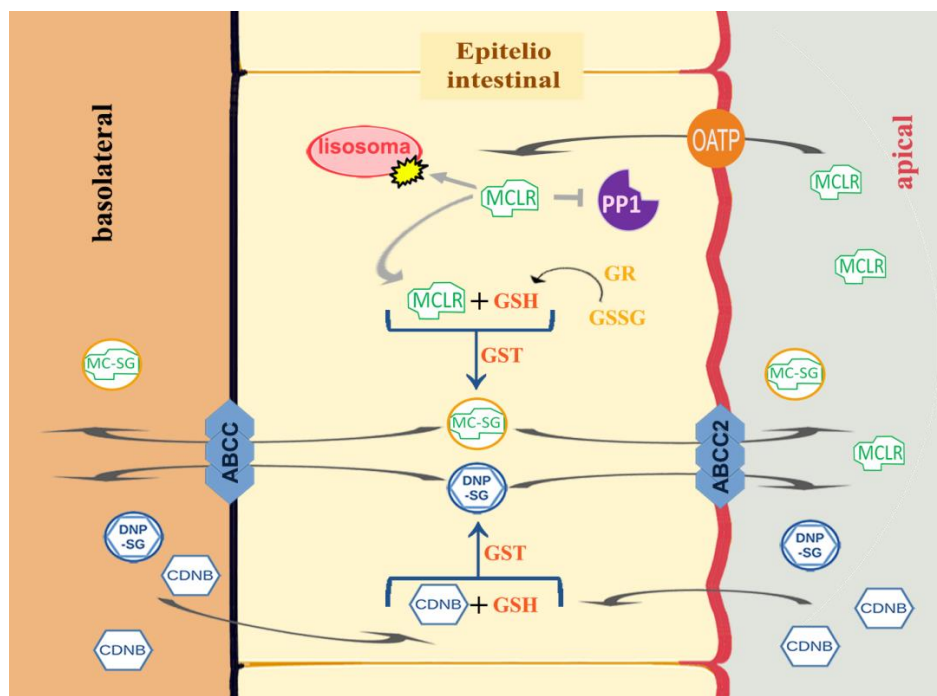


Figura CII.4. Esquema general del epitelio intestinal de *Oncorhynchus mykiss*, donde se representan los principales marcadores de efectos bioquímicos intracelulares y de la función de los transportadores ABCC, analizados en este capítulo, en función de la exposición a microcistina-LR (MCLR) a través del alimento.

CII.2.4. Función de los transportadores ABCC

Para analizar la función de los transportadores ABCC se utilizaron entre 7 y 8 peces por cada tratamiento (control y MCLR, de cada tiempo de exposición, n = 7-8). La actividad de los transportadores se estimó en preparaciones *ex vivo*, a través de la medición de la tasa de transporte de DNP-SG y acorde a lo detallado en la sección 2.4 de la metodología general.

CII.2.5. Determinaciones bioquímicas

CII.2.5.1. Glutación y enzimas asociadas

Para determinar el contenido de GSH y glutación total y la actividad de las enzimas GST y GR, se utilizaron entre 6 y 9 peces por cada tratamiento (control y MCLR de cada tiempo de exposición, n = 6-9). Los intestinos se homogeneizaron en buffer fosfato de potasio 143 mmol L⁻¹ + EDTA, pH 7,5 (ver sección 2.5.1 de la metodología general), con un homogeneizador Cole-Parmer LabGen 7 a 5000 rpm. Los homogenatos se centrifugaron a 9700 x g durante 15 min, 4°C.

Los sobrenadantes se alicuotaron para realizar las distintas determinaciones. El contenido de GSH y de glutación total se midieron en el mismo día en que se realizó el muestreo del experimento.. Todas las determinaciones se realizaron acorde a los protocolos descritos en la sección 2.5.1 de la metodología general, Las determinaciones enzimáticas se realizaron en un periodo de tiempo no mayor a una semana luego realizado el homogenato. El contenido de proteína total se determinó acorde al método de Lowry (1951) (sección 2.5.8 de la metodología general).

CII.2.5.2. Actividad PP1

La actividad de la enzima PP1 se estimó en intestinos provenientes de 8-14 peces de cada tratamiento (control y MCLR de cada tiempo de exposición, n = 8-14). La preparación de los homogenatos y el ensayo bioquímico se realizaron acorde al protocolo detallado en la sección 2.5.7 de la metodología general. Los intestinos se homogeneizaron en buffer Stock PP1, pH 8,6 y luego se centrifugaron a 9700 x g durante 15 min, 4°C. El ensayo bioquímico se realizó el mismo día en que se realizó el muestreo del experimento.

CII.2.6. Estabilidad de la membrana lisosomal

La estabilidad de la membrana lisosomal se evaluó en enterocitos aislados provenientes de entre 6 y 8 peces por cada tratamiento (control y MCLR de cada tiempo de exposición, n = 6-8). Las suspensiones de enterocitos aislados se realizaron según lo detallado en la sección 2.3.4 de la metodología general. La integridad de la membrana lisosomal se evaluó midiendo el NRRT50, de acuerdo a como se describe en la sección 2.6.2 de la metodología general.

CII.2.7. Producción de ROS y estabilidad de la membrana lisosomal *in vitro*

Para analizar la producción de ROS a partir de la exposición a MCLR y su relación con el daño a lisosomas, se estimó el porcentaje de ROS y el NRRT50 en una incubación de enterocitos *in vitro* por 1 hora. Para este ensayo se utilizaron peces sin previa exposición a MCLR *in vivo* (n = 6-7). La producción de ROS se estimó de acuerdo a lo descrito en la sección 2.5.6 de la metodología general, en suspensiones de 10^5 células viables mL^{-1} , incubadas con MCLR 0 (control), 0,1 y 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (diluida en solución Cortland). El NRRT50 se estimó de acuerdo a lo descrito en la sección 2.6.2 de la metodología general, en suspensiones de 10^6 células viables mL^{-1} expuestas a concentraciones crecientes de MCLR de 0 a 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

CII.2.8. Expresión génica

Para estudiar la expresión de ARNm de ABCC2, GST- π , GST- ω , Nrf2, PXR, AhR, ARNT y LXR (tabla CII.1), se utilizaron 9 peces por tratamiento y se los analizó en grupos de 3 (control y MCLR por cada tiempo de exposición, n = 3). Cada intestino fue removido en frío y sumergido en fijador RNAlater™. Según las instrucciones del fabricante, el órgano se dejó en el fijador durante 24 horas a 4°C, para que el mismo penetrara adecuadamente en los tejidos. Transcurrido ese tiempo, se retiró el excedente de fijador y las muestras fueron almacenadas a 20°C hasta su procesamiento.

CII.2.8.1. Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó acorde al protocolo de De Anna (2019). Se realizó una extracción utilizando el reactivo Trizol® (Ambion), a partir

de tiras de intestino, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En primera instancia, se homogeneizaron 50-100 mg de tejido con Trizol[®], utilizando un homogeneizador manual y luego se agregó Trizol[®] hasta completar 1 mL. Las muestras homogenizadas, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, para permitir que el complejo de nucleoproteína se dissociara completamente. A continuación, por cada mL de Trizol[®] se agregaron 0,2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente en forma manual durante 15 s y luego se incubó durante 2-3 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12000 x g por 15 min, a 4°C. A continuación, los tubos se calentaron a 45°C y se trasvasó la fase acuosa a un nuevo tubo. Se agregaron 0,5 mL de isopropanol al 100% por cada mL de Trizol[®], con el objetivo de precipitar el ARN. Los tubos se incubaron a 20°C por 1 h y luego se centrifugaron a 12000 x g por 10 min a 4°C. De esta forma, el ARN formó un pellet blancuzco. Se removió el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de etanol 0,75% por cada mL de Trizol[®]. Luego del lavado los tubos se agitaron y se centrifugaron a 7500 x g por 5 min, a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se dejó secar durante 5-10 min. Transcurrido este tiempo, el ARN se resuspendió en 50 µL de agua libre de ARNasas, pipeteando varias veces para disgregar completamente el pellet. Finalmente, la muestra se incubó en un bloque calefactor a 55°C por 15 min. El rendimiento de la extracción y la pureza del ARN total se determinaron en un espectrofotómetro UV-Visible, mediante la relación OD 260/230 y 260/280.

CII.2.8.2. Síntesis de ADNc

Para sintetizar ADNc, se usaron 2 µg de ARN total por muestra, extraído en la sección anterior, y la enzima M-MuLV, transcriptasa reversa Revert Aid (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). La reacción se llevó a cabo en tubos estériles, agregando 2 µg de ARN por muestra, 0,5 µg de Oligo DT, agua tratada con Dietilpirocarbonato hasta completar 12,5 µL, 4 µL del buffer de reacción (pH 8,3 a 25°C; Tris-HCl 250 mmol L⁻¹, KCl 250 mmol L⁻¹, MgCl 220 mmol L⁻¹, DTT 50 mmol L⁻¹), 0,5 µL (20 U) de inhibidor de ARNasas RiboLock (Thermo Scientific[™]), 2 µL de la mezcla de dNTP (10 mmol L⁻¹ c/u) y 1 µL (200 U) de la enzima M-MuLV, completando un volumen total de 20 µL por tubo. Luego de mezclar suavemente y centrifugar brevemente, los tubos se incubaron a 42°C por

60 min, luego a 60°C (temperatura de hibridación) y finalmente a 70°C durante 15 min, para inactivar la enzima. Para verificar la integridad del ADNc, se realizó una PCR convencional y se usó la secuencia de β -actina de *O. mykiss*, como cebador (*primer*). Para ello, se utilizaron 10 μ L de SYGB Green, 8 μ L de agua destilada milli-Q, 0,5 μ L del cebador (0,1 nmol L⁻¹) y 1 μ L de ADNc. El ciclado térmico incluyó 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 30 s a 72°C y 10 min de extensión final a 72°C. Las muestras se sembraron en un gel de agarosa 1% y se realizó una electroforesis a 80 V, durante 35 min. El gel se examinó bajo luz ultravioleta para determinar la presencia y posición de las bandas formadas por las muestras sembradas.

CII.2.8.3. Q-RT-PCR

Para realizar la reacción de q-PCR, se mezclaron 1 μ L de ADNc, obtenido en la sección anterior, 0,5 μ mol L⁻¹ de cada cebador, 8 μ L de agua y 10 μ L de 2 \times SYBR Green q-PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.). Las reacciones se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems). El ciclado térmico comenzó con 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 10 s a 95°C, 30 s de hibridación a 60-65°C (dependiendo de la temperatura de hibridación de los cebadores) y 20 s de extensión a 72°C. Como gen constitutivo de referencia, se usó β -actina. Los cebadores que se usaron para realizar las q-PCR se detallan en la Tabla CII.2. Se utilizaron los valores de Ct de cada gen para calcular su expresión mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). El Ct (por su nombre en inglés, *cycle threshold*) está definido como el número de ciclos al cuál, la señal fluorescente del producto de PCR, supera el umbral prefijado. Este valor se usa para cuantificar la cantidad de ARNm que se expresa, en forma relativa al control del experimento.

CII.2.9. Análisis estadístico

La homogeneidad de varianzas se probó con un test de Levene y la normalidad se probó con el test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas utilizando test t de Student, de medidas independientes. El estadístico $p < 0,05$ fue considerado como significativo estadísticamente (Zar, 1999). Para el análisis estadístico de los casos en que se

comparan porcentajes, se utilizó la transformación de arcoseno de la raíz de la proporción. Los resultados se expresan como media \pm EE.

Tabla CII.2. Listado de cebadores utilizados para evaluar la expresión de ARNm de los genes ABCC2, GST- π , GST- ω , PXR, AhR β , ARNT y Nrf2, en el intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*. Como gen constitutivo de referencia se usó β -actina. Están detalladas las secuencias Forward (F) y Reverse (R), el tamaño del amplicón y la especie donde están secuenciados: *Oncorhynchus mykiss* (OM), *O. kisutch* (OK) y/o *Salmo salar* (SS).

Descripción	Gen	Secuencia 5' → 3'	Amplicon (pb)	Especie	Referencia
β - actina	β - actina	F TGAAGTGTGACGTGGACATCCGTA R AGGTGATCTCCTTCTGCATCCTGT	108	OM/OK/SS	Cárcamo <i>et al.</i> (2011)
<i>ATP-binding cassette subfamily C member 2</i>	ABCC2	F ATGCTGGGAAGATCGTGGAGTTTG R GAGAGCTGTGCTATCCAATGCAGT	142	OM/OK	XM_021604527.1
<i>Glutathione S-transferase class pi</i>	GST- π	F TATTGTGGGCTAATGTGT AAG AT R CCCTGAAGAGCTTTGTGCG	218	OK	AB026119.1 Espinoza <i>et al.</i> (2012)
<i>Glutathione S-transferase class omega</i>	GST- ω	F AGCTGCTCCCAGCTGATCC R CAAACCACGGCCACATCATGTAATC	246	OM	NM_001160618.1 Cárcamo <i>et al.</i> (2014)
<i>Pregnane X Receptor</i>	PXR	F GGGCATCTGGGAGTGTGGTC R GTAGGTTCCCTCAGGGTGTAGTGG	116	OM	Wassmur <i>et al.</i> , 2010
<i>Aryl hydrocarbon Receptor β</i>	AhR β	F GGA TGC CAC TGA GTT CCA AAC CAA R AAT GCC TGG TCT ATG GGT AGC TGA	147	OM/SS	NM_001124252.1
<i>Aryl hydrocarbon Receptor nuclear translocator</i>	ARNT	F ACCTGAATGCAGAGCAATCCCA R AGGGTGATTGAGGAAGAGCTGAGA	113	OM	NM_001124710.1
<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>	Nrf2	F GCAAATGAAGGACACACTGGA R AGGTTGGGCAATGGGTAGA	102	OM	HQ916348.1
<i>Liver X receptor</i>	LXR	F AGT GCC CAG TAT TCG TGC AAG AAC R AGA ACG CAT TGC TCC AGC AT	122	SS	XM_014174759.1

CII.3. Resultados

CII.3.1. Función de los transportadores ABCC

Se analizó la función de los transportadores ABCC mediante la medición de la tasa de transporte de DNP-SG en tiras de intestino medio provenientes de ejemplares de *Oncorhynchus mykiss*, alimentados durante 12, 24 y 48 h con alimento comercial (control) o con alimento embebido en MCLR (tratado). El tratamiento con MCLR alteró el transporte de DNP-SG de distintas formas, según el tiempo de alimentación. Luego de 12 h se observó una inhibición del 17% en la tasa de transporte de DNP-SG, con respecto al control ($t_{13} = 2,97$; $p < 0,05$, $n = 7-8$, figura CII.5a); a las 24 h no se registraron diferencias significativas con respecto al control ($t_{13} = 0,50$; $n = 7-8$, figura CII.5b); mientras que a las 48 h, la tasa de transporte de DNP-SG aumentó significativamente un 18%, en relación con el control ($t_{13} = 2,448$; $p < 0,05$, $n = 7-8$, figura CII.5c). El porcentaje de transporte de DNP-SG en los tratamientos con respecto su control correspondiente, fue significativamente más alto a las 48 h que a las 12 y 24 h (ANOVA de un factor y comparaciones *post hoc* de Tukey, $F_{2,19} = 7,64$, $p < 0,01$, $n = 9$, figura CII.5d).

CII.3.2. Glutación y enzimas asociadas

El contenido intracelular de glutación y la actividad de enzimas asociadas a su metabolismo se modificaron de acuerdo al tiempo de alimentación con MCLR. La actividad de la enzima GST mostró una inhibición significativa del 16%, en relación con el control, luego de 12 h de alimentación con MCLR ($t_{15} = 2,3$, $p < 0,05$, $n = 8-9$, figura CII.6a). Esta inhibición inicial fue compensada a las 24 y a las 48 h en los peces alimentados con MCLR, donde la actividad GST mostró una tendencia al aumento con respecto al control (12% y 13%, respectivamente), aunque las diferencias no fueron significativas (figuras CII.6b y c). Los porcentajes de actividad GST con respecto a los controles correspondientes fueron significativamente más altos a 24 y 48 h que a 12 h (ANOVA de un factor y comparaciones *post hoc* de Tukey, $F_{2,23} = 7,39$, $p < 0,05$, $n = 9$, figura CII.6d).

Los tratamientos con MCLR a 12 y 24 h no afectaron en forma significativa la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) (figuras CII.7a y b). En cambio, a las 48 h la actividad GR aumentó significativamente en un 51% en relación con el control, en los peces alimentados con MCLR, ($t_{13} = 2,50$, $p < 0,05$, $n = 7-8$, figura CII.7c). El porcentaje de actividad GR a cada tiempo de alimentación, con respecto al control correspondiente, fue significativamente más alto a 48 h que a 24 y 12 h (ANOVA de un factor y comparaciones *post hoc* de Tukey, $F_{2, 22} = 12,29$, $p < 0,001$, $n = 7-9$, figura CII.7d).

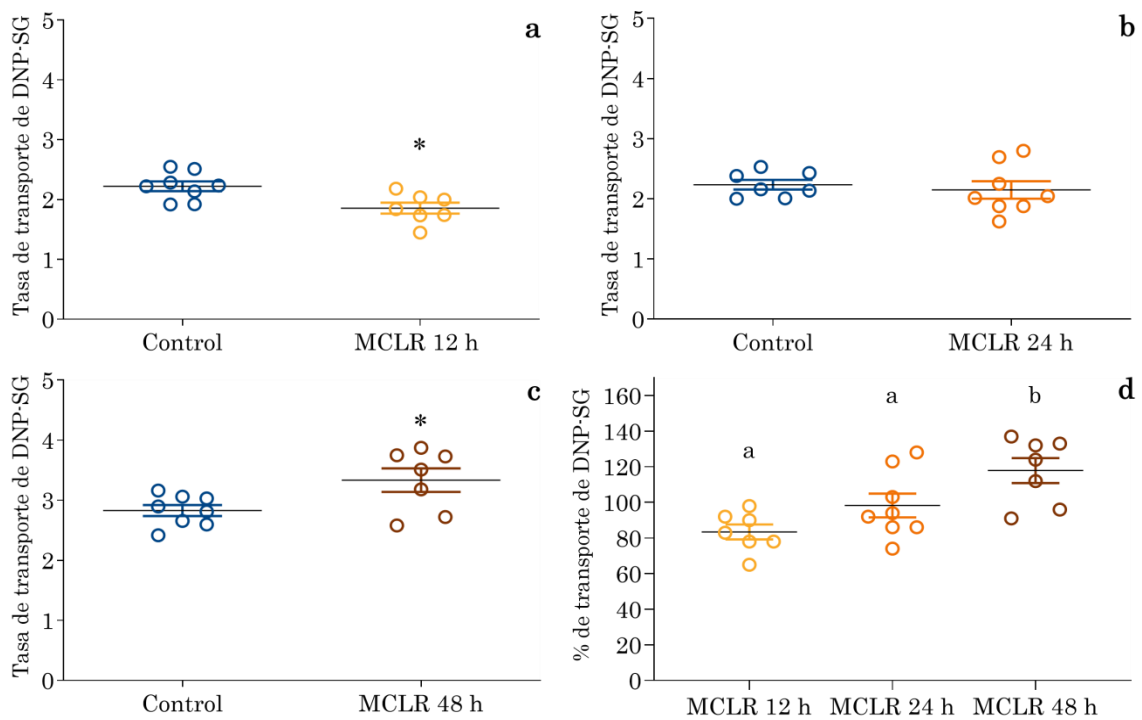


Figura CII.5. Tasa de transporte de DNP-SG en tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* luego de exposiciones *in vivo* a 0,5 µg MCLR g pez⁻¹, durante 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Los datos están expresados como µmol DNP-SG min⁻¹ g de tejido⁻¹ ($n = 7-8$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0,05$). (d) Efecto de MCLR a los distintos tiempos de exposición, expresado como porcentaje del control correspondiente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de exposición ($p < 0,05$). Todos los resultados están expresados como media ± EE.

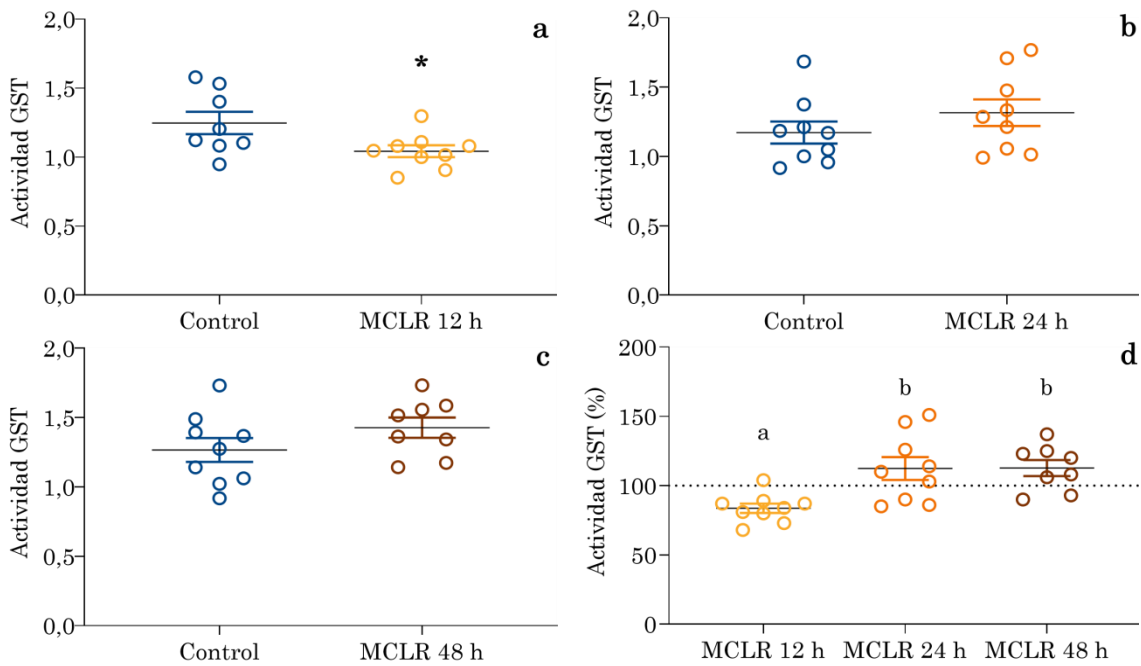


Figura CII.6. Actividad glutatión S-transferasa (GST) en tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* luego de exposiciones *in vivo* 0,5 μg MCLR g pez⁻¹ durante 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Los datos están expresados como $\text{nmol s}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ (n = 8–9). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (* $p < 0,05$). (d) Efecto de MCLR a los distintos tiempos de exposición, expresado como porcentaje del control correspondiente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de exposición ($p < 0,05$). Todos los resultados están expresados como media \pm EE.

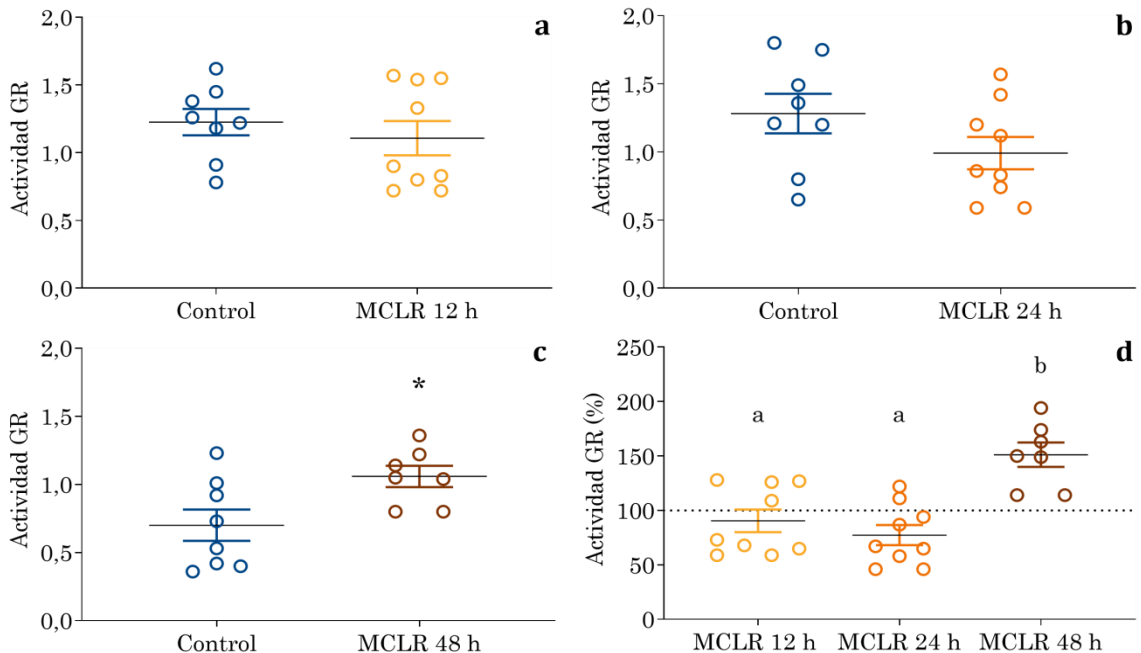


Figura CII.7. Actividad glutatión reductasa (GR) en tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* luego de exposiciones *in vivo* a 0,5 μg MCLR g pez⁻¹, durante 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Los datos están expresados como $\text{nmol s}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ (n = 7–9). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (* $p < 0,05$). (d) Efecto de MCLR a los distintos tiempos de exposición, expresado como porcentaje del control correspondiente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de exposición ($p < 0,05$). Todos los resultados están expresados como media \pm EE.

A 12 h de alimentación con MCLR, el contenido de GSH en el intestino medio de los peces se mantuvo sin cambios significativos, al igual que el contenido de GSSG, el cociente GSH/GSSG y el contenido de glutatión total. En cambio, a las 24 h, el contenido de GSH se redujo en forma significativa en un 38% con respecto al control ($t_{15} = 2,15$, $p < 0,05$, $n = 8-9$, figura CII.8b). A este tiempo, también se registraron tendencias a la disminución del 22% en el contenido de GSSG (figura CII.9b), del 19% en el cociente GSH/GSSG (figura CII.10b) y del 27% en el contenido de glutatión total (figura CII.11b). Sin embargo, ninguna de estas alteraciones fue estadísticamente significativa. Transcurridas las 48 h de alimentación, no se registraron diferencias con respecto al control en ninguna de estas cuatro variables.

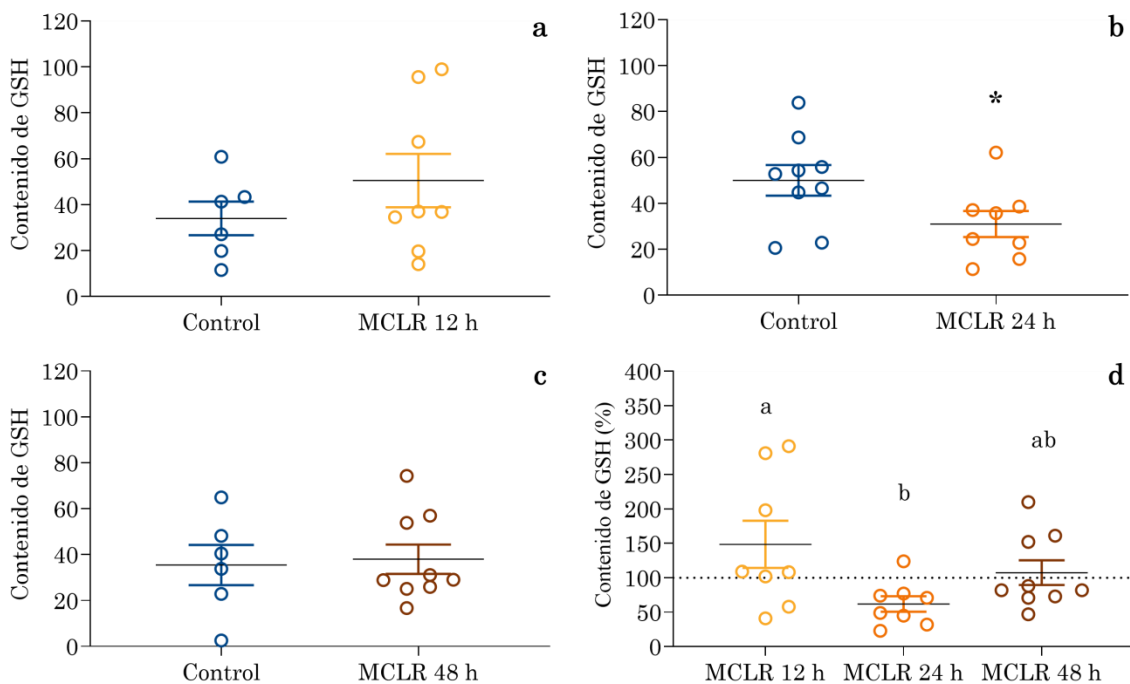


Figura CII.8. Contenido de glutatión reducido (GSH) (nmol GSH mg proteína⁻¹) en tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* luego de exposición *in vivo* a 0,5 µg MCLR g pez⁻¹ durante 12 h (a; n = 6-7), 24 h (b; n = 8-9) y 48 h (c; n = 6-9). El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0,05$). (d) Efecto de MCLR a los distintos tiempos de exposición, expresado como porcentaje del control correspondiente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de exposición ($p < 0,05$). Todos los resultados están expresados como media \pm EE.

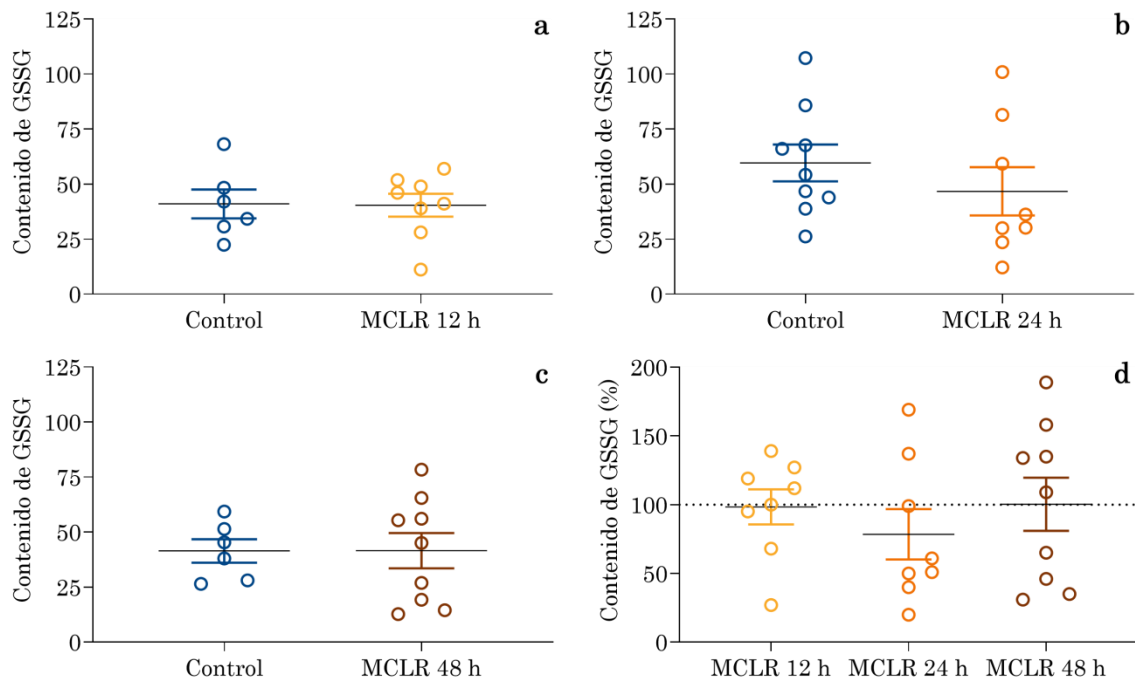


Figura CII.9. Contenido de glutatión oxidado (GSSG) (nmol GSSG mg proteína⁻¹) en tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* luego de exposición *in vivo* a 0,5 µg MCLR g pez⁻¹ durante 12 h (n = 6-7, a), 24 h (n = 8-9, b) y 48 h (n = 6-9, c). (d) Efecto de MCLR a los distintos tiempos de exposición, expresado como porcentaje del control correspondiente. Todos los resultados están expresados como media ± EE.

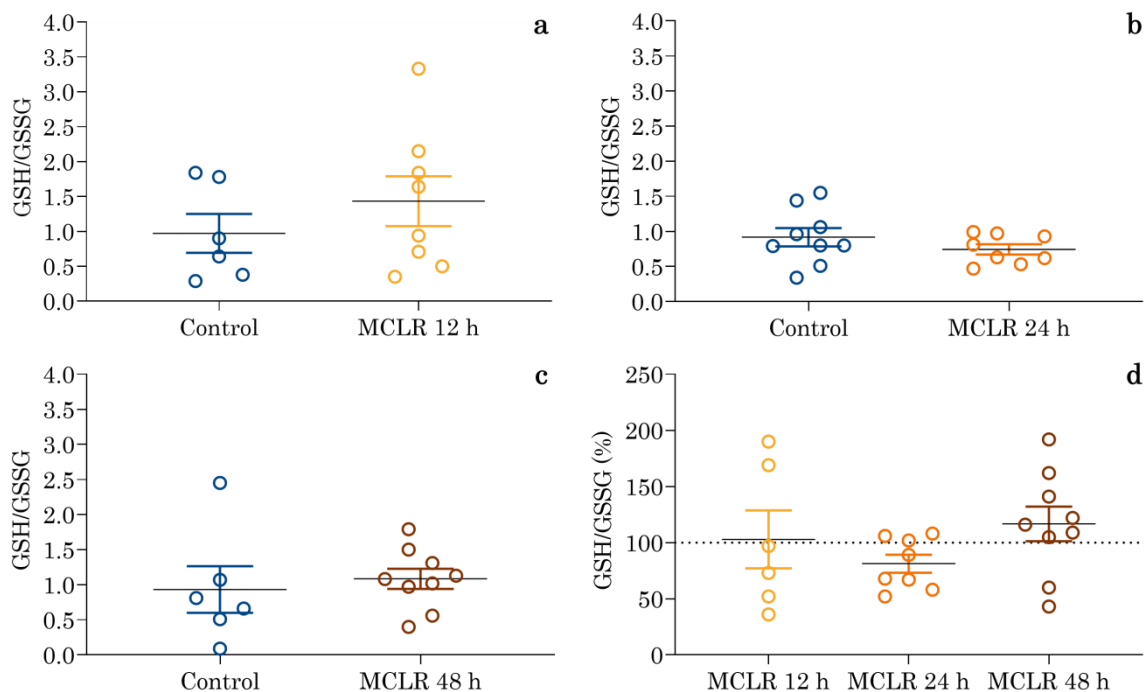


Figura CII.10. Cociente glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* luego de exposición *in vivo* a 0,5 µg MCLR g pez⁻¹ durante 12 h (n = 6-7, a), 24 h (n = 8-9, b) y 48 h (n = 6-9, c). (d) Efecto de MCLR a los distintos tiempos de exposición, expresado como porcentaje del control correspondiente. Todos los resultados están expresados como media ± EE.

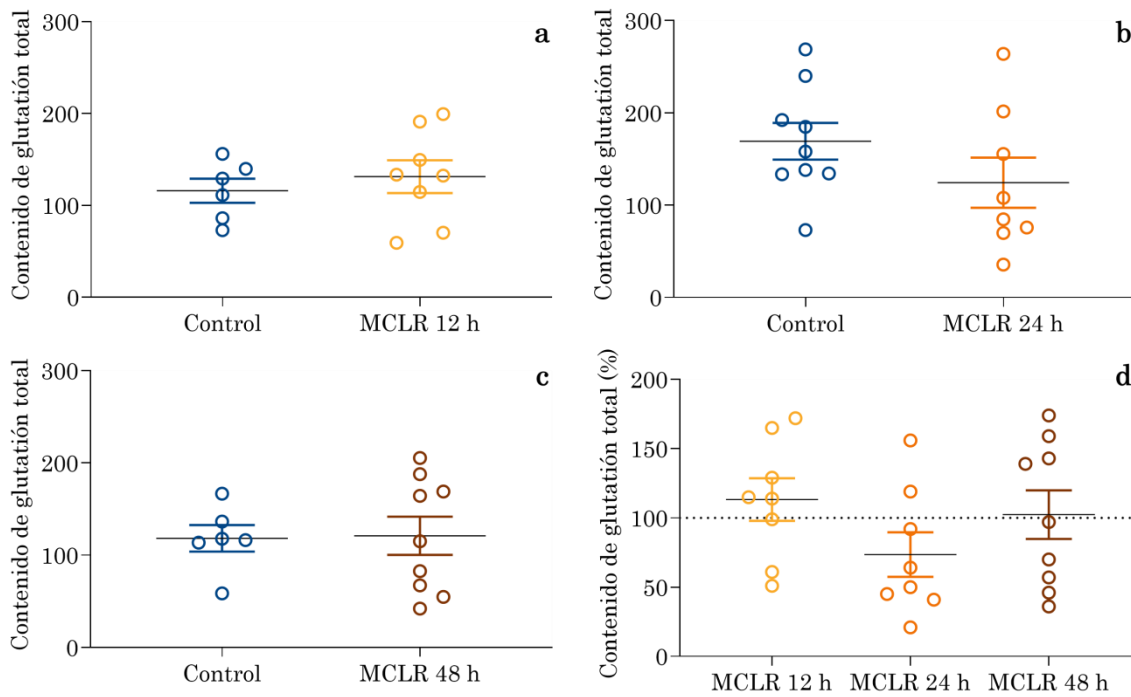


Figura CII.11. Contenido de glutatión total (nmol GSH mg proteína⁻¹) en tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* luego de exposición *in vivo* a 0,5 µg MCLR g pez⁻¹ durante 12 h (n = 6-7, a), 24 h (n = 8-9, b) y 48 h (n = 6-9, c). (d) Efecto de MCLR a los distintos tiempos de exposición, expresado como porcentaje del control correspondiente. Todos los resultados están expresados como media ± EE.

CII.3.3. Actividad PP1

La actividad de la enzima PP1, que es un blanco específico de muchas variantes de MC, fue inhibida en forma significativa con respecto al control en todos los tiempos de alimentación con MCLR. A las 12 h, la actividad PP1 disminuyó un 34%, ($t_{22} = 2,526$, $p < 0,5$, $n = 10-14$, figura CII.12a); a las 24 h, disminuyó un 22% ($t_{14} = 2,72$, $p < 0,05$, $n = 8$, figura CII.12b) y a las 48 h disminuyó 48% ($t_{17} = 4,56$, $p < 0,001$, $n = 9-10$, figura CII.12c). La inhibición porcentual de la actividad PP1 no difirió significativamente entre tiempos de alimentación (figura CII.12d).

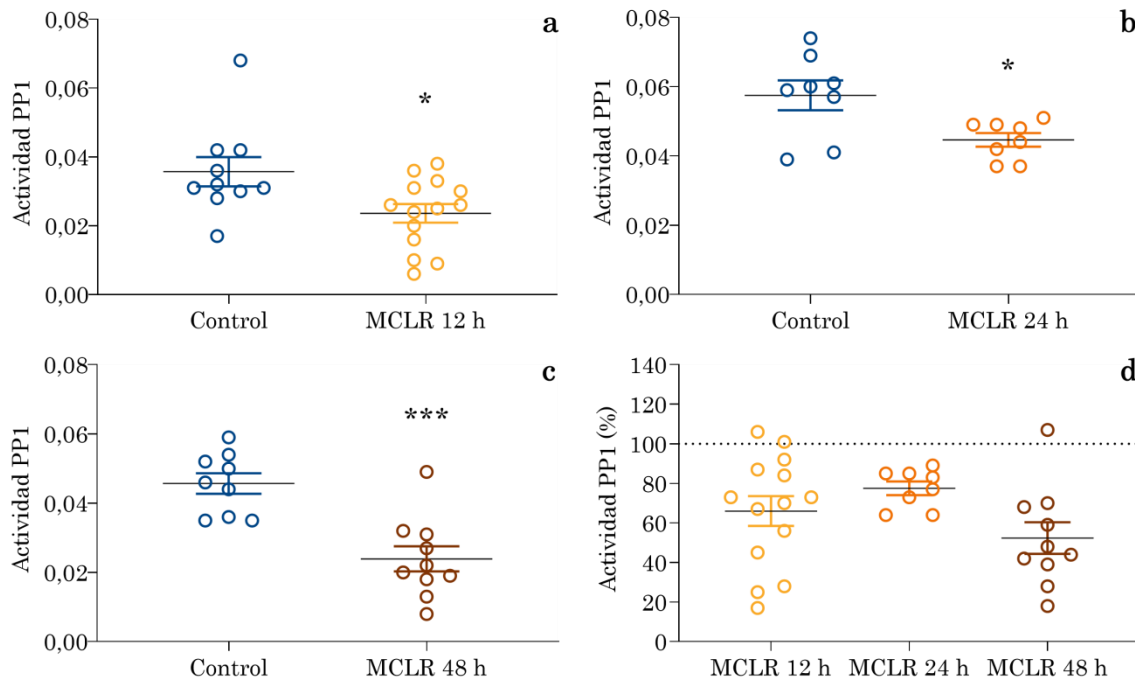


Figura CII.12. Actividad de la enzima proteína fosfatasa 1 (PP1) en tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* luego de exposiciones *in vivo* a 0,5 μg MCLR g pez^{-1} , durante 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Los datos están expresados como $\text{nmol s}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ ($n = 8-14$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). (d) Efecto de MCLR a los distintos tiempos de exposición, expresado como porcentaje del control correspondiente. Todos los resultados están expresados como media \pm EE.

CII.3.4. Estabilidad de la membrana lisosomal

El NRRT50 se determinó en enterocitos aislados a partir de intestino medio de peces alimentados con alimento comercial (control) o con alimento embebido en MCLR, durante 12, 24, 48 h. La estabilidad de la membrana lisosomal resultó afectada en todos los peces alimentados con MCLR. El NRRT50 disminuyó en un 53% con relación al control, luego de 12 h ($t_{12} = 2,63$, $p < 0,05$, $n = 6-8$, figura C2.13a), un 67% con relación al control, luego de 24 h ($t_{11} = 5,46$ $p < 0,001$, $n = 6-7$, figura C2.13b) y un 42% con relación al control luego de 48 h ($t_{10} = 3,80$ $p < 0,01$, $n = 6$, figura C2.13c). La disminución porcentual de NRRT50 no difirió significativamente entre tiempos de alimentación (figura C2.13d).

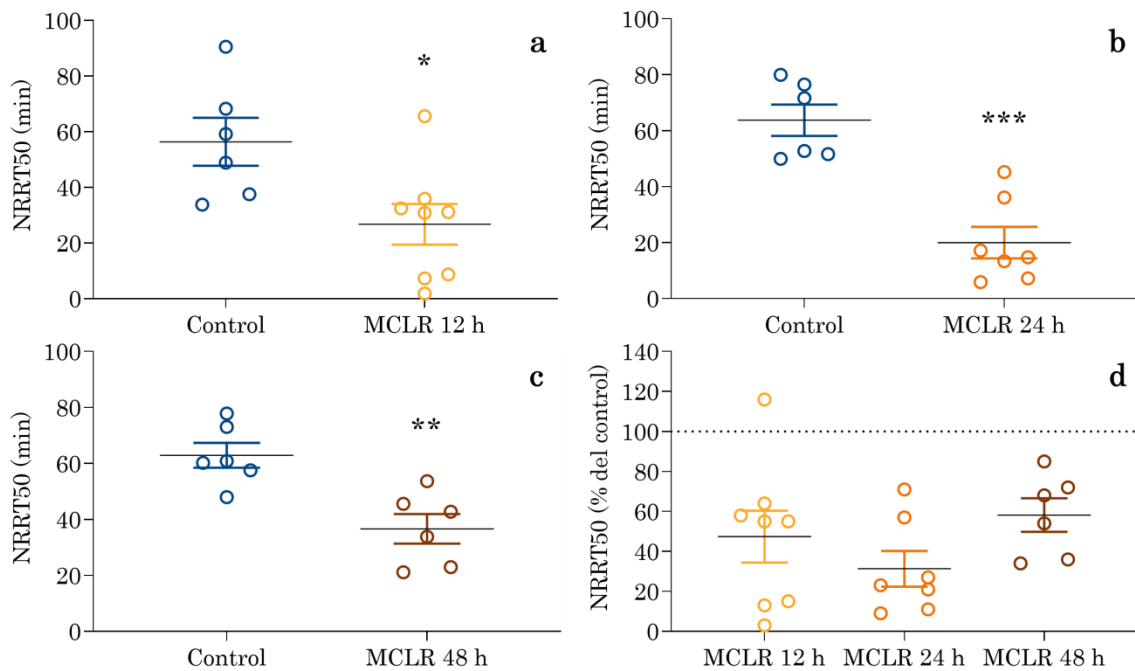


Figura CII.13. Tiempo de retención del rojo neutro del 50% de las células observadas (NRRT50) en enterocitos aislados del intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*, expuestas *in vivo* a 0,5 $\mu\text{g MCLR g pez}^{-1}$ ($n = 6-8$), durante 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (d) Efecto de MCLR a los distintos tiempos de exposición, expresado como porcentaje del control correspondiente. Todos los resultados están expresados como media \pm EE.

CII.3.5. Producción de ROS y estabilidad de la membrana lisosomal *in vitro*

Teniendo en cuenta la posible relación entre la estabilidad de la membrana lisosomal y la producción de ROS, sumado a que esto último no pudo ser analizado en los estudios *in vivo*, se completó el estudio de estas variables mediante la exposición *in vitro* a MCLR (durante 1 h) de enterocitos aislados de intestino medio de *O. mykiss*. Los enterocitos tratados con MCLR 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, no se diferenciaron con respecto al control, mientras que los enterocitos tratados con MCLR 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ mostraron un aumento significativo del 51,4% en la producción de ROS ($t_6 = 4,93$, $p < 0,01$, $n = 7$, figura CII.14a). Por otro lado, en el daño a lisosomas (NRRT50) se observó un efecto dependiente de la concentración de MCLR, que se analizó usando un modelo de regresión no lineal donde se graficó el NRRT50 (como porcentaje del control) vs. el logaritmo de la concentración de MCLR ($CI_{50} = 0,11 \mu\text{mol L}^{-1}$ MCLR; 95% CI = 0,02 a 0,52; $r^2 = 0,53$; $n = 6$; figura CII.14b).

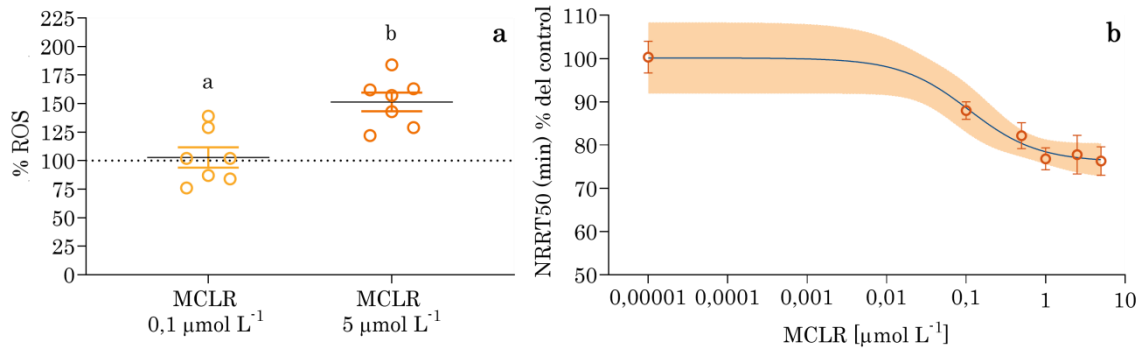


Figura CII.14. Exposición *in vitro* por 1 h a MCLR de enterocitos aislados de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*. a) Especies reactivas de oxígeno (ROS), como porcentaje del control, media \pm EE (n = 7); las letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$). b) Tiempo de retención del rojo neutro del 50% de las células observadas (NRRT50). Regresión no lineal de NRRT50 (min) vs. Log [MCLR] (en $\mu\text{mol L}^{-1}$), n = 6, $\text{CI}_{50} = 0,11 \mu\text{mol L}^{-1}$ MCLR, 95% IC = 0,02 a 0,52 (área coloreada), $r^2 = 0,53$.

CII.3.6. Expresión génica

El intestino medio de los peces alimentados con MCLR durante 12, 24 y 48 h fue analizado en cuanto a la expresión de ARNm de los genes ABCC2, GST- π , GST- ω , AhR β , ARNT y Nrf2. PXR también fue propuesto para el análisis de su expresión, pero esto no fue posible por problemas técnicos relacionados con la contaminación del cebador. Sin embargo, se conservaron muestras de ARN y ADNc para completar el trabajo cuando las condiciones lo permitan. De los genes que sí se pudieron analizar, no se obtuvieron cambios significativos en su expresión, a ninguno de los tres tiempos de alimentación (figuras CII.15 y CII.16). Sólo se registró una diferencia del 61% a las 12 h en la expresión de ARNT en relación con el control, aunque no fue significativa (figura CII.16c).

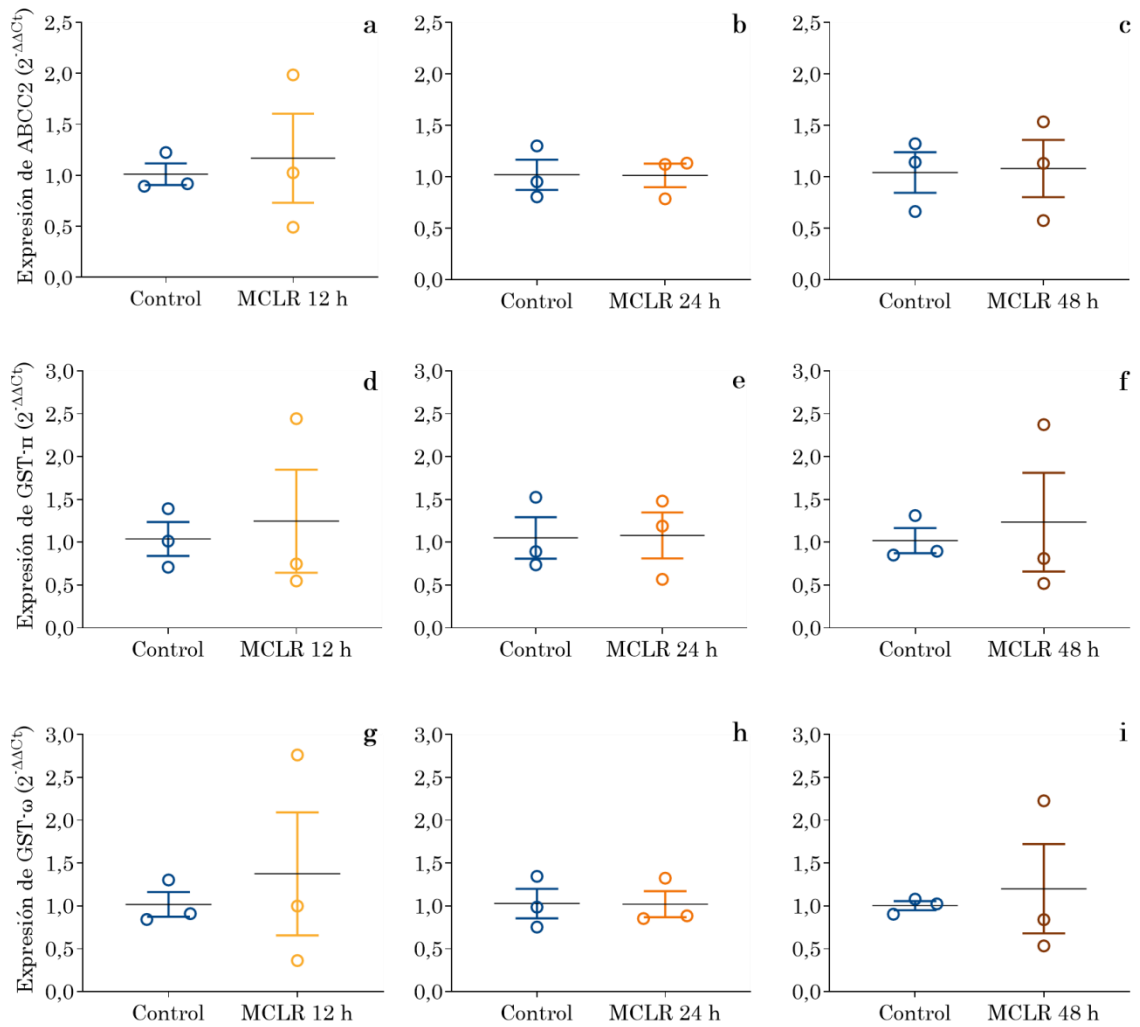


Figura CII.15. Expresión de ARNm de ABCC2 (a, b y c), GST- π (d, e, f) y GST- ω (g, h, i) en intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* luego de exposiciones *in vivo* a 0,5 μg MCLR g pez⁻¹, durante 12, 24 y 48 h. Los resultados están expresados como media \pm EE (n = 3).

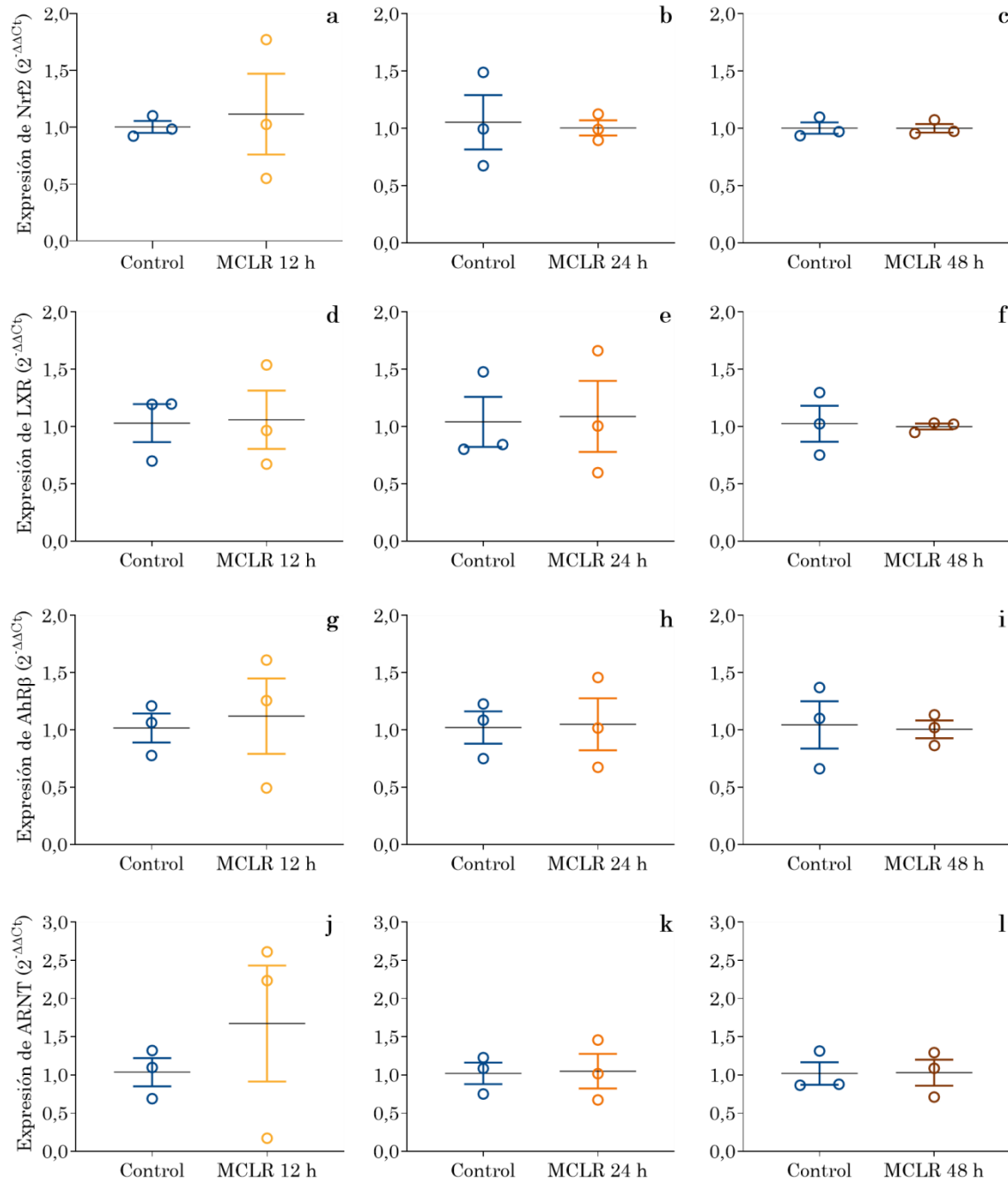


Figura CII.16. Expresión de ARNm de los factores de transcripción Nrf2 (a, b, c), AhRβ (d, e, f), ARNT (g, h, i) y LXR (j, k, l) en intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* luego de exposiciones *in vivo* a 0,5 µg MCLR g pez⁻¹, durante 12, 24 y 48 h. Los resultados están expresados como media ± EE (n = 3).

CII.4. Discusión

En este capítulo, se estudiaron los efectos de exposición a MCLR, a través del alimento, sobre la actividad y la expresión de proteínas involucradas en el sistema de resistencia a múltiples xenobióticos, en el intestino medio de *O. mykiss*. Los resultados de los experimentos indican que la exposición a MCLR modula la actividad de los transportadores ABCC. La tasa de transporte de DNP-SG se reduce a las 12 h y luego aumenta a las 24 h y se hace más alta que en el control a las 48 h. Sin embargo, no se registraron cambios en la expresión del transportador ABCC2.

La inhibición de la tasa de transporte de DNP-SG observada a las 12 h post alimentación con MCLR, concuerda con estudios previos en preparaciones *ex vivo* (Bieczynski *et al.*, 2014, 2016), donde se evidencia que la toxina se transporta por proteínas ABCC, dado que compite por el transporte con el sustrato indicador. La recuperación y el posterior aumento de la tasa de transporte de DNP-SG a las 24 y 48 h, respectivamente, indicaría un aumento en la cantidad de transportadores disponibles en la membrana del enterocito y/o una mayor tasa de actividad de los mismos, lo que constituye una respuesta homeostática del sistema MXR. Este tipo de respuestas pueden producirse por una vía postraducciona (*e.g.* inserción de unidades de proteína en la membrana, cambios en el estado de fosforilación de la proteína) o por el aumento en la expresión génica con síntesis *de novo* de moléculas de uno o más transportadores ABCC (Gu y Manautou, 2010; Minami *et al.*, 2009; Stolarczyk *et al.*, 2011). Esto último se observó en el intestino medio y en el hígado de *O. mykiss*, y en el hígado del killifish (*Fundulus heteroclitus*), donde la expresión génica del transportador apical ABCC2 aumentó luego de la exposición por 48 h a As^{III} (Painefilú *et al.*, 2019; Shaw *et al.*, 2007). Sin embargo, en este trabajo no se observó el aumento de la expresión de ARNm de dicho transportador, por lo que el aumento de la tasa de transporte de DNP-SG puede deberse a una regulación de tipo postraducciona como sucede, por ejemplo, con el As^{III}, que regula los niveles de la proteína ABCC2 en el riñón del killifish, independientemente de la expresión de ARNm (Miller *et al.*, 2007). El modelo *ex vivo* de tiras intestinales usado para medir la tasa de transporte de DNP-SG en este capítulo, no permite identificar si el aumento observado a las 48 h corresponde a transportadores de la cara basolateral o de la cara apical del intestino. Entonces,

otra posible explicación para estos resultados es que MCLR regula, por vía génica o postraducciona, otros transportadores ABCC con afinidad por el DNP-SG y de ubicación basolateral en el intestino, *e.g.* ABCC1 (Chan *et al.*, 2004; Deeley *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2014).

La formación del conjugado DNP-SG a partir de 2,4-dinitroclorobenceno (CDNB) y GSH depende de la actividad de la enzima GST (Gotoh *et al.*, 2000). En los experimentos de este capítulo, la disminución de la actividad GST que se observa a las 12 h podría deberse a la competencia entre la MCLR y el CDNB por la conjugación con GSH, aunque esto es poco probable porque en la determinación *in vitro* de la actividad GST, la MCLR presente en el homogenato debería diluirse y además, el reactivo CDNB se agrega en exceso al momento de iniciar la reacción. Por lo tanto, la disminución de la actividad GST también podría deberse a una modulación negativa. A este tiempo, también se registra una disminución del transporte de DNP-SG. Esto implica que la disminución en la actividad del transporte de DNP-SG podría deberse, al menos en parte, a la disminución de la actividad GST (Kondo *et al.*, 1992; Pflugmacher *et al.*, 1998; Takenaka, 2001). Por otro lado, el conjugado MC-SG es transportado por proteínas ABCC, en competencia con el DNP-SG por los sitios de unión a sustratos del transportador (Bieczynski *et al.*, 2014; 2016). Esta competencia puede explicar la disminución observada en la tasa de transporte de DNP-SG (inhibición competitiva). La compensación de la actividad GST a las 24 y 48 horas implica una mejora del sistema de detoxificación y un aumento de la tasa de formación del conjugado DNP-SG. Esto pudo haber contribuido a la recuperación del nivel del control de la tasa de transporte de dicho sustrato. Sin embargo, esta recuperación de la actividad GST no explicaría el aumento de la tasa de transporte de DNP-SG por encima del nivel del control, que se observa las 48 h.

De acuerdo al diseño experimental empleado, en el cual los peces recibieron alimento embebido en MCLR cada 12 h, el intestino medio estuvo continuamente expuesto a la toxina. Por ende, es posible que la misma se haya acumulado y concentrado en los enterocitos a lo largo del tiempo. En *O. hatcheri*, 12 h después de una alimentación única, el contenido de MCLR en el intestino se redujo a un 15% del máximo detectado (a las 3 h). Una parte de esta MCLR fue detectada en el hígado (máximo a las 6 h) y fue luego eliminada completamente del organismo (en

48 h) (Bieczynski *et al.*, 2013). Como es probable que la MCLR se haya acumulado a lo largo de las sucesivas administraciones, se puede interpretar que la recuperación de la actividad GST a las 24 y 48 h se debe a una respuesta homeostática. La compensación de la actividad GST podría ocurrir por mecanismos de regulación postraducciona l o por la síntesis *de novo* por aumento en la expresión génica. En ratas expuestas a un extracto MCLR/MCRR, la expresión de GST- π aumentó a las 12 y 24 h en el riñón, mientras que disminuyó en el hígado, lo que muestra un efecto con clara dependencia del órgano (Li *et al.*, 2009). En hígado e intestino de *O. mykiss*, se observó una tendencia al aumento de la expresión de GST- π luego de 48 horas de exposición a As^{III} aunque no fue significativo (Painefilu *et al.*, 2019). En el presente trabajo, no se observaron cambios significativos en la expresión de GST- π a ninguno los tres tiempos de exposición a MCLR, por cuanto la respuesta en la actividad de esta enzima pudo deberse a una regulación de tipo postraducciona l. Por otro lado, no se puede descartar la expresión de otras isoformas citosólicas de GST, que catalizan conjugaciones con GSH, *e.g.* GST- μ , GST- θ o GST- α (He *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2009).

En este trabajo, la exposición a MCLR no afectó en forma significativa la expresión de GST- ω en el intestino de *O. mykiss* (figura CII.16). La GST- ω , es una isoforma citosólica que exhibe una actividad muy débil en cuanto a la conjugación de xenobióticos con GSH (Mannervik y Danielson, 1988; Whitbread *et al.*, 2005), y es muy poco afín por el CDNB (Board *et al.*, 2000). Por esta razón, de haberse incrementado la expresión de esta isoforma, los cambios en su actividad no se hubieran reflejado en la actividad GST analizada con la técnica que se usó en este trabajo. Sin embargo, en este estudio se tuvo en cuenta que una posible regulación negativa de la expresión de GST- ω por MCLR afectaría el metabolismo de otros contaminantes que pueden estar presentes en el mismo cuerpo de agua, como el arsénico. GST- ω participa en reacciones de reducción de compuestos de arsénico como arsenato (As^V), monometilarsenato (MMA^V) y dimetilarsenato (DMA^V) (Schmuck *et al.*, 2005; Zakharyan *et al.*, 2001). Un aspecto a tener en cuenta, para futuros ensayos, es que una de las variantes de GST- ω , GSTO1-1, es importante en la respuesta inflamatoria de macrófagos frente a los lipopolisacáridos, compuestos que están presentes en la pared celular de las bacterias Gram negativas y, en particular, en las cianobacterias (Board y Menon, 2016; Menon *et al.*, 2014; 2015).

A las 24 horas de exposición a MCLR, los enterocitos del intestino medio de *O. mykiss* exhiben una cierta alteración de su balance oxidativo, caracterizada por la disminución de GSH. Esta disminución, indicaría el uso de GSH en la detoxificación de la MCLR por conjugación. De todos modos, no se puede descartar que la exposición a MCLR haya aumentado la producción de ROS, lo que también podría explicar el consumo de GSH. Sin embargo, el balance oxidativo de los enterocitos parece no estar seriamente comprometido, ya que solo se observó la disminución de GSH a las 24 h, como se menciona arriba, y un aumento de la actividad GR a las 48 h, mientras que el contenido de GSSG y el cociente GSH/GSSG permanecieron sin cambios a lo largo del experimento. El aumento de la actividad GR es considerado una respuesta antioxidante frente a contaminantes ambientales (Stephensen *et al.*, 2000), incluida la MCLR (Chen *et al.*, 2012; Jos *et al.*, 2005) e implica un aumento en la tasa de reducción de GSSG a GSH, que mantiene el balance oxidativo de la célula (Camera y Picardo, 2002; Oliveira *et al.*, 2009). En este capítulo, el aumento de la actividad GR a las 48 h podría estar más relacionado con la recuperación del contenido de GSH consumido en la conjugación con MCLR que con una respuesta antioxidante.

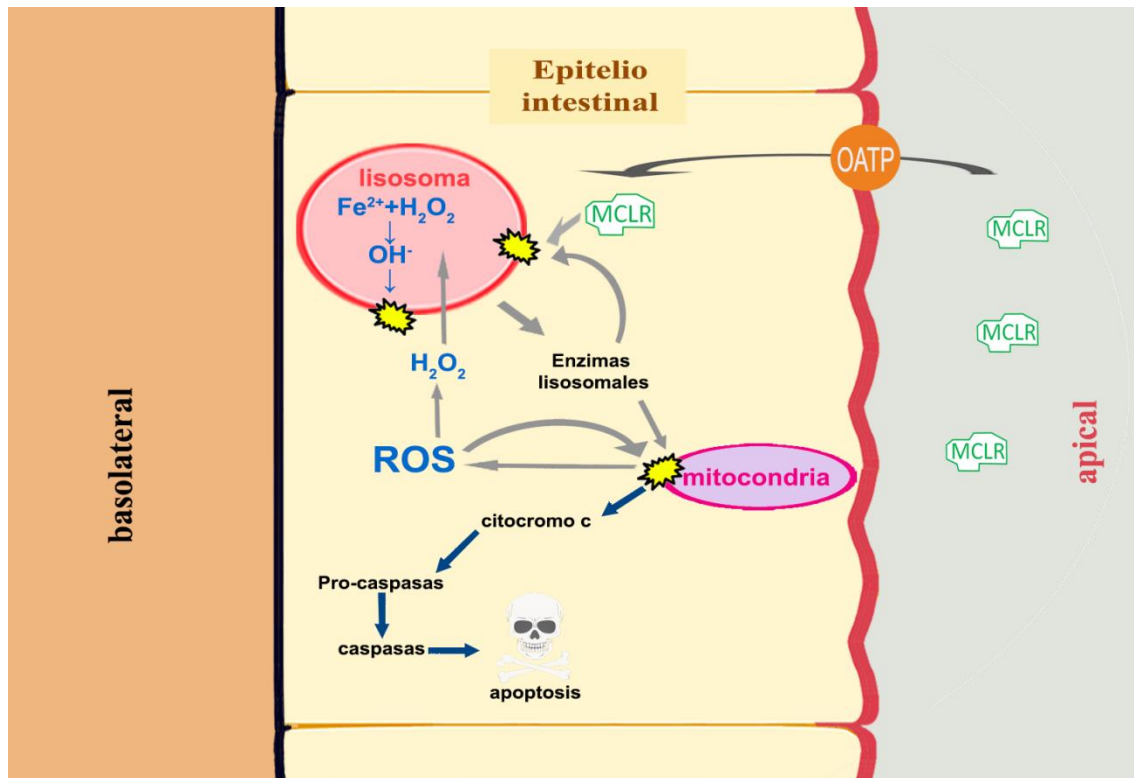
Diversos autores han descripto que MCLR genera condiciones de estrés oxidativo en peces, como la disminución del contenido de GSH, *e.g.* en hepatocitos de la carpa común (Li *et al.*, 2003) y en hígado, riñón y branquias de la tilapia del Nilo (Jos *et al.*, 2005). El cociente GSH/GSSG es utilizado comúnmente como un buen marcador para analizar el balance oxidativo de la célula frente a xenobióticos prooxidantes (Camera y Picardo, 2002). La disminución de la concentración de GSH implicaría la oxidación del mismo en presencia de ROS y por ende un aumento de la concentración de GSSG, lo que disminuiría el cociente GSH/GSSG (Deponte, 2013). Sin embargo, los escasos signos observados en este trabajo no son suficientes para sugerir que MCLR efectivamente ejerce un efecto prooxidante en los enterocitos.

Para complementar y profundizar la información obtenida a partir de las muestras de tejido, los efectos citotóxicos de la exposición a MCLR a través de la dieta, se estudiaron, además, en preparaciones de enterocitos aislados. Se analizó la estabilidad de la membrana lisosomal (NRRT50), la cual resultó afectada negativamente durante los tres tiempos de alimentación con MCLR. Sin embargo,

el daño no se agravó a mayor tiempo de exposición, sino que se mantuvo constante a lo largo del experimento. La desestabilización de los lisosomas puede estar íntimamente relacionada con la apoptosis celular (Boaru *et al.*, 2006). La ruptura de la membrana lisosomal permite, por un lado, la liberación de enzimas como nucleasas, sulfatasas lipasas o fosfolipasas y, por otro, la liberación de ROS (Menezes *et al.*, 2013; Pourahmad *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2003). En conjunto, estos factores, pueden afectar la integridad de las membranas de otras organelas como las mitocondrias (Kurz *et al.*, 2008; Li y Ma 2017). La desregulación de las funciones mitocondriales promueve la liberación de citocromo c, que activa a las enzimas caspasas, promoviendo la apoptosis celular (Brunk *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2016; Li y Ma, 2017) (figura CII.17). El conjunto de estos efectos compromete en buena medida la funcionalidad de los enterocitos y por lo tanto a la función del intestino.

En la literatura, está descrito que algunas ROS, tales como el H_2O_2 , pueden atravesar fácilmente la membrana lisosomal, reaccionar con el hierro libre, presente en el interior y producir radicales $\cdot OH$ (reacción de Haber-Weiss), que afectan la estabilidad de la membrana lisosomal (Kurz *et al.*, 2008; Pourahmad *et al.*, 2010; Zdolsek *et al.*, 1993) (figura CII.17). Por ello, complementariamente, el efecto de la exposición a MCLR sobre la producción de ROS y su posible incidencia sobre la estabilidad de la membrana lisosomal, se estudió en preparaciones de enterocitos aislados con aplicación de la toxina *in vitro*. En estos experimentos, se observa que el efecto de MCLR sobre la producción de ROS depende de la concentración, ya que no se registran cambios a $0,1 \mu mol L^{-1}$, pero hay un aumento significativo a $5 \mu mol L^{-1}$ (figura CII.13a). La primera concentración es muy similar a la CI_{50} de la curva de NRRT50 vs. concentración de MCLR, mientras que $5 \mu mol L^{-1}$ se encuentra en el *plateau* de dicha curva, el cual se alcanza a partir de $1 \mu mol L^{-1}$ (figura CII.13b). Lo que sugiere que MCLR produce daño a lisosomas por un mecanismo independiente del estrés oxidativo. Sin embargo, aunque la concentración efectiva de MCLR en este experimento es relativamente alta con respecto a las concentraciones que se encuentran en el ambiente (Hoeger *et al.*, 2004) es posible que en exposiciones ambientales a tiempos más largos, por ejemplo, cuando se producen floraciones de larga duración, MCLR se acumule en el

intestino a niveles que promuevan la producción de ROS. En este caso, los ROS podrían reforzar el efecto de MCLR sobre los lisosomas.



CII.17. Efecto de microcistina-LR (MCLR) observado en lisosomas de los enterocitos de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* y esquema teórico de los efectos en el sistema lisosoma-mitocondria, basado en Brunk *et al.* (2001), Kurz *et al.* (2008) y Pourahmad *et al.* (2010).

El efecto de MCLR sobre la membrana lisosomal podría explicarse por la acción específica de esta toxina, la inhibición de enzimas PP. Este efecto altera el mecanismo de regulación postraduccional de muchas proteínas y procesos celulares. Por ejemplo, la fosforilación en residuos de serina o treonina de determinada proteína por las proteínas quinasas A o C aumenta o disminuye su actividad, de acuerdo a la conformación de la proteína y a la quinas involucrada. El balance de este mecanismo está dado por la desfosforilación de dichos residuos mediada por proteína fosfatasas como PP1 y PP2A. La inhibición de estas últimas por MCLR puede causar la hiperfosforilación de proteínas como la dineína citoplasmática, lo que impide su función en la unión de los lisosomas al citoesqueleto y su consecuente pérdida de función e integridad (Boaru *et al.*, 2006;

Runnegar *et al.*, 1999). Sin embargo, estos efectos no se pueden comprobar mediante los métodos utilizados en el presente trabajo. Independientemente del mecanismo, el resultado de las exposiciones *in vivo* e *in vitro* indica claramente que en los enterocitos de *O. mykiss*, la exposición a MCLR produce la desestabilización de la membrana lisosomal. Además de mostrar efectos de la MCLR, que han sido muy poco estudiados hasta ahora, estos resultados indican que el NRRT50 es un marcador sensible para evaluar los efectos citotóxicos de xenobióticos, incluidas las toxinas naturales, en el intestino de los peces.

La inhibición de proteína fosfatasas por MCLR también puede promover los procesos de muerte celular. En este capítulo, MCLR inhibió la actividad de la enzima PP1 a los tres tiempos de exposición. Es decir, este efecto se mantuvo constante a lo largo de la exposición e incluso, el efecto fue máximo a las 48 h, pese al aumento de la actividad de los transportadores ABCC a lo largo del tiempo. Esto puede indicar que una parte de la MCLR absorbida no fue excretada hacia la luz del tubo digestivo ni pasó a la sangre, sino que se acumuló en los enterocitos a lo largo del tiempo, probablemente, unida covalentemente a proteínas fosfatasas. Tampoco parece haber ocurrido una respuesta de aumento de la tasa de síntesis *de novo* de estas enzimas, al menos a un nivel suficientemente alto como para recuperar la actividad inicial. Como se mencionó antes, la inhibición de estas enzimas produce importantes efectos regulatorios que generan daño a lisosomas y mitocondrias, e impiden la regulación de la actividad enzimática por fosforilación-desfosforilación (Boaru *et al.*, 2006; Runnegar *et al.*, 1999).

La presencia en el citoplasma del factor de transcripción Nrf2 es constitutiva y su principal modo de activación ocurre cuando se oxida su proteína represora (Keap1) por estrés oxidativo (Kansanen *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2004). Sin embargo, en ratón y en el pez cebra, el fragmento Ser40 de Nrf2 ha mostrado ser susceptible a la fosforilación en presencia de MCLR (Huang *et al.*, 2000; 2002). La fosforilación de Nrf2 induciría cambios conformacionales que reducen su afinidad por Keap1, lo que tendría como consecuencia el incremento de su tasa de translocación al núcleo y por ende el incremento en la expresión de genes aguas abajo, como los que codifican para la expresión de la ligasa glutamato-cisteína (GLC), GST y GPx (Kobayashi *et al.*, 2009; Kwak *et al.*, 2004; 2002; Nguyen *et al.*, 2004). También existen antecedentes, en células de mamíferos, donde la

exposición a MCLR provocó el aumento de Nrf2 en el núcleo y el consecuente aumento de su actividad (Chen *et al.*, 2019; Gan *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2014; Lundqvist *et al.*, 2017). En esta tesis no se pudo evaluar la activación de Nrf2 a través de la detección de la proteína Nrf2 en el núcleo, aunque sí se pudo analizar la expresión de ARNm de este factor de transcripción, otra vía posible de regulación del mismo. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la expresión génica de este factor luego de la exposición a MCLR. En cuanto a la expresión de genes blanco de Nrf2, tampoco se encontraron cambios en la expresión de ARNm del transportador apical ABCC2 ni de la isoforma GST- π , pese al aumento de la actividad asociada a estas proteínas a lo largo del tiempo. Por otro lado, algunos autores relacionan la regulación de la expresión de ARNm de Nrf2 con el aumento de la expresión de otros factores de transcripción, *e.g.* AhR y ARNT, lo que sugiere un fenómeno de *crossstalk* (Kwak *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2005). En este trabajo, la expresión de los factores de transcripción AhR y ARNT no ha sido alterada por la exposición a MCLR. Tampoco la expresión de LXR, un receptor nuclear sugerido como activador de la transcripción de ABCC2 (Chisaki *et al.*, 2009). La expresión del receptor nuclear PXR, que también regula la expresión génica de transportadores ABC y enzimas de detoxificación, aún no pudo ser analizada debido a dificultades técnicas.

Los estudios a tiempos más largos de exposición y mayores concentraciones de MCLR podrían aportar más información acerca del comportamiento de las proteínas involucradas en el sistema MXR, principalmente si se tiene en cuenta que este sistema actúa frente a una gran variedad de xenobióticos, como el arsénico o las PST.

CII.5. Conclusiones

La MCLR se incorpora en las células del intestino medio de *O. mykiss*, a través del alimento lo que implica que, en su ambiente natural, estos peces pueden estar expuestos a la toxina por medio del consumo de otros organismos que la hayan acumulado.

Los efectos intracelulares más distintivos de MCLR en el intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*, a 12, 24 y 48 h de exposición a través de la dieta, son la inhibición de la enzima proteína fosfatasa 1 y el daño a la membrana lisosomal, lo que compromete el mantenimiento de las funciones básicas del órgano.

La exposición *in vivo* a MCLR produce cambios en el transporte por ABCC, en el intestino medio de *O. mykiss*. En las primeras 12 h, la exposición a MCLR produce inhibición del transporte de DNP-SG, que se compensa a las 24 h y aumenta a las 48 h de tratamiento.

Mientras está presente, la MCLR mantiene al intestino en un continuo estado de estrés y afecta la defensa frente a patógenos y xenobióticos presentes en el ambiente, generando mayor susceptibilidad en el individuo frente a estos y otros estresores ambientales.

Capítulo III.

Efectos combinados de MCLR y PST sobre el sistema de sistema de resistencia a múltiples xenobióticos y sobre marcadores intracelulares en el intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*.

CIII.1. Introducción

En el contexto de las FAN, es común la presencia de varias especies de cianobacterias del mismo o de distintos géneros en un cuerpo de agua. Por ejemplo, se suele encontrar codominancia de los géneros *Microcystis sp.* y *Aphanizomenon sp.* (Fonseca *et al.*, 2015; Vasas *et al.*, 2004). En los embalses de Norpatagonia son frecuentes las floraciones de varias especies del género *Dolichospernum sp.* (*e.g.* Othaz Brida *et al.*, 2010), que potencialmente producen microcistina y neurotoxinas. Por otro lado, dependiendo de las condiciones fisicoquímicas del cuerpo de agua, se desarrollan sucesiones ecológicas donde la abundancia de una especie decrece mientras aumenta la abundancia de otra (Chia *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2016). Las condiciones fisicoquímicas también permiten que se desarrollen especies y géneros distintos dependiendo del estrato en la columna de agua que ocupen (Bartram *et al.*, 1999; Huber *et al.*, 2011; Wagner y Adrian, 2009) o que ocurran crecimientos poblacionales de distintas especies a lo largo de un curso de agua, *e.g.* desde la naciente hasta la desembocadura de un río (Al-Tebrineh *et al.*, 2012; Bowling y Baker, 1996). Estos sucesos, sumados al hecho de que una especie puede producir más de un tipo de cianotoxina (Chorus y Bartram, 1999; Kaur *et al.*, 2019; Namikoshi *et al.*, 2003), pueden provocar que las cianotoxinas aparezcan como mezclas complejas en los cuerpos de agua alrededor del mundo (Al-Sammak *et al.*, 2014; Metcalf *et al.*, 2008).

Los efectos de las mezclas de cianotoxinas sobre los organismos se han estudiado desde distintas perspectivas y modelos de exposición. En algunos trabajos, se han usado muestras de floraciones obtenidas directamente del ambiente y se han evaluado sus efectos sobre modelos zooplantónicos como *Daphnia similis* y *Ceriodaphnia silvestrii* (Herrera *et al.*, 2015; Sotero-santos *et al.*, 2006). También se han utilizado extractos crudos (EC), cuya composición de cianotoxinas dependía directamente del tipo de floración, o cultivos de cianobacterias a partir de los cuales eran extraídos. Otros, en cambio, realizaron mezclas de toxinas en forma artificial. A partir de estándares de toxinas purificadas (TP) de origen comercial o de extractos purificados (EP), es decir toxinas aisladas y

purificadas en cierto porcentaje a partir de cultivos de laboratorio (Lyndsay *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2020).

En trabajos donde se comparan los EC con las mezclas artificiales (*e.g.* Esterhuizen-Londt *et al.*, 2016), los primeros producen mayor efecto tóxico, caracterizado por mayor producción de H₂O₂, el aumento de la peroxidación lipídica, e inhibición de enzimas antioxidantes y detoxificantes como GPx y GST. En los trabajos que comparan los extractos purificados con toxinas purificadas comerciales, los efectos adversos han sido mayores en los primeros (*e.g.* desarrollo, mortalidad, entre otros) (Osswald *et al.*, 2009; Pinheiro, 2013). Los autores de estos trabajos atribuyen los resultados observados al efecto sinérgico de otras toxinas presentes en los extractos que no fueron cuantificadas. Sin embargo, ponen aún más en evidencia que las cianotoxinas producen efectos sinérgicos entre sí, que son difíciles de predecir. Por ello, el estudio de mezclas de contaminantes es complejo y se encuentra en debate actualmente en toxicología. Generalmente, se suelen usar modelos conceptuales, con grandes presunciones, para poder predecir si la mezcla de dos o más compuestos tóxicos produce efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos sobre una determinada variable, *e.g.* el crecimiento, la reproducción o la actividad enzimática (Jonker *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2019; Olmstead y LeBlanc, 2005; Pinhero *et al.*, 2016).

En este capítulo, se optó por utilizar un modelo donde las toxinas son administradas por separado, en distintas fases de exposición. Es decir, una de las toxinas se administra en un pretratamiento *in vivo* y la otra en exposiciones *ex vivo*. Este modelo de exposición resulta útil para estudios donde se sabe o se presume que la toxina administrada *in vivo* modifica la actividad de marcadores bioquímicos que son blanco o que modifican la toxicidad de la toxina administrada *ex vivo*, *e.g.* enzimas y/o transportadores de membrana. Este enfoque permite obtener mayor información acerca de los mecanismos involucrados en la ocurrencia de efectos sinérgicos o antagónicos, producto de la interacción de las toxinas. En mi tesis de licenciatura y en el artículo derivado de la misma (Painefilú, 2016, Painefilú *et al.*, 2019), la exposición *in vivo* a As^{III} moduló en forma génica la actividad de los transportadores ABCC y estimuló la actividad GST, de forma tal que los efectos

tóxicos sobre la enzima PP1, por parte de la MCLR, aplicada *ex vivo*, fueron totalmente compensados.

En el caso particular de las FAN, este tipo de modelos permite estudiar las consecuencias de la exposición a más de una toxina sobre el organismo, en situaciones reales que suceden en la naturaleza. Por ejemplo, un pez puede estar expuesto en primera instancia a una floración de una especie en particular de cianobacterias, que produce sólo un tipo de toxina y luego, al moverse hacia otra zona del cuerpo de agua, queda expuesto a la floración de otra especie, que produce otro tipo de cianotoxina. Los peces migratorios como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), río abajo pueden estar expuestos a una toxina y río arriba a otra. Otra alternativa, consiste en que el pez esté expuesto a lo largo del tiempo a distintas cianotoxinas, producto de floraciones que se suceden en el tiempo, como ya se explicó arriba. Por otro lado, en este trabajo de tesis, MCLR se administró *in vivo* a través del alimento, una situación que también ocurre en la naturaleza, donde el pez se alimenta de otros organismos que previamente acumularon la toxina en sus partes blandas, como crustáceos (Ibelings *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2001; Williams *et al.* 1997), moluscos (Eriksson *et al.*, 1989; Ozawa *et al.*, 2003; Sabatini *et al.*, 2011) y otros peces (Magalhães *et al.*, 2003; Malbrouck *et al.*, 2003). Por ello y en base a los resultados observados en los capítulos I y II de la presente tesis, en este capítulo se estudiaron los efectos sobre el sistema de resistencia a múltiples xenobióticos y sobre marcadores citotóxicos en el intestino medio de *O. mykiss*, de MCLR aplicada *in vivo* por 48 horas y PST aplicadas *ex vivo/in vitro* por 1 hora.

En el capítulo II, se observó que luego de la exposición *in vivo* por 48 horas, a MCLR 0,5 µg g pez⁻¹ embebida en el alimento, la actividad de los transportadores ABCC aumentó en forma significativa, pero no se determinó si este aumento corresponde a transportadores apicales o basolaterales del epitelio intestinal. Por otro lado, en el capítulo I, se observó que las PST reducían el transporte de DNP-SG por transportadores basolaterales. Entonces, es posible que el aumento de la tasa de transporte de DNP-SG producido por la exposición *in vivo* por 48 h a MCLR sea contrarrestado por el efecto inhibitorio de las PST aplicadas *ex vivo*. También es posible que las PST disminuyan la capacidad detoxificante del intestino, a través de

la disminución de la concentración de glutatión y/o de la actividad GST, y esto resulte en un aumento de su concentración intracelular de MCLR y de su efecto tóxico específico, la inhibición de la actividad de la enzima PP1. La exposición consecutiva a PST y MCLR también podría alterar en forma significativa el balance oxidativo de los enterocitos, de acuerdo a los resultados del capítulo I, que muestran que la exposición a PST produce un consumo de GSH e inhibe la actividad de parte de las enzimas involucradas en su metabolismo, como GST y GR, aunque sin producir daño oxidativo aparente.

Objetivo

Este capítulo tuvo como objetivo estudiar el posible efecto sensibilizante de la MCLR incorporada a través del alimento, frente a la toxicidad que producen las PST, en relación con el sistema MXR y marcadores intracelulares, en el intestino medio *Oncorhynchus mykiss*.

Hipótesis

La exposición a MCLR altera negativamente la capacidad de defensa antioxidante y detoxificante del intestino medio de la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*, frente a las PST.

P1: La exposición consecutiva a MCLR *in vivo* y PST *ex vivo/in vitro* potenciará el desbalance oxidativo leve, que se produce cuando el intestino medio se expone sólo a PST *ex vivo*, en las variables a medir: contenido de GSH, actividad GST, GR y CAT, y producción de ROS.

P2: La exposición a PST *ex vivo* potenciará el efecto de inhibición de PP1, causado por la exposición *in vivo* a MCLR.

P3: La tasa de transporte de DNP-SG aumentará con el pretratamiento *in vivo* con MCLR, pero la exposición *ex vivo* a PST, disminuirá este efecto.

CIII.2. Metodología

CIII.2.1. Extracto de PST

Para las exposiciones *ex vivo* de este capítulo se utilizó el extracto PST1, utilizado en el capítulo I de esta tesis, debido a que la mayoría de los efectos intracelulares de PST se estudiaron usando este extracto. Además, se estudió su efecto sobre el transporte por ABCC, el metabolismo de glutatión y marcadores de estrés oxidativo. En la tabla CIII.1 se resume su composición de toxinas.

Tabla CIII.1. Perfil del extracto de toxinas paralizantes de moluscos 1 (PST1) purificado a partir de un cultivo de *Alexandrium catenella*. Las concentración total está expresada como μg de equivalentes de toxicidad de STX L^{-1} (definidas a partir de los efectos neurotóxicos, $\mu\text{g STXeq L}^{-1}$), μmol de equivalentes de toxicidad de STX L^{-1} ($\mu\text{mol STXeq L}^{-1}$) de acuerdo a FAO/WHO (2016) y como $\mu\text{mol PST L}^{-1}$

Análogo	Nombre completo	%	Masa molecular (g mol^{-1})
C1/C2	Protogoniautoxina	35,13	475,40
GTX1/4	Goniautoxina 1/4	39,19	411,35
GTX2/3	Goniautoxina 2/3	0,27	395,35
B1	Gonyautoxina 5	0,03	379,35
NEO	Neosaxitoxina	23,67	315,29
STX	Saxitoxina	1,61	299,29
Total ($\mu\text{g STXeq L}^{-1}$)			37,39
Total ($\mu\text{mol STXeq L}^{-1}$)			0,11
Total ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			0,13

CIII.2.2. Diseño experimental

Con el objetivo de estudiar el efecto que produce la exposición consecutiva a MCLR y PST, en el intestino medio de *O. mykiss*, se pretrataron individuos juveniles de $10,35 \pm 1,34$ g con MCLR durante 48 h y se realizaron distintas preparaciones intestinales, para llevar a cabo exposiciones *ex vivo e in vitro* a PST1. Los peces se distribuyeron en acuarios separados, de acuerdo al tipo de pretratamiento *in vivo* (control *in vivo* y MCLR *in vivo*), con una carga máxima de 10 individuos por acuario. A los peces del pretratamiento control *in vivo*, se les

administró alimento comercial sin toxina, mientras que a los peces del tratamiento MCLR *in vivo*, se les administró alimento comercial embebido en MCLR 0,5 $\mu\text{g g pez}^{-1}$. Los individuos de ambos tratamientos se mantuvieron 48 h en ayuno, previo al comienzo del ensayo, para asegurar que aceptaran el alimento durante el mismo. Transcurrido ese tiempo, se realizó un recambio de agua completo, procurando no estresar a los peces. Luego de 30 min se les dio la primera alimentación que, en todos los casos, consistió en 0,5% de la masa corporal y se repitió cada 12 h, hasta completar 4 dosis en total. Transcurridas 12 h después de la última alimentación, es decir 48 h después de la primera, los peces se sacrificaron y el intestino medio se extrajo y se disecó para realizar distintas preparaciones *ex vivo* e *in vitro*, dependiendo de la variable a medir. Las exposiciones del intestino *ex vivo* e *in vitro* consistieron en incubaciones de 1 h sólo con solución Cortland (control *ex vivo/in vitro*) o con PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (PST1 *ex vivo/in vitro*). Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente de 22°C, con aireación constante. En la sección CIII.2.5 se detallan las incubaciones de los experimentos donde se midió el transporte de DNP-SG.

Con el objetivo de profundizar en los efectos intracelulares (en particular, sobre el contenido de GSH y la actividad PP1) causados por la combinación de MCLR y PST, se realizaron exposiciones *ex vivo* y determinaciones *in vitro*, sin pretratamiento *in vivo*. Para estos experimentos, se utilizaron ejemplares de *O. mykiss* de $30,51 \pm 4$ g. Las exposiciones *ex vivo* consistieron en tiras intestinales incubadas durante 1 h, en viales de vidrio con 3 mL de solución Cortland y aireación constante. Las determinaciones *in vitro* consistieron en la medición de la actividad PP1 en presencia de MCLR o PST en sobrenadante de homogenato de intestino. En la tabla CIII.2 se resume el diseño experimental empleado en el presente capítulo.

Tabla CIII.2. Resumen de variables medidas en el presente capítulo. Las marcas de verificación (✓) indican el modelo y la combinación de toxinas usadas en cada experimento.

	<i>in vivo</i> (MCLR)		<i>ex vivo</i> (MCLR, PST o MCLR+PST)	<i>in vitro</i> (MCLR, PST o MCLR+PST)
	<i>ex vivo</i> (PST)	<i>in vitro</i> (PST)		
GSH / glutatión total	✓		✓	
GST / GR	✓			
CAT	✓			
ROS		✓		
PP1	✓		✓	✓
Transporte de DNP-SG	✓			

CIII.2.3. Marcadores de estrés oxidativo

CIII.2.3.1 Glutatión y enzimas asociadas

El contenido de glutatión (GSH y glutatión total) y las actividades de las enzimas glutatión S-transferasa (GST) y glutatión reductasa (GR), se estimaron en tiras de intestino expuesto en forma consecutiva a MCLR *in vivo* y PST *ex vivo*. El intestino proveniente de los pretratamientos *in vivo* se dividió longitudinalmente en dos mitades, control *ex vivo* y PST *ex vivo*, y cada una se incubó en un baño de 3 mL. Finalizado el tiempo de incubación, las tiras se retiraron de los baños y se homogeneizaron en buffer fosfato de potasio, pH 7,5, como se detalló en la sección 2.5 de la metodología general. Las determinaciones bioquímicas también se realizaron acorde a lo detallado en dicha sección, incluida la determinación de proteínas totales.

El contenido de GSH también se estimó en tiras intestinales expuestas sólo *ex vivo*, durante 1 h, a MCLR o MCLR + PST. En un experimento, se incubaron las tiras sólo con MCLR de 0 a 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mientras que en otro, las tiras intestinales se expusieron a las mismas concentraciones de MCLR combinadas con PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

CIII.2.3.2. Actividad CAT

La actividad de la enzima CAT se estimó en tiras intestinales obtenidas de peces pretratados *in vivo* (control *in vivo* o MCLR *in vivo*), expuestas a PST *ex vivo*. La preparación de los homogenatos se realizó en buffer fosfato de sodio, pH 7,5

acorde a lo detallado en la sección 2.5.4 de la metodología general, al igual que la posterior determinación bioquímica.

CIII.2.3.3. Producción de ROS

La producción de ROS se estimó en suspensiones de enterocitos aislados, preparadas acorde a lo detallado en la sección 2.3.4 de la metodología general. Los enterocitos se aislaron a partir de intestinos de peces pretratados *in vivo* (control *in vivo* o MCLR *in vivo*). Se utilizaron suspensiones con una concentración final de 10^5 células viables mL^{-1} en un volumen final de 1 mL, para las incubaciones *in vitro* (control *in vitro* y PST1 *in vitro*). La producción de ROS se estimó acorde al protocolo detallado en la sección 2.5.6 de la metodología general.

CIII.3.4. Tasa de transporte de DNP-SG

Para estudiar la función de los transportadores ABCC de forma polarizada, se estimó la tasa de transporte de DNP-SG en segmentos intestinales evertidos y sin evertir provenientes de peces pretratados *in vivo* (control *in vivo* o MCLR *in vivo*) y luego expuestos *ex vivo* a PST1. Si bien en el capítulo 1 el transporte por ABCC en segmentos intestinales se estudió sólo en exposiciones con el extracto PST2, en este capítulo se utilizó el extracto PST1 teniendo en cuenta que la mayoría de los efectos intracelulares de las PST se estudiaron con PST1, y que este extracto inhibió el transporte de DNP-SG en tiras intestinales. Las preparaciones de segmentos intestinales se realizaron acorde a como se detalló en la sección 2.3.1 de la metodología general. En todos los tratamientos, se utilizaron baños de incubación de 3 mL con solución CDNB $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. La función de los transportadores ABCC apicales se estudió en segmentos evertidos. En estos experimentos, los segmentos expuestos sólo a solución CDNB se definieron como control *ex vivo* y los expuestos a solución CDNB + PST1 $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ se definieron como PST1 *ex vivo*. Tanto el CDNB como la toxina se aplicaron en el baño de incubación, externos al segmento. Por otro lado, la función de los transportadores ABCC basolaterales se estudió en segmentos no evertidos. Los segmentos control *ex vivo* se llenaron con 100 μL de solución Cortland, mientras que los segmentos PST1 *ex vivo* se llenaron con 100 μL de PST1 $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$. Es decir, en todos los casos la exposición a PST1 fue desde el lado apical (luminal) del epitelio intestinal.

CIII.3.5. Actividad PP1

La actividad de la enzima PP1 se midió luego de la exposición consecutiva a MCLR *in vivo* y a PST *ex vivo*, en tiras intestinales. Para estas determinaciones, se realizaron leves modificaciones en el protocolo detallado en la sección 2.5.7 de la metodología general. En base al método descrito por Bowers y McComb (1966), se modificaron la concentración final del sustrato pNPP y el tiempo de medición. Para la reacción, se mezclaron en una cubeta de vidrio 10 μL de sobrenadante de homogenato, 100 μL de solución pNPP (15 mmol L^{-1}), 890 μL de buffer de reacción (DTT 3 mmol L^{-1} ; BSA $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$; MnCl_2 $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, disueltos en buffer stock) y se registró la absorbancia a 405 nm cada 20 s, durante 3 min.

También se estimó la actividad de la enzima PP1 en tiras intestinales sólo expuestas *ex vivo* a cuatro tratamientos definidos como control (sólo solución Cortland), PST1 ($0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$) MCLR ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) y PST1 + MCLR (PST1 $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ y MCLR $1 \mu\text{mol L}^{-1}$). Para la exposición, todas las toxinas se diluyeron en solución Cortland. Las tiras intestinales se homogeneizaron en buffer stock PP1, pH = 8,6, y se determinó la actividad PP1 de acuerdo a lo detallado en la sección 2.5.7 de la metodología general.

Con el objetivo de analizar posibles efectos inhibitorios de distintas concentraciones de PST sobre PP1, se midió la actividad de esta enzima en homogenato de intestino medio, expuesto *in vitro* a concentraciones crecientes de PST1 desde $0,026$ hasta $26000 \text{ nmol L}^{-1}$ (finales). Como control de inhibición, se confeccionó una curva con concentraciones crecientes de MCLR desde $0,01$ hasta 100 nmol L^{-1} (finales). Para la exposición *in vitro*, en una cubeta de vidrio de $400 \mu\text{L}$, se mezclaron $10 \mu\text{L}$ de sobrenadante de homogenato, $20 \mu\text{L}$ de toxina, $70 \mu\text{L}$ de buffer de reacción y $100 \mu\text{L}$ de solución pNPP. Transcurridos 5 min de incubación se registró la absorbancia cada 2 min, durante 25 min, en espectrofotómetro UV-visible a 405 nm. Durante el ensayo, la mezcla se mantuvo en permanente agitación, salvo al momento de la lectura de la absorbancia. Los buffers y reactivos se prepararon según el protocolo descrito en la sección 2.5.7 de la metodología general.

CIII.3.6. Análisis estadístico

La homogeneidad de varianzas se analizó con el test de Bartlett y la normalidad con el test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre tratamientos se probaron utilizando el test t de Student o por ANOVA de medidas repetidas de uno o dos factores. Para el ANOVA de un factor se usó el test *post hoc* de Dunnett para las comparaciones contra el control. Para el ANOVA de dos factores, se usó el test *post hoc* de Sidak para las comparaciones entre tratamientos. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con $p < 0,05$ (Zar, 1999). Para el análisis estadístico de los casos en que se comparan porcentajes, se utilizó la transformación de arcoseno de la raíz de la proporción. Los resultados se expresan como media \pm EE.

CIII.3. Resultados

A continuación, se detallan los resultados obtenidos en preparaciones de intestino medio provenientes de ejemplares de *O. mykiss* pretratados *in vivo* por 48 h con alimento comercial (control *in vivo*) o con alimento comercial embebido en MCLR (MCLR *in vivo*), expuestas *ex vivo* (tiras y sacos intestinales) e *in vitro* (suspensiones de enterocitos aislados) a PST1. Además, se muestran resultados relacionados con el contenido de GSH, medido a partir de tiras intestinales expuestas *ex vivo*, y con la actividad PP1, medida en incubaciones *ex vivo* e *in vitro*, sin pretratamiento *in vivo*.

CIII.3.1. Marcadores de estrés oxidativo

CIII.3.1.1. Contenido de glutatión en tratamientos *in vivo* + *ex vivo*

Los resultados del ANOVA de dos factores de medidas repetidas para el contenido de GSH muestran interacción significativa entre los factores pretratamiento con MCLR *in vivo* y exposición a PST1 *ex vivo* ($F_{1;14} = 7,40, p < 0,05$). En los intestinos de peces control, no se registraron cambios en esta variable por la exposición PST1 *ex vivo*. En cambio, en los intestinos expuestos en forma consecutiva a MCLR *in vivo* y PST1 *ex vivo*, el contenido de GSH disminuyó 39% con respecto a su control *ex vivo* (comparaciones *post hoc* de Sidak, $t_{14} = 3,07, p < 0,05$, $n = 7-9$, figura CIII.1a). El contenido de GSSG no sufrió cambios en ningún tratamiento (figura CIII.1b). En cuanto al cociente GSH/GSSG, la interacción entre factores también fue significativa ($F_{1;14} = 6,68, p < 0,05$). Después de la exposición consecutiva a MCLR *in vivo* y PST1 *ex vivo*, GSH/GSSG disminuyó 54% (comparaciones *post hoc* de Sidak, $t_{14} = 3,04, p < 0,05$, $n = 7-9$, figura CIII.1c). No se registraron efectos significativos de ninguno de los tratamientos por separado. El contenido de glutatión total no se modificó en forma significativa en ninguno de los tratamientos (figura CIII.1d). No se registraron efectos significativos de ninguno de los tratamientos por separado.

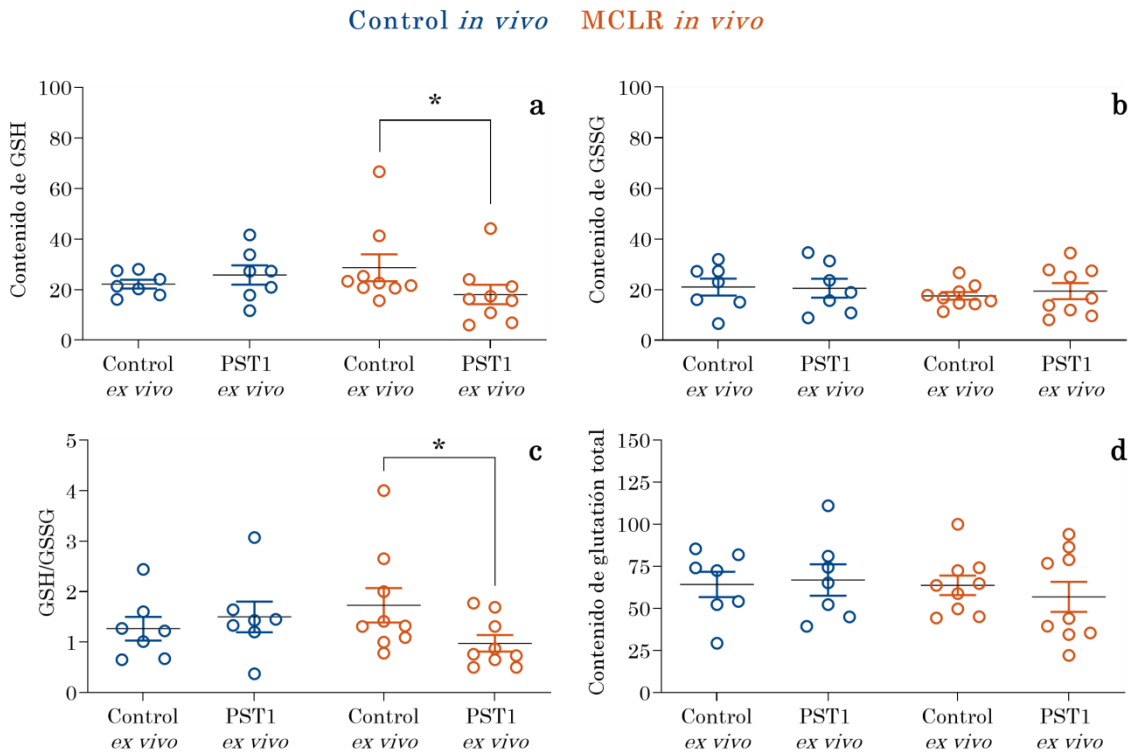


Figura CIII.1. Contenido de glutatión en tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* provenientes de individuos pretratados *in vivo* con 0,5 g MCLR g pez⁻¹ por 48 h, expuestas *ex vivo* a PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 1 h (n =7-9). a) Contenido de glutatión reducido (GSH) (nmol GSH mg proteína⁻¹), b) Contenido de glutatión oxidado (GSSG) (nmol GSSG mg proteína⁻¹), c) GSH/GSSG, d) Contenido de glutatión total (nmol GSH mg proteína⁻¹). Los resultados se expresan como media \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (* $p < 0,05$).

CIII.3.1.2. Contenido de GSH en tratamientos *ex vivo*

Se estimó el contenido de GSH en tiras de intestino medio expuestas *ex vivo* por 1 h a MCLR (0-5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) o la combinación MCLR (0-5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) + PST1 (0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Este experimento no mostró resultados claros y no será tenido en consideración para la discusión. No se evidenció una tendencia definida, el tamaño de muestra fue reducido (n = 4) y los datos tuvieron mucha dispersión.

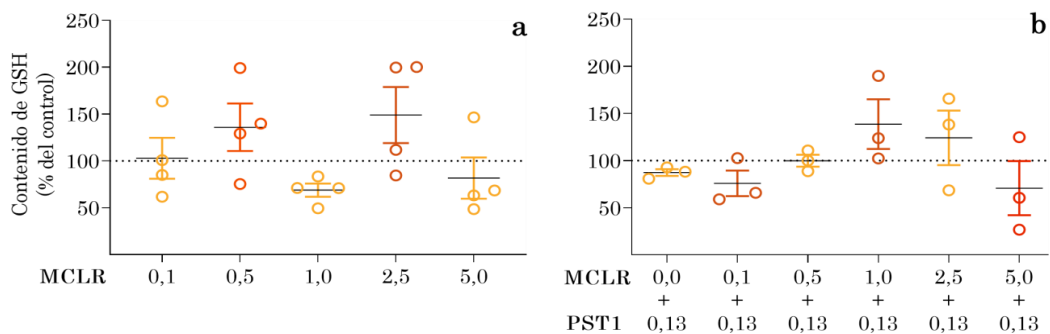


Figura CIII.2. Contenido de glutatión reducido (GSH) en tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* expuestas *ex vivo* por 1 h a a) MCLR de 0,1-5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n =4), b) MCLR de 0,1-5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ +PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n =3). Los resultados se expresan como porcentajes del control, media \pm EE.

CIII.3.1.3. Actividad GST y GR en tratamiento *in vivo* + *ex vivo*

Los resultados del ANOVA de dos factores, medidas repetidas muestran interacción significativa ($F_{1;14} = 7,26, p < 0,05$). No se registraron cambios significativos en la actividad GST de los peces pretratados con MCLR *in vivo*, con respecto a los peces control *in vivo*. Dentro de estos últimos, tampoco se registraron cambios significativos en la actividad GST cuando los intestinos se expusieron a PST1 *ex vivo*. En cambio, en los intestinos de peces expuestos en forma consecutiva a MCLR *in vivo* + PST1 *ex vivo*, la actividad GST disminuyó significativamente un 31%, en relación con su control y también difirió significativamente de los dos grupos de peces no pretratados con MCLR (comparaciones *post hoc* de Sidak, $t_{14} = 3,24, p < 0,05, n = 7-9$, figura CIII.3a).

En el intestino de los peces pre-tratados con MCLR *in vivo*, la actividad GR mostró una tendencia al aumento (30%) con respecto a los peces control *in vivo*, aunque no fue un efecto estadísticamente significativo. La exposición del intestino a PST1 *ex vivo* no alteró la actividad GR, en ninguno de los pretratamientos *in vivo* (figura CIII.3b).

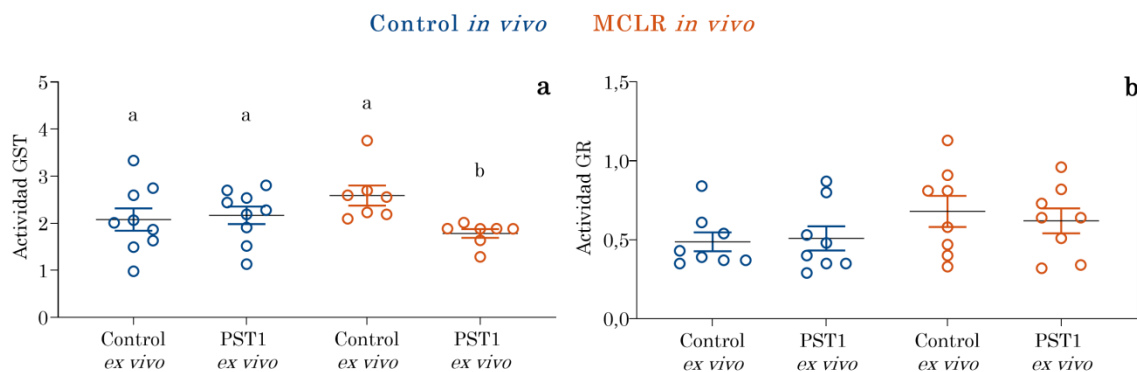


Figura CIII.3. Tiras de intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* provenientes de individuos pretratados con 0,5 g MCLR g pez⁻¹ por 48 h, expuestas *ex vivo* a PST1 0,13 μmol L⁻¹ por 1 h. a) Actividad glutatión S-transferasa (GST) (n = 7-9), b) Actividad glutatión reductasa (GR) (n = 8). Los datos se expresan como nmol s⁻¹ mg proteína⁻¹, media ± EE. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

CIII.3.1.4. Actividad CAT y producción de ROS

En los intestinos de los peces control *in vivo* y MCLR *in vivo*, la exposición PST1 *ex vivo* produjo un aumento significativo de la actividad CAT de 135% y 106%, respectivamente, en relación con cada control *ex vivo* (ANOVA de dos factores, medidas repetidas, $F_{1,14} = 12,35$, $p < 0,01$ para el factor exposición *ex vivo*, $n = 7-9$, figura CIII.4a). La interacción no fue significativa ($F_{1,13} = 0,62$, $p > 0,05$).

No se registraron diferencias en cuanto a la producción de ROS en el intestino entre los peces control *in vivo* y los pretratados con MCLR *in vivo*. Sin embargo, en estos últimos, la producción de ROS aumentó un 30% en los enterocitos expuestos a PST1 *in vitro*, con respecto al control *in vitro* ($t_{19} = 2,26$, $p < 0,05$, $n = 10-11$, figura CIII.4b).

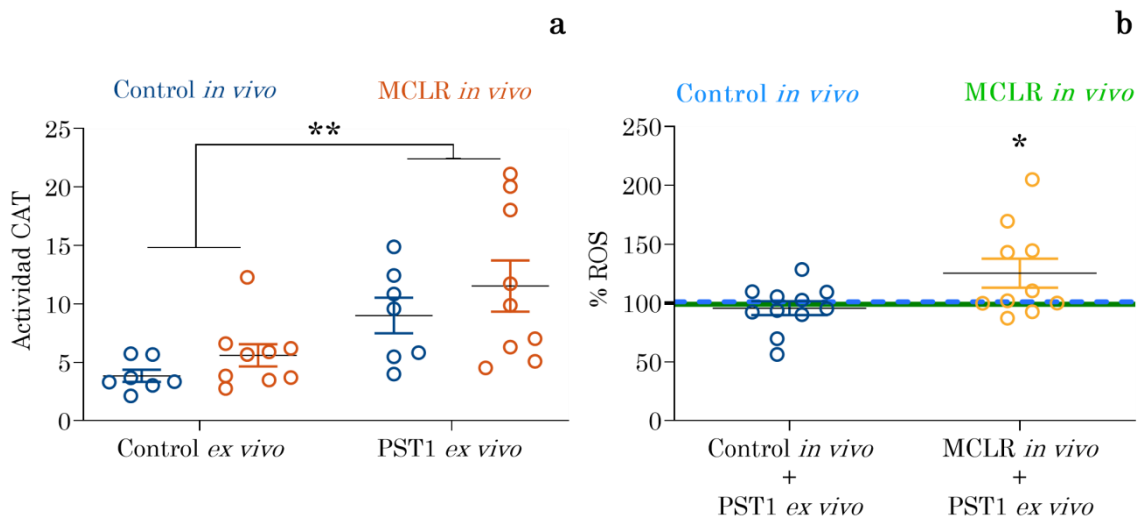


Figura CIII.4. Intestino medio de *Oncorhynchus mykiss* pre-tratadas *in vivo* a 0,5 $\mu\text{g MCLR g pez}^{-1}$ por 48 h y luego expuesto *ex vivo* a PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 1 h, a) Actividad catalasa (CAT) en tiras intestinales. Los datos se expresan como $\text{nmol s}^{-1} \text{mg prote\u00edna}^{-1}$ ($n = 6-8$), b) Producci\u00f3n de especies reactivas de ox\u00edgeno (ROS) en enterocitos aislados. Los datos se expresan como porcentaje del control correspondiente ($n = 10-11$). Los resultados se expresan como media \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

CIII.3.2. Funci\u00f3n de los transportadores ABCC en segmentos intestinales

La actividad de los transportadores ABCC se estim\u00f3 a trav\u00e9s del registro de la tasa de transporte de DNP-SG en preparaciones *ex vivo* de segmentos intestinales. Los segmentos evertidos se usaron para estimar la actividad de los transportadores de la cara apical del epitelio y los segmentos no evertidos se

usaron para estimar la actividad de los transportadores de la cara basolateral. Las PST *ex vivo* siempre se aplicaron en la cara apical del intestino, es decir, se aplicaron en el baño de incubación cuando el segmento era evertido o en el interior del segmento cuando éste era no evertido.

En los segmentos intestinales evertidos, en los que se estimó el transporte por proteínas ABCC apicales, no se observaron cambios en la tasa de transporte de DNP-SG en ninguno de los tratamientos, tanto *in vivo* como *ex vivo*, ni en la combinación de ambos. Por otra parte, en los segmentos intestinales no evertidos, provenientes de peces control *in vivo* y expuestos a PST1 *ex vivo*, donde se midió el transporte por ABCC basolaterales, tampoco se registraron cambios en la tasa de transporte de DNP-SG (figura CIII.5b). Por otro lado, el pretratamiento con MCLR *in vivo* incrementó significativamente la tasa de transporte por los ABCC basolaterales en un 19% y 20% para los intestinos posteriormente expuestos a solución control o a PST, respectivamente (ANOVA de dos factores, medidas repetidas, $F_{1; 41} = 10,46$, $p < 0,01$ para el factor pretratamiento *in vivo*, $n = 11-12$, figura CIII.5b).

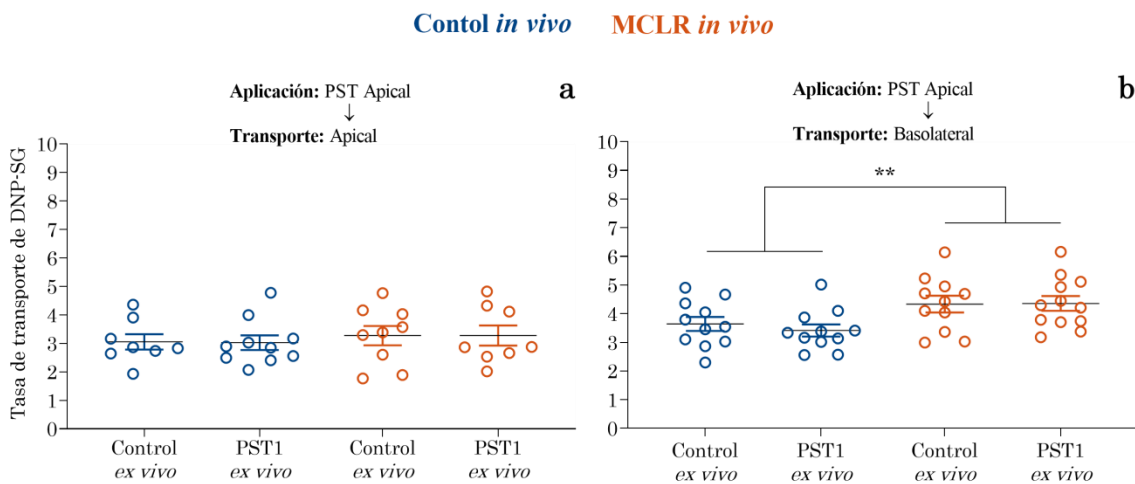


Figura CIII.5. Tasa de transporte de DNP-SG en segmentos intestinales provenientes de ejemplares de *Oncorhynchus mykiss* pretratados *in vivo* con 0,5 μg MCLR g pez^{-1} por 48 h y luego expuestos *ex vivo* a PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 1 h, a) Segmentos evertidos, aplicación de PST1 y lectura de DNP-SG en el baño de incubación ($n = 8-10$), b) Segmentos no evertidos, aplicación de PST1 en el interior del segmento y lectura de DNP-SG en el baño de incubación ($n = 11-12$). Los datos se expresan como μmol de DNP-SG min^{-1} g de tejido $^{-1}$, media \pm EE. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$).

CIII.3.3. Actividad PP1

En todos los peces pretratados con MCLR *in vivo*, la actividad PP1 disminuyó significativamente un 24% con respecto al control *in vivo* (ANOVA de dos factores, medidas repetidas, $F_{1;13} = 11,02$, $p < 0,01$, para el factor pretratamiento *in vivo*, $n = 7-8$, figura CIII.6a). La exposición a PST1 *ex vivo* no afectó la actividad PP1 (Figura CIII.6a).

En las tiras de intestino sólo incubadas *ex vivo* con PST1 $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$, la actividad PP1 no se modificó en forma significativa. En cambio, en las tiras de intestino tratadas con MCLR $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ durante 1 hora, la actividad de PP1 disminuyó significativamente en un 31% en relación con el control (ANOVA de un factor, medidas repetidas y comparaciones *post hoc* de Dunnett, $F_{2,18; 21,82} = 3,71$, $p < 0,05$, $n = 11$). La combinación de ambas toxinas no produjo efectos significativos (Figura CIII.6b).

Para completar el análisis de los posibles efectos de PST sobre la actividad de la enzima PP1, se analizaron los efectos de distintas concentraciones de PST1 y MCLR sobre la actividad de la enzima en un experimento *in vitro*. Se registró un efecto dependiente de la concentración de PST1, que fue ajustado a una regresión no lineal, de la actividad PP1 (como porcentaje del control) vs. logaritmo de la concentración de PST1 ($CI_{50} = 227 \text{ nmol L}^{-1}$; 95% IC = 38 - 1345; $r^2 = 0,50$; $n = 3-9$, figura CIII.6c). El punto correspondiente a la concentración $26000 \text{ nmol L}^{-1}$ fue excluido del análisis. Este dato indica una recuperación de la actividad hasta llegar al 93% del control. También se registró un efecto inhibitorio de la actividad PP1 dependiente de la concentración, en la exposición *in vitro* a MCLR, con una regresión no lineal de actividad PP1 (%) vs. logaritmo de la concentración de MCLR ($CI_{50} = 4,2 \text{ nmol L}^{-1}$; 95% IC = 0,45 - 39,60; $r^2 = 0,51$; $n = 3-4$) (Figura CIII.6d).

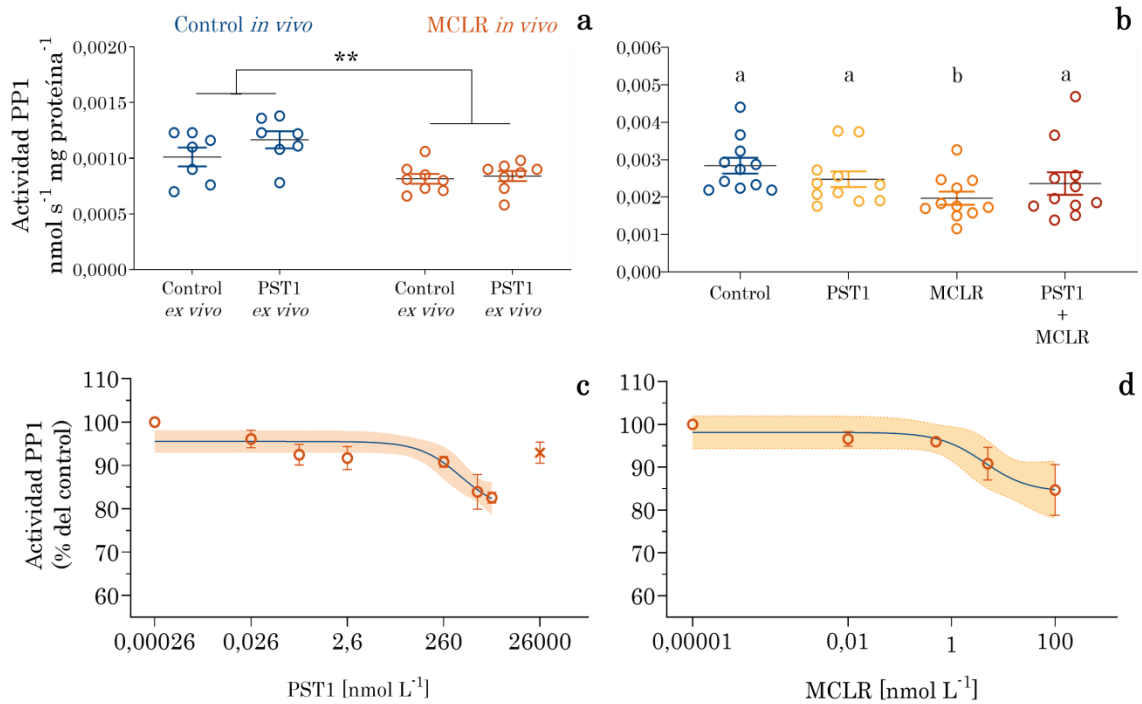


Figura CIII.6. Actividad proteína fosfatasa 1 (PP1) en intestino de medio *Oncorhynchus mykiss* a) Tiras intestinales de peces pretratados *in vivo* con 0,5 μg MCLR g de pez⁻¹ por 48 h y luego expuestas *ex vivo* a PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 1 h. Los datos están expresados como $\text{nmol s}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ ($n = 7-8$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (** $p < 0,01$). b) Tiras intestinales expuestas *ex vivo* por 1 h a PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$, MCLR 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + MCLR 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Las datos están expresados como $\text{nmol s}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ ($n = 11$). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). c) Sobrenadante de homogenato de intestino medio expuesto *in vitro* a PST1, regresión no lineal, actividad PP1 vs. logaritmo de la concentración de PST1 (nmol L^{-1}); $n = 3-9$, $\text{CI}_{50} = 227 \text{ nmol L}^{-1}$ PST1, 95% IC = 38 - 1345 (área coloreada), $r^2 = 0,50$. El punto "x" está excluido del análisis. d) Sobrenadante de homogenato expuesto *in vitro* a MCLR, regresión no lineal, actividad PP1 vs. logaritmo de la concentración de MCLR (nmol L^{-1}); $n = 3-4$ $\text{CI}_{50} = 4,2 \text{ nmol L}^{-1}$ PST1, 95% IC = 0,45-39,60 (área coloreada), $r^2 = 0,51$. Todos Los datos se expresan como media \pm EE.

CIII.4. Discusión

En este capítulo, se presenta evidencia acerca de los efectos combinados, en el intestino medio de *O. mykiss*, de dos tipos de toxinas que pueden estar presentes al mismo tiempo en una floración de cianobacterias, MCLR y PST. Se muestra, por primera vez, que el pretratamiento *in-vivo* durante 48 h con MCLR y posterior exposición *ex vivo* a PST altera el balance oxidativo de los enterocitos. Los resultados también indican que la exposición consecutiva a MCLR y PST no produce cambios en la actividad de los transportadores ABCC, más allá de los ya producidos por MCLR en forma individual. Además, si bien MCLR inhibe la actividad PP1, este efecto no se agrava con la exposición posterior a PST.

En los peces expuestos sólo a PST1 *ex vivo* (control *in vivo*), el contenido de GSH no disminuyó, contrariamente a lo que se observó en el capítulo I de esta tesis. Esta diferencia de respuesta se debió, muy probablemente, a que en las exposiciones del capítulo I se usó epitelio aislado, sin la capa muscular, lo que ofrece mayor relación área de absorción / masa total de la preparación, con respecto a las tiras intestinales empleadas en los experimentos de este capítulo. El pretratamiento con MCLR *in vivo* durante 48 h tampoco afectó el contenido de GSH, lo que coincide con lo observado en el capítulo II de esta tesis. Sin embargo, en la exposición consecutiva a MCLR *in vivo* y PST1 *ex vivo*, sí se observó una disminución del contenido de GSH, lo que evidencia un claro efecto sinérgico de ambas toxinas en estas condiciones.

Como se mencionó en el capítulo I, el contenido de GSH tiende a disminuir frente a condiciones prooxidantes (Deponte, 2013; Meister y Anderson, 1983; Wu *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este capítulo, en los intestinos expuestos en forma consecutiva a MCLR *in vivo* y PST1 *ex vivo*, sugieren que la disminución del contenido de GSH se relaciona con su oxidación en reacciones vinculadas a estrés oxidativo, aunque no todos los resultados coinciden. Por ejemplo, el cociente GSH/GSSG disminuyó, mientras que el contenido de glutatión total se mantuvo constante, lo que sugiere que GSH fue oxidado y no consumido en una reacción de conjugación. Sin embargo, los niveles de GSSG no aumentaron, sino que se mantuvieron estables. Además, la actividad GR no aumentó en forma clara en el

tratamiento donde se combinaron MCLR y PST. Por lo general, ante la disminución de GSH en condiciones de estrés oxidativo, se produce un aumento de la actividad de esta enzima, que cataliza la reducción de GSSG a GSH (Chen *et al.*, 2012; Jos *et al.*, 2005). De acuerdo a la literatura, el GSH podría haberse consumido en la conjugación con MCLR, en la que se forma MC-SG (Kondo *et al.*, 1992; Pflugmacher *et al.*, 1998; Takenaka, 2001) y/o en reacciones de biotransformación entre los análogos de las PST, *e.g.* reducción de toxinas N-sulfo-carbamoiladas a toxinas carbamoiladas, como fue propuesto en el capítulo I de la presente tesis y en la literatura (Gubbins *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2000 Sato *et al.*, 2000). De todos modos, debe considerarse que el consumo de GSH, la disminución del cociente GSH/GSSG y la inhibición de la enzima GST sólo ocurrieron cuando se combinaron las exposiciones a ambas toxinas.

En el mismo sentido, la producción de ROS fue mayor en los enterocitos expuestos en forma consecutiva a MCLR *in vivo* y PST1 *in vitro*, efecto que no se observó en las exposiciones a las toxinas por separado. A partir del consumo de GSH observado en la exposición a ambas toxinas, es posible suponer que en los enterocitos tratados con las dos toxinas hubo menor disponibilidad de GSH para compensar la producción de ROS.

La disfunción mitocondrial podría ser la causa del aumento observado en la producción de ROS (Chen *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2000). En la literatura, se ha descrito que MCLR puede desregular el potencial de la membrana mitocondrial al inhibir la subunidad β de la ATP sintasa mitocondrial (La-Salette *et al.*, 2008; Mikhailov *et al.*, 2003). En cuanto a las PST, se ha descrito que a dosis bajas afectan la expresión de la subunidad α de la ATP sintasa mitocondrial (Chen *et al.*, 2017), aunque esto sería más probable a tiempos más largos de exposición. Otra alternativa, consiste en que la producción de ROS se haya inducido por un mecanismo indirecto, en el cual, la función mitocondrial pudo haber sido afectada por el daño a la membrana lisosomal (Boaru *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2013; Pourahmad *et al.*, 2010 Zhao *et al.*, 2003). En este sentido, en los capítulos I y II de esta tesis, se ha observado que tanto MCLR como por las PST producen daños a la membrana lisosomal. El efecto de las PST sobre canales catiónicos de las

mitocondrias y/o de los lisosomas podría contribuir a los efectos sinérgicos sobre la producción de ROS (O'Rourke *et al.*, 2009).

El incremento en la producción de ROS en los intestinos expuestos en forma consecutiva con MCLR y PST1, estuvo acompañado por un aumento en la actividad CAT, cuya función consiste en reducir el H_2O_2 a H_2O y O_2 y, de esta forma mitigar el daño oxidativo (Claiborne, 1985). Este aumento en la actividad CAT también ocurrió en las preparaciones de intestino expuestas sólo a PST y constituye una respuesta de una parte del sistema antioxidante que no depende de GSH.

El aumento de la actividad CAT en el intestino de los peces del control *in vivo* y expuestos a PST *ex vivo*, implicaría que las PST indujeron ciertas condiciones de estrés oxidativo, que el sistema compensó, dado que no se registró mayor producción de ROS, ni tampoco disminución del contenido de GSH en ese tratamiento, con respecto al control *ex vivo*. Estos resultados difieren parcialmente de lo visto en el capítulo I de esta tesis (sección CI.3.1.2), donde no se observaron señales claras de estrés oxidativo en epitelio aislado de intestino medio de peces adultos, cuando se los expuso a PST1 *ex vivo*. Ferrão-Filho *et al.* (2017) describen un resultado similar en *Daphnia similis*, donde la actividad CAT aumenta luego de 24 h de exposición a través de la dieta a STX $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ y a STX $0,86 \mu\text{mol L}^{-1}$ + MCLR $0,38 \mu\text{mol L}^{-1}$. En el mismo trabajo, describen que en *Moina micrura* la actividad CAT aumenta con MCLR $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ y STX $0,86 \mu\text{mol L}^{-1}$ + MCLR $0,38 \mu\text{mol L}^{-1}$.

El aumento de la actividad CAT observado luego de la exposición a PST *ex vivo*, podría haber compensado una producción de H_2O_2 , cuyo efecto no se registró en el resto de marcadores de estrés oxidativo. En la literatura, se ha descrito que CAT se regula en forma postraduccional a niveles bajos de H_2O_2 ($0,25 - 1 \text{ mmol L}^{-1}$). El H_2O_2 induce la activación de las proteínas quinasas no receptoras c-Abl y Arg, las cuales fosforilan a CAT y estimulan su actividad (Cao *et al.*, 2003; Rhee *et al.*, 2005). A niveles más altos de H_2O_2 (*e.g.* 2 mmol L^{-1}), c-Abl y Arg se disocian de CAT, la cual queda susceptible a la desfosforilación por tirosina fosfatasas, lo que provoca la disminución de su actividad. Por lo tanto, puede especularse que la producción de H_2O_2 luego de la exposición a PST1 *ex vivo*, incluso cuando se hizo luego de la

exposición *in vivo* a MCLR, fue lo suficientemente baja como para activar a CAT en forma postraduccional.

La disminución en el contenido de GSH en los intestinos expuestos en forma consecutiva a MCLR *in vivo* y PST1 *ex vivo*, correlacionó con la disminución de la actividad GST. A partir de la disminución del contenido de GSH y de la actividad GST, se podría esperar que, además de la defensa antioxidante del enterocito, también se debilitara el sistema de resistencia a múltiples xenobióticos (MXR) (Aquilano *et al.*, 2014; Bard, 2000; Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006). Sin embargo, la exposición *ex vivo* a PST no produjo cambios significativos en la tasa de transporte por ABCC apicales ni basolaterales en el intestino de los peces pretratados con MCLR *in vivo* ni en el de los controles. Los resultados indican que la actividad de los transportadores ABCC fue modulada positivamente por el pretratamiento con MCLR *in vivo*, como se observó en el capítulo II de esta tesis. Esta modulación positiva es evidente en la cara basolateral, donde se ve un aumento del transporte de DNP-SG. Los transportadores apicales también estarían modulados positivamente si se considera que la MCLR presente en la preparación estaría inhibiendo competitivamente el transporte de DNP-SG (Bieczynski *et al.*, 2014) y, sin embargo, no se observa una disminución de este transporte sino una muy pequeña tendencia al aumento.

Estos resultados indican que la posterior exposición a PST no modifica el efecto de la MCLR aplicada *in vivo* por 48 h sobre el transporte de DNP-SG. Sin embargo, también indican que, en el intestino del pez, la tasa de transporte de compuestos conjugados con GSH, como MC-SG hacia el medio interno del organismo sufriría un aumento mayor que la tasa de transporte hacia el lumen del intestino. Esto implica una autopreservación de los enterocitos y además un compromiso para otros órganos de detoxificación y excreción como el hígado y el riñón. En este sentido, Bieczynski *et al.* (2013) demostraron que el epitelio intestinal acumula MCLR en las primeras 3 h después de la alimentación y la va transportando a través de proteínas ABCC hacia la luz del intestino y también hacia la circulación entero-hepática. A partir de las 6 h, la MCLR se acumula en hígado y luego se elimina completamente entre las 24 y las 48 h.

Si bien la capacidad de transporte por ABCC no disminuye por la combinación de MCLR y PST, se esperaba que, con la disminución del contenido de GSH y la baja actividad GST, el efecto inhibitorio de MCLR sobre la enzima PP1 fuese mayor frente a las dos toxinas combinadas. Sin embargo, la actividad PP1 sólo disminuyó por el pretratamiento con MCLR *in vivo*, y no fue inhibida en las preparaciones expuestas sólo a PST1 *ex vivo*. Más aún, en el experimento en que ambas toxinas se aplicaron *ex vivo*, la MCLR inhibió la actividad PP1, como se esperaba, pero la combinación de ambas toxinas no tuvo efecto significativo. Estos resultados suman evidencia para proponer que la capacidad de los enterocitos de *O. mykiss* para detoxificar MCLR no es disminuida por la presencia de PST.

Los resultados de las exposiciones *in vitro* indican que las PST inhiben actividad PP1 de forma dependiente de la concentración, pero a concentraciones mucho más altas que las empleadas en los experimentos discutidos arriba. La CI_{50} para la inhibición de PP1 por PST1 resultó 54 veces mayor que la CI_{50} de MCLR. Por lo cual, el efecto de PST1 sobre la PP1 es muy leve comparado con el efecto de MCLR. Además, se debe considerar que la CI_{50} calculada en este experimento ($CI_{50} = 0,23 \mu\text{mol L}^{-1} = 65,3 \mu\text{g STXeq L}^{-1}$), es tres veces superior a la dosis máxima permitida para agua potable ($20 \mu\text{g STXeq L}^{-1}$ para adultos, WHO, 2019). Como estos valores de seguridad se calculan a partir del efecto neurotóxico de STX, los efectos leves que las STX puedan producir sobre la actividad PP1 constituirían un problema relativamente menor.

CIII.5. Conclusiones

La MCLR, administrada a través del alimento durante 48 h, produce un efecto sensibilizante en el intestino medio de *O. mykiss*, frente a las PST, que se refleja en mayor estrés oxidativo y en el efecto negativo sobre el balance oxidativo del enterocito, cuando estas toxinas son aplicadas en forma consecutiva.

La exposición consecutiva a MCLR y PST no afecta en forma negativa el sistema de resistencia a múltiples xenobióticos en el intestino medio de *O. mykiss*, al menos en cuanto a la conjugación con GSH catalizada por GST y al transporte de los productos conjugados por ABCC. La exposición a MCLR, a través del alimento durante 48 h, aumenta la respuesta del sistema de resistencia a múltiples xenobióticos por medio del aumento en la tasa de transporte por proteínas ABCC en ambas caras del epitelio del intestino medio de *O. mykiss*.

3. Discusión general

Las cianobacterias poseen la capacidad de producir cianotoxinas cuyos efectos nocivos ocasionan problemas sanitarios y ambientales alrededor del mundo. El aumento y la persistencia de los eventos de floraciones algales nocivas (FAN) han aumentado la probabilidad de que los organismos acuáticos estén expuestos, no solo a mayor concentración, sino también, a varios tipos de cianotoxinas, en forma simultánea o consecutiva. En esta tesis, se planteó la hipótesis general de que las cianotoxinas que pueden estar presentes en los cuerpos de agua dulce de Norpatagonia, *e.g.* MCLR y PST (Alcalde *et al.*, 1996; Echenique *et al.*, 2014; Otaño *et al.*, 2012, Pizzolon, 1999), son capaces de afectar la función del intestino medio de la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*, a través de la interferencia en los mecanismos de resistencia a múltiples xenobióticos y de la producción de efectos tóxicos intracelulares.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis general enunciada. El intestino medio de *O. mykiss* es un órgano sensible a la MCLR y a las PST. De acuerdo a los efectos intracelulares observados, MCLR y PST ingresan a las células del intestino medio. Si bien no se midió directamente la absorción, los resultados obtenidos mediante la utilización de distintos modelos de exposición (*in vivo* y *ex vivo*) permiten afirmar que ambas toxinas son incorporadas a los enterocitos desde el lumen intestinal. MCLR se absorbe con el alimento suministrado *in vivo* y, de acuerdo a la literatura, lo hace a través de los transportadores de aniones orgánicos del sistema biliar, OATP (Boaru *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2005; Feurstein *et al.*, 2009). Por otro lado, en preparaciones intestinales polarizadas (sacos intestinales), PST sólo produjo efectos inhibitorios del transporte por proteínas ABCC, cuando se aplicó en la cara apical de intestino. Por lo tanto, las PST, sólo podrían ser absorbidas por los enterocitos a través del lumen del intestino y no desde la cara basolateral, en el caso de que llegaran desde la circulación sistémica, por ejemplo, luego de ser absorbidas por otro órgano como las branquias. Si bien hasta el momento no se ha descrito en la literatura qué mecanismos podrían estar involucrados en la absorción/transporte de las PST, se ha demostrado que peces planctófagos y carnívoros pueden incorporar estas toxinas a través de la dieta (Kwong *et al.*, 2006; White *et al.*, 1980). Esto resulta ecológicamente relevante, dado que implica la posibilidad de que las PST sean acumuladas y transferidas a lo largo de la cadena trófica, como se ha sugerido para

sistemas de agua dulce (Berry y Lind, 2010; Berry *et al.*, 2010). Por otro lado, Gao *et al.*, (2019) describieron diferencias en la absorción intestinal selectiva de saxitoxina (STX) o tetrodotoxina (TTX) entre un pez globo de mar, *Takifugu pardalis*, y un pez globo de agua dulce, *Pao suvattii*. Esto sugiere la expresión de distintas proteínas transportadoras en la membrana luminal del intestino en estas especies.

Dentro de los enterocitos de *O. mykiss*, MCLR y PST disminuyen sensiblemente la estabilidad de la membrana lisosomal, aunque los mecanismos subyacentes han sido poco estudiados en general hasta ahora y, en particular, no se conocen en esta especie (Bianchi *et al.*, 2019; Boaru *et al.*, 2006; Li y Ma, 2017). Sin embargo, la estabilidad de la membrana lisosomal ha demostrado ser un marcador sensible a los efectos de cianotoxinas en el intestino medio de *O. mykiss* y podría serlo también para otros xenobióticos (Beiras, 2018; Dayeh *et al.*, 2003; Repetto *et al.*, 2008). Históricamente, se ha descrito que los lisosomas poseen una función digestiva y protectora frente a diversos patógenos, xenobióticos y productos del daño oxidativo, *e.g.* proteínas y ADN oxidados (Hesketh *et al.*, 2018; Moore *et al.*, 2009; Rovetta *et al.*, 2012; Xu y Ren, 2015). Por otro lado, en los últimos años, se ha demostrado que también son capaces de adaptar su función en respuesta a estímulos ambientales y actuar como “puntos de partida” para la señalización hacia otras organelas, como el núcleo o las mitocondrias (Deus *et al.*, 2020; Lawrence y Zoncu, 2019; Settembre y Ballabio, 2014). Por ejemplo, a través de una maquinaria de complejos proteicos, los lisosomas pueden detectar la falta de determinados nutrientes y promover la síntesis *de novo* de lisosomas, junto a toda su maquinaria de proteínas (Martina y Puertollano, 2013; Settembre *et al.*, 2011; 2012; 2013).

Si bien las múltiples funciones de los lisosomas están aún lejos de ser dilucidadas, el mantenimiento de las mismas es clave para el mantenimiento de la homeostasis de la célula y del organismo (Ballabio y Bonifacino, 2020). Por ejemplo, en moluscos, peces y mamíferos la desestabilización de la membrana lisosomal está íntimamente relacionada con la inducción de procesos tales como la autofagia, cuya desregulación altera la fisiología e induce la muerte celular (Meijer y Codogno, 2004; Moore *et al.*, 2009). En mamíferos, a nivel del organismo, se ha

propuesto que la disfunción lisosomal está involucrada en el desarrollo de numerosas enfermedades neurodegenerativas y de ciertos tipos de cáncer (Nixon, 2013; Peng *et al.*, 2019). Los lisosomas también cumplen un rol fundamental en el metabolismo energético, influyendo en el control de los niveles glucosa y lípidos disponibles (Pastore *et al.*, 2017). En este sentido, los lisosomas son piezas claves para entender los mecanismos relacionados con desórdenes metabólicos como la obesidad y la diabetes (Jaishy y Abel, 2016; Mészáros *et al.*, 2018). Por ejemplo, se ha demostrado que la aplicación de dietas altas en grasa inhibe la acidificación del lisosoma, la actividad de hidrolasas ácidas y disminuye la selectividad de la membrana lisosomal (Gornicka *et al.*, 2012). En peces, este tipo de regulación compleja no está tan estudiado como en mamíferos y menos aún en relación con las cianotoxinas. Los efectos de MCLR y PST sobre la estabilidad de la membrana lisosomal en las células del intestino medio de *O. mykiss*, observados en los capítulos I y II, deben ser tenidos en consideración como posibles desencadenantes de efectos negativos para la célula y el individuo, como los descritos más arriba.

Dentro del paradigma de que los lisosomas funcionan como señalizadores celulares, que se comunican con otras organelas, en el capítulo II de esta tesis se propuso que su funcionamiento está íntimamente relacionado con el funcionamiento de las mitocondrias. La liberación de enzimas lisosomales afecta la integridad de la membrana mitocondrial, lo que produce la disfunción de esta organela y la mayor producción de ROS, como una de sus posibles consecuencias (Kurz *et al.*, 2008; Li y Ma 2017). De acuerdo a esto, la mayor producción de ROS observada en el capítulo III, cuando el intestino se expuso en forma consecutiva a MCLR y PST, pudo deberse a un efecto indirecto sobre la mitocondria, producido por la desregulación de la función lisosomal. Además, la misma desregulación de la función lisosomal produce la liberación/generación de ROS (Kurz *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2013). Sin embargo, en el capítulo I, no se observó una correlación directa entre el daño a la membrana lisosomal y la producción de ROS a la concentración de PST1 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A esta concentración se detectó daño a la membrana lisosomal pero no mayor producción de ROS con respecto al control. Otra alternativa consiste en que la disminución de GSH, producto de la exposición consecutiva a MCLR y PST, produce la disminución parcial de las defensas antioxidantes que dependen de esta molécula. Esto disminuiría la capacidad el

enterocito para compensar la producción de ROS originada por el efecto de las toxinas o por la misma respiración celular. Es decir, que no se detecten aumentos en la producción de ROS cuando las toxinas son administradas individualmente, no significa que no se estén produciendo, sino que el sistema la está compensando. Por ello, para futuros experimentos, resulta de interés el estudio de los efectos de MCLR y PST sobre la función mitocondrial. De acuerdo a la literatura, MCLR puede inhibir a la subunidad β de la enzima ATP sintasa mitocondrial y/o de las ATPasas de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$, lo que desregula el potencial de la membrana de la mitocondria (Gaete *et al.* 1994; La-Salette *et al.*, 2008; Mikhailov *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008). Por otra parte, PST, específicamente STX, también puede desregular el potencial de membrana, ya que afecta la expresión de la subunidad α de la ATP sintasa mitocondrial (Chen *et al.*, 2017). Aunque es esperable que este tipo de regulaciones génicas se produzcan a tiempos de exposición más largos que los utilizados en esta tesis para PST (1 h). En este sentido, es más probable que en una 1 h de exposición, las PST puedan producir la inhibición de canales iónicos dependientes de voltaje, en la membrana interna de la mitocondria (O'Rourke *et al.*, 2009).

En otro sentido, las membranas de los lisosomas también pueden ser dañadas por ROS, tales como H_2O_2 . Esta molécula reacciona con el Fe^{II} , presente en el interior del lisosoma, y produce radicales $\cdot\text{OH}$ a través de una reacción de Haber-Weiss (Kurz *et al.*, 2008; Pourahmad *et al.*, 2010; Zdolsek *et al.*, 1993). Sin embargo, tanto en el capítulo I, como en el capítulo II, no se observó una relación clara entre el aumento en la producción de ROS y el daño a la membrana lisosomal. En el capítulo I, la exposición a PST $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ no provocó cambios significativos en la producción de ROS, pero si, incrementó en un 50% el daño a la membrana lisosomal. Reforzando esta idea, en el capítulo II se pudo observar que luego de la exposición a la concentración efectiva 50% (CE_{50}) de MCLR para NRRT50, $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, no se observó ningún cambio en la producción de ROS.

En todos los casos, al momento de interpretar los resultados referidos a la producción de ROS, se debe tener en cuenta que un aumento en los niveles de moléculas tales como H_2O_2 no implica necesariamente un efecto prooxidante. Un aumento de la producción de H_2O_2 puede corresponder a una respuesta

homeostática de la célula frente a estresores tales como las toxinas estudiadas en esta tesis. En la literatura se ha descrito que el H_2O_2 actúa como señalizador y regulador de procesos tales como inflamación, hipoxia, contracción muscular, apoptosis, entre otros (Sies, 2017). Este autor propone que para el aumento de ROS implique un efecto prooxidante, debe producir también un daño oxidativo, como la oxidación de lípidos, proteínas o ADN (Sies, 2020). En este sentido, en el capítulo I, no se observó un aumento significativo de la producción de ROS, luego de la exposición a PST1, ni daño oxidativo a lípidos, pero si se registraron cambios significativos en ciertas variables de defensa antioxidante como el descenso de GSH y de la actividad GST, y el aumento de la actividad GR.

En el capítulo III se observó un aumento de la actividad CAT luego de la exposición *ex vivo* por 1 h a PST1, en preparaciones provenientes de peces de ambos pretratamientos *in vivo* (Control y MCLR), el cual no fue observado en las exposiciones a PST1 *ex vivo* del capítulo I. Esta diferencia, podría estar relacionada con una mayor susceptibilidad del intestino de los peces utilizados en el capítulo III, condicionada por su estadio en el ciclo de vida. Los peces utilizados en el capítulo I eran peces en estadio *smolt*, desarrollados sexualmente (todas hembras), mientras que los peces del capítulo III eran peces *pre-smolt*. El proceso de “esmoltificación”, es un proceso de transformación fisiológica que prepara a los juveniles de *O. mykiss*, y de otros salmónidos, para migrar del agua dulce hacia el agua de mar (Folmar y Dickhoff, 1980; Groot y Margolis, 1991). Si bien las poblaciones de *O. mykiss* u otros salmónidos, que poseen estrategias de vida residente o que migran entre distintos ambientes de agua dulce, manifiestan los cambios premigratorios con menor intensidad que los migradores o anádromos, las branquias y el intestino son los órganos que más cambios sufren, debido a su función osmorregulatoria (Ferguson *et al.*, 2019; Kendall *et al.*, 2015; Nichols *et al.*, 2008). Por lo tanto, la capacidad de respuesta antioxidante y detoxificante también puede diferir entre estadios del desarrollo. Esto, también podría explicar las diferencias observadas entre el capítulo I y el capítulo III, en cuanto al consumo de GSH y la actividad GST y GR.

Para el análisis de las diferencias de resultados observadas entre los capítulos I y III, también se debe considerar que en cada capítulo se usaron

modelos distintos de exposición *ex vivo*. En el capítulo I se utilizó epitelio aislado, sin *tunica submucosa*, *tunica muscularis*, ni *tunica serosa*, mientras que en el capítulo III, se usó el intestino medio con todos sus tejidos. Esto supone una mayor área de absorción de PST por unidad de masa de tejido. El epitelio aislado también supone menor interferencia por parte del resto de los tejidos que conforman el intestino, dado que, al momento de realizar las determinaciones bioquímicas, en los homogenatos, sólo están presentes elementos del epitelio intestinal. De esta forma, se obtienen respuestas más sensibles y específicas. La mayor sensibilidad por parte del epitelio aislado con respecto al órgano entero, se observó en la figura 2.2 de la metodología general, en relación con el transporte de DNP-SG.

En cuanto a la inhibición del transporte de DNP-SG por proteínas ABCC basolaterales, se observó una diferencia entre los capítulos I y III, que posiblemente se deba al uso de distintos extractos de PST. En el capítulo I, para los experimentos de transporte polarizado, se utilizó el extracto PST2, el cual produjo una inhibición significativa del transporte basolateral del 17%, con respecto a su control. En cambio, en el capítulo III, se utilizó el extracto PST1, el cual no produjo una inhibición significativa. Esta diferencia en la inhibición del transporte puede deberse a que los extractos poseen distinta composición de toxinas. El extracto PST2 está integrado exclusivamente por las toxinas C1/C2, B1 y STX, mientras que el extracto PST1 posee además, un gran porcentaje de GSTX1/4 y NEOSTX. De hecho, en cuanto a porcentajes, PST2 posee una proporción de toxinas C1/C2 2,6 veces mayor que la de PST1. Estas diferencias sugieren la posibilidad de que la inhibición del transporte por proteínas ABCC basolaterales sea causada principalmente por C1/C2, B1 y/o STX. Para futuros trabajos, dirigidos a profundizar en los efectos de estas toxinas en la actividad de los transportadores ABCC, es necesario realizar experimentos de transporte con al menos estas tres toxinas aisladas.

Los resultados de este trabajo de tesis, no permiten saber si las PST son transportadas desde el citoplasma de los enterocitos hacia el medio externo, hacia el medio interno o si son acumuladas en ellos. En la literatura, aún no se han descrito los mecanismos a través de los cuales las PST son movilizadas entre los distintos órganos o hacia el medio externo. En bivalvos, las toxinas son absorbidas

y transportadas a diversos órganos donde se pueden acumular, especialmente en la glándula digestiva, o eliminar hacia el medio externo. Antes de ser eliminados, los diversos análogos de PST pueden sufrir distintas biotransformaciones, que aún están en discusión (Bricelj y Shumway, 1998; Garcia *et al.*, 2010; Guéguen *et al.*, 2011; Lukowski, 2019). En peces, se ha reportado que las toxinas se pueden acumular en el músculo hasta por 90 días (Calado *et al.*, 2019; Galvão *et al.*, 2009) y también que pueden eliminarse (Bakke y Horsberg, 2010). En *Diplodus sargus*, se ha propuesto que las PST podrían ser excretadas por vía renal como B1 y dcSTX (Costa *et al.*, 2011), mientras que en *Acanthopagrus schlegeli* las PST se excretarían como C1 y C2 (Kwong *et al.*, 2006). Sin embargo, no se sabe si estas toxinas son excretadas activamente por transportadores de membrana, como ocurre en el caso de la MCLR o por otra vía que pueda involucrar, por ejemplo, a los lisosomas o vesículas o filtración glomerular.

En cuanto a MCLR, se ha propuesto que puede ser excretada por los transportadores ABCB1, en forma libre, o por ABCC, como conjugado MC-SG (Amé *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2002; Malbrouck y Kestemont, 2006). Particularmente, Bieczynski *et al.* (2014) mostraron que, en el intestino de *O. mykiss*, MCLR se elimina a través de ABCC2, de ubicación apical. En esta tesis, se demostró que la exposición a MCLR por 24 y 48 h aumenta la tasa de transporte de DNP-SG a través de proteínas ABCC, algo que no se había descrito hasta el momento. Este efecto se observó a grandes rasgos en el capítulo II, mientras que los resultados obtenidos con sacos intestinales en el capítulo III permitieron afirmar que MCLR induce claramente la actividad de transportadores ABCC basolaterales y, probablemente, también los apicales. No está claro, aún, si los mecanismos de regulación implicados son de tipo postraduccional, *e.g.* activación por fosforilación o inserción de transportadores en membrana, o si dependen del aumento de la expresión génica. Los resultados de expresión de ARNm del capítulo II no indican que el transporte apical esté activado por mayor expresión génica de ABCC2, por lo que probablemente tendría una modulación postraduccional positiva. En cuanto al transporte basolateral, es preciso estudiar la expresión génica de transportadores ABCC basolaterales con mayor o menor afinidad por DNP-SG (Chan *et al.*, 2004; Deeley *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2014).

De acuerdo a los resultados de los capítulos II y III, el aumento del transporte de DNP-SG producto de la exposición *in vivo* a MCLR dependió en mayor medida de la modulación de los transportadores ABCC, que de la modulación de la enzima GST. En el capítulo II el transporte de DNP-SG aumentó independientemente de la actividad GST a las 24 y 48 h de exposición. En el capítulo III, el transporte de DNP-SG fue mayor en el intestino de todos los peces pre-tratados con MCLR *in vivo*, que en los peces control *in vivo*, a pesar de que la actividad GST disminuyó en el grupo expuesto consecutivamente a MCLR *in vivo* y PST *ex vivo*. Este resultado contrasta parcialmente con lo que observamos en trabajos previos sobre la actividad del sistema GST-ABCC luego de la exposición a As^{III}. En esos experimentos, la actividad GST pareció modularse positivamente por vía postraducciona, mientras que el transporte por ABCC2 aumentó por inducción de la expresión génica (Painefilú, 2016; Painefilú *et al.*, 2019). En el presente trabajo, MCLR estaría modulando sólo la actividad de los transportadores ABCC, y la actividad GST no sería limitante para el sistema de resistencia a múltiples xenobióticos.

El aumento de la tasa de transporte por ABCC protege al enterocito y al intestino en general, ya que implica el aumento de su capacidad para eliminar compuestos tóxicos que se transportan por estas proteínas, tales como la propia MCLR o el As^{III} (Bieczynski *et al.*, 2014; Painefilú *et al.*, 2019). Sin embargo, el aumento del transporte por ABCC basolaterales compromete al resto de los órganos, especialmente, hígado y riñón. En estos órganos, los compuestos tóxicos podrían ser acumulados o bien excretados. Bieczynski *et al.* (2013) describen que el intestino de *O. hatcheri* incorpora MCLR desde la dieta, de la cual excreta la mayor parte hacia el lumen intestinal, mientras que otra parte es transportada por la circulación entero-hepática hacia el hígado, donde la toxina es completamente eliminada. Sin embargo, también se ha detectado que las MC se pueden acumular en músculo, lo que implica un riesgo para la salud humana. Bieczynski (2015) calculó que en el músculo del pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*) se podrían acumular 0,020 µg MCLR g⁻¹ después de una única alimentación con la toxina. Si se calcula que una persona de 70 kg puede consumir 200g de filete de pescado por día, la misma puede estar expuesta a una ingesta diaria de 4 µg de MCLR.

Los modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, utilizados a lo largo de la tesis, aportan información valiosa si son interpretados en una forma integrada, teniendo en consideración que, las respuestas observadas en cada experimento están enmarcadas dentro de un organismo, en este caso un pez, que debe mantener su homeostasis en un ambiente que continuamente le presenta desafíos (Billman, 2020). El cambio climático no sólo aumenta para el pez el riesgo de exposición a las cianotoxinas, sino que también influye en el grado de sensibilidad que éste tendrá frente a ellas (Gordon, 2003; Noyes, 2009). Por ejemplo, el incremento de la temperatura, aumenta la tasa de absorción de los compuestos tóxicos en general y disminuye la capacidad de respuesta (Guinot *et al.*, 2012; Kimberly y Salice, 2014; Patra *et al.*, 2015). Se ha descrito que la acumulación de metales y metaloides, *e.g.* arsénico, cobre, entre otros, disminuye la tasa de crecimiento en ambientes con temperaturas altas (Jacquin *et al.*, 2019; Petijean *et al.*, 2020). Por otro lado, se ha sugerido que la exposición a clorpirifos disminuye la temperatura máxima de tolerancia de *O. mykiss* (Patra *et al.*, 2007). En cuanto a las cianotoxinas, se registró que en *Sparus aurata* y *Mytilus edulis*, la absorción y acumulación de las PST es máxima a temperaturas altas (Barbosa *et al.*, 2018; Mazur *et al.*, 2015). Juntos, la temperatura y los contaminantes ambientales actúan como estresores que ejercen un efecto negativo sobre la inmunidad de los peces, generan procesos de inflamación y retardan el crecimiento (Franke *et al.*, 2017; Paul *et al.*, 2014; Sheath *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo de tesis, sugieren que la MCLR y las PST producen un prolongado estado de estrés en el intestino medio de *O. mykiss*. Esto es evidente por efectos intracelulares, tales como el daño a lisosomas, la inhibición de la actividad PP1 y/o la producción de estrés oxidativo. Por otra parte, las respuestas regulatorias observadas tienden a compensar los efectos tóxicos, a través del aumento de la actividad de proteínas pertenecientes al sistema antioxidante-detoxificante o de resistencia a múltiples xenobióticos. Desde una visión integrada, puede plantearse que los requerimientos energéticos que el intestino invierte en mantener su homeostasis frente a los efectos descritos, comprometen los recursos energéticos que posee el organismo para mantener la homeostasis general y para sostener otras funciones, *e.g.* absorción de nutrientes, crecimiento, reproducción, respuesta inmune, entre otros (Ball y Balthazart, 2008;

Denver *et al.*, 2009). La profundización en el estudio de estos sistemas y de los mecanismos implicados en la excreción y transporte de xenobióticos en general, y de cianotoxinas en particular, en peces de importancia comercial, como la trucha arcoíris y el pejerrey patagónico, resultan necesarios para poder predecir los riesgos asociados a su cría y consumo, teniendo en cuenta el potencial impacto en la salud humana.

4. Conclusiones generales

- Las PST, son absorbidas por el intestino medio de la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*, por vía apical y producen condiciones de estrés oxidativo leves, inhibición del transporte por proteínas ABCC basolaterales y daños a lisosomas en epitelio intestinal.
- La MCLR se incorpora a través de la dieta en el intestino medio de *O. mykiss*, donde produce inhibición del transporte de compuestos conjugados con GSH, como 2,4-dinitrofenil-S-glutatión (DNP-SG), por proteínas de resistencia a múltiples xenobióticos de tipo ABCC en las primeras 12 horas de exposición, inhibición de la actividad de la proteína fosfatasa 1 y daño a lisosomas (los dos últimos efectos se mantienen a 24 y 48 horas de exposición).
- La exposición a MCLR, a través de la dieta, produce aumentos de la actividad de transporte por proteínas ABCC en el intestino medio de *O. mykiss*, a 24 y 48 horas.
- En las células del intestino medio de *O. mykiss* tanto las PST como la MCLR producen daño a lisosomas por un mecanismo independiente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).
- La combinación de MCLR y PST produce estrés oxidativo en las células del intestino medio de *O. mykiss*. El mismo está caracterizado por disminución en el contenido de GSH, disminución del balance entre glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG), menor actividad GST y mayor producción de ROS.
- La utilización del epitelio intestinal de *O. mykiss* aislado, como modelo de exposición *ex vivo* a xenobióticos, permite realizar determinaciones bioquímicas con mayor sensibilidad que la que se obtiene con preparaciones de fragmentos de intestino.

5. Bibliografía

- Abdel-Rahman, S., El Ayouty, Y.M., Kamael, H.A., 1993. Characterization of heptapeptide toxins extracted from *Microcystis aeruginosa* (Egyptian isolate) Comparison with some synthesized analogs. *Int. J. Pept. Protein Res* 41, 1–7. doi: 10.1111/j.1399-3011.1993.tb00108.x.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Aguilera, A., Haakonsson, S., Martin, M.V., Salerno, G.L., Echenique, R.O., 2018. Bloom-forming cyanobacteria and cyanotoxins in Argentina: A growing health and environmental concern. *Limnologica* 69, 103–114. doi:10.1016/j.limno.2017.10.006.
- Alcalde, R., Gil, M., Hahn, E., Bassani, S., Cifuentes, O., Labollita, H., 1996. In: AIC, DPH, RN y DGRH-NQN (Eds.), *Estudio de floraciones algales en el embalse Exequiel Ramos Mexía. Informe 1° etapa*, pp. 43.
- Aleksunes, L.M., Klaassen, C.D., 2012. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR α -, and Nrf2-null mice. *Drug Metab. Dispos.* 40, 1366–1379. doi:10.1124/dmd.112.045112.
- Ålin, P., Mannervik, B., Jörnvall, H., 1985. Structural evidence for three different types of glutathione transferase in human tissues. *FEBS Lett.* 182, 319–322. doi:10.1016/0014-5793(85)80324-0.
- Allocati, N., Masuli, M., Di Illio, C., Federici, L., 2018. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis* 7, 1–15. doi:10.1038/s41389-017-0025-3.
- Al-Sammak, M.A., Hoagland, K.D., Cassada, D., Snow, D.D., 2014. Co-occurrence of the Cyanotoxins BMAA, DABA and Anatoxin-a in Nebraska Reservoirs, Fish, and Aquatic Plants. *Toxins* 6, 488-508. doi:10.3390/toxins6020488.
- Al-Tebrineh, J., Merrick, C., Ryan, D., Humpage, A., Bowling, L., Neilan, B.A., 2012. Community Composition, Toxigenicity, and Environmental Conditions during a Cyanobacterial Bloom Occurring along 1,100 Kilometers of the

- Murray River. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 263–272. doi:10.1128/AEM.05587-11.
- Al-Tebrineh, J., Mihali, T.K., Pomati, F., Neilan, B.A., Al-tebrineh, J., Mihali, T.K., Pomati, F., Neilan, B.A., 2010. Detection of Saxitoxin-Producing Cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in Environmental Water Blooms by Quantitative PCR Detection of Saxitoxin-Producing Cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in Environmental Water Blooms by Quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7836–7842. doi:10.1128/AEM.00174-10.
- Alverca, E., Andrade, M., Dias, E., Sam Bento, F., Batoréu, M.C.C., Jordan, P., Silva, M.J., Pereira, P., 2009. Morphological and ultrastructural effects of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* extract on a kidney cell line. *Toxicol.* 54, 283–294. doi:10.1016/j.toxicol.2009.04.014.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115–2123. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.038.
- Amado, L.L., Monserrat, J.M., 2010. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. *Environ. Int.* 36, 226–235. doi:10.1016/j.envint.2009.10.010.
- Amé, M.V., Baroni, M.V., Galanti, L.N., Bocco, J.L., Wunderlin, D.A. 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74, 1179–1186. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.068.
- Amé, M.V., Baroni, M.V., Galanti, L.N., Bocco, J.L., Wunderlin, D.A. 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74, 1179–1186. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.068.
- Amé, M.V., Wunderlin, D.A. 2011. Efecto de las floraciones sobre el ecosistema acuático. Revisión actualizada. En: Giannuzzi, L. (Ed.). *Cianobacterias como*

- determinantes ambientales de la salud 1ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. 164 pp. ISBN 978-950-38-0118-5.
- Anagnostidis, K., Komárek, J., 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1-Introduction. Arch. Hydrobiol. Suppl. 1, 71 1-2 (Algological Studies 38-39): 291-302.
- Andrinolo, D., Gomes, P., Fraga, S., Soares-da-Silva, P., Lagos, N., 2002a. Transport of the organic cations gonyautoxin 2/3 epimers, a paralytic shellfish poison toxin, through the human and rat intestinal epitheliums. *Toxicon* 40, 1389–1397. doi:10.1016/s0041-0101(02)00118-6.
- Andrinolo, D., Iglesias, V., García, C., Lagos, N., 2002b. Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicon* 40, 699–709. doi:10.1016/s0041-0101(01)00263-x.
- Andrinolo, D., Michea, L.F., Lagos, N., 1999. Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats. *Toxicon* 37, 447–464. doi:10.1016/S0041-0101(98)00173-1.
- Andrinolo, D., Sedan, D., 2011. Cianotoxinas. Farmacología y efectos de las principales toxinas presentes en Argentina. Microcystinas, Saxitoxinas, Anatoxinas, Cylindrospermopsinas, lipopolisacáridos. En: Giannuzzi, L. (Ed.). *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud* 1ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. 164 pp. ISBN 978-950-38-0118-5..
- Annilo, T., Chen, Z.Q., Shulenin, S., Costantino, J., Thomas, L., Lou, H., Stefanov, S., Dean, M., 2006. Evolution of the vertebrate ABC gene family: Analysis of gene birth and death. *Genomics* 88, 1–11. doi:10.1016/j.ygeno.2006.03.001.
- Aquilano, K., Baldelli, S., Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* 5,196. doi:10.3389/fphar.2014.00196.
- Asakawa, M., Takagi, M., Iida, A., Oishi, K., 1987. Studies on the conversion of Paralytic Shellfish Poison (PSP) components by biochemical reducing agents. *Eiseikagaku* 33, 50–55. doi:10.1248/jhs1956.33.50.

- Atencio, L., Moreno, I., Prieto, A.I., Moyano, R., Molina, A.M., Cameán, A.M., 2008. Acute Effects of Microcystins MC-LR and MC-RR on Acid and Alkaline Phosphatase Activities and Pathological Changes in Intraperitoneally Exposed Tilapia Fish (*Oreochromis sp.*). *Toxicol. Pathol.* doi:10.1177/0192623308315356.
- Azevedo, S.M.F.O., 2005. South and Central America: toxic cyanobacterial. En: Codd, G.A., Azevedo, S.M.F.O., Bagchi, S.N., Burch, M.D., Carmichael, W.W., Harding, W.R., Kaya, K., Utkilen, H.C. (Eds): *Cyanonet. A global network for Cyanobacterial Bloom and toxin risk Management. Initial situation assessment and recommendations.* 115-126. IHP-VI Technical Documents in Hydrology (UNESCO), Paris.
- Backer, L.C., 2002. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (CyanoHABs): Developing a Public Health Response. *Lake Reserv. Manag.* 18, 20–31. doi:10.1080/07438140209353926.
- Bai, J., Lai, L., Ching, H., Cher, B., Tan, T.M.C., 2004. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediates efflux of bimine-glutathione. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 247–257. doi:10.1016/S1357-2725(03)00236-X.
- Baj, A., Bistoletti, M., Bosi, A., Moro, E., Giaroni, C., Crema, F., 2019. Marine Toxins and Nociception: Potential Therapeutic Use in the Treatment of Visceral Pain Associated with Gastrointestinal Disorders. *Toxins.* doi:10.3390/toxins11080449.
- Bakke, J.M., Horsberg, T.E., 2007. Effects of algal-produced neurotoxins on metabolic activity in telencephalon, optic tectum and cerebellum of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 85, 96-103. doi:10.1016/j.aquatox.2007.08.003.
- Bakke, M.J., Horsberg, T.E., 2010. Kinetic properties of saxitoxin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 152, 444–450. doi:10.1016/j.cbpc.2010.07.005.
- Bakke, M.J., Hustoft, H.K., Horsberg, T.E., 2010. Subclinical effects of saxitoxin and domoic acid on aggressive behaviour and monoaminergic turnover in

- rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 99, 1–9. doi:10.1016/j.aquatox.2010.03.013.
- Baldwin, W.S., 2019. Phase 0 of the Xenobiotic Response: Nuclear Receptors and Other Transcription Factors As a First Step in Protection from Xenobiotics. *Nucl. Recept. Res.* 6. doi:10.32527/2019/101447.
- Ball, E.R., Matsuda, M.M., Dye, L., Hoffmann, V., Zervas, P.M., Szarek, E., Rich, A., Chitnis, A.B., Stratakis, C.A., 2012. Ultra-structural identification of interstitial cells of Cajal in the zebrafish *Danio rerio*. *Cell Tissue Res.* 349, 483–491. doi:10.1007/s00441-012-1434-4.
- Ball, G.F., Balthazart, J., 2008. Individual variation and the endocrine regulation of behavior 381 and physiology in birds: a cellular/molecular perspective. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* No. 363:517-525.
- Ballabio, A., Bonifacino, J.S., 2020. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 101–118. doi:10.1038/s41580-019-0185-4.
- Barbosa, B., Santos, M., Anacleto, P., Maulvault, A.L., Pousão-Ferreira, P. Costa, P.C., Marques, A., 2019. Paralytic Shellfish Toxins and Ocean Warming: Bioaccumulation and Ecotoxicological Responses in Juvenile Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Toxins*, 11(7), 408. doi:10.3390/toxins11070408
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357-389. doi:10.1016/S0166-445X(00)00088-6.
- Bard, S.M., Bello, S.M., Hahn, M.E., Stegeman, J.J., 2002. Expression of P-glycoprotein in killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to environmental xenobiotics. *Aquat. Toxicol.* 59, 237–251. doi:10.1016/S0166-445X(01)00256-9.
- Bartram, J., Carmichael, W.W., Chorus, I., Jones, G., Skulberg, O.M., 1999. Introduction. En: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: St Edmundsbury Press: 12-24.

- Beiras, R., 2018. Chapter 16 - Biological Tools for Monitoring: Biomarkers and Bioassays. En: Beiras, R.B.T.-M.P. (Ed.), Elsevier, 265–291. doi:10.1016/B978-0-12-813736-9.00016-7.
- Benavides, H.R., Prado, L., Díaz, S., Carreto, J.L., 1995. An exceptional Bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. En: Lassus, P., Azul, G., Erard-Le-Den, E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. París: Lavoisier, 113-119. doi: 10.13140/2.1.4195.1683.
- Berry, J.P., Jaja-Chimedza, A., Dávalos-Lind, L., Lind, O., 2012. Apparent bioaccumulation of cylindrospermopsin and paralytic shellfish toxins by finfish in Lake Catemaco (Veracruz, Mexico). Food Addit. Contam. Part A 29, 314–321. doi:10.1080/19440049.2011.597785.
- Berry, J.P., Lind, O., 2010. First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegogolo” snails (*Pomacea patula catemacensis*). Toxicon 55, 930–938. doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.035.
- Bianchi, V.A., Langeloh, H., Tillmann, U., Krock, B., Müller, A., Bickmeyer, U., Abele, D., 2019. Separate and combined effects of neurotoxic and lytic compounds of *Alexandrium* strains on *Mytilus edulis* feeding activity and hemocyte function. Fish Shellfish Immunol. 84, 414–422. doi:10.1016/j.fsi.2018.10.024.
- Bieczynski, F., 2015. Mecanismos de transporte celular, cinética de acumulación y efectos tóxicos de Microcistina-LR en peces patagónicos de agua dulce. Tesis de Doctorado en Biología. CRUB, UNCo.
- Bieczynski, F., Bianchi, V.A., Luquet, C.M., 2013. Accumulation and biochemical effects of microcystin-LR on the Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*) fed with the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. Fish Physiol Biochem. 39(5), 1309-1321. doi: 10.1007/s10695-013-9785-7.
- Bieczynski, F., De Anna, J.S., Pirez, M., Brena, B.M., Villanueva, S.S.M., Luquet, C.M., 2014. Cellular transport of microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across the intestinal wall: Possible involvement of multidrug

- resistance-associated proteins. *Aquat. Toxicol.* 154, 97–106. doi:10.1016/j.aquatox.2014.05.003.
- Bieczynski, F., Torres, W.D.C., Paineofilú, J.C., Castro, J.M., Bianchi, V.A., Frontera, J.L., Paz, D.A., González, C., Martín, A., Villanueva, S.S.M., Luquet, C.M., 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. *Aquat. Toxicol.* 178, 106–117. doi:10.1016/j.aquatox.2016.07.016.
- Bittencourt-Oliveira, M., do, C., Piccin-Santos, V., Moura, A.N., Aragao-Tavares, N.K.C., Cordeiro-Araujo, M.K., 2014. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 86, 297–310. doi:10.1590/0001-3765201302512.
- Bittencourt-Oliveira, M., Piccin-Santos, V., Kujbida, P., Moura, A., 2011. Cylindrospermopsin in Water Supply Reservoirs in Brazil Determined by Immunochemical and Molecular Methods. *Journal of Water Resource and Protection*, Vol. 3 No. 6, 349-355. doi:10.4236/jwarp.2011.36044.
- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A. V, Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J., 2000. Identification, Characterization, and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferases. *J. Biol. Chem.* 275(11), 24798–24806. doi:10.1074/jbc.M001706200.
- Board, P.G., Menon, D., 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3267–3288. doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.019.
- Board, P.G., Menon, D., 2016. Structure, function and disease relevance of Omega-class glutathione transferases. *Arch. Toxicol.* 90, 1049–1067. doi:10.1007/s00204-016-1691-1.
- Boaru, D.A., Dragoş, N., Schirmer, K., 2006. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: A

- comparative study. *Toxicology* 218, 134–148. doi:10.1016/j.tox.2005.10.005.
- Bonilla, S., González-Piana, M., Soares, M.C.S., Huszar, V.L.M., Becker, V., Somma, A., Marinho, M.M., Kokociński, M., Dokulil, M., Antoniadis, D., Aubriot, L., 2016. The success of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in freshwaters is enhanced by the combined effects of light intensity and temperature. *J. Limnol.* 7, 606–617. doi:10.4081/jlimnol.2016.1479.
- Borowitzka, M.A., 2016. Chemically-Mediated Interactions in Microalgae BT - The Physiology of Microalgae. En: Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (Eds.), Springer International Publishing, Cham, 321–357. doi:10.1007/978-3-319-24945-2_15.
- Bowers, G.N., McComb, R.B., 1966. A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clinical Chemistry* 12(2):70–89. doi:10.1093/clinchem/12.2.70.
- Bowling, L.C., Baker, P.D., 1996. Major cyanobacterial bloom in the Barwon-Darling River, Australia, in 1991, and underlying limnological conditions. *Marine and Freshwater Research* 47, 643–657. doi:10.1071/MF9960643.
- Bricelj, V.M., Shumway, S.E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.* 6, 315–383. doi:10.1080/10641269891314294.
- Brijs, J., Hennig, G.W., Gräns, A., Dekens, E., Axelsson, M., Olsson, C., 2017. Exposure to seawater increases intestinal motility in euryhaline rainbow trout (&em>Oncorhynchus mykiss&em>). *J. Exp. Biol.* 220, 2397 LP – 2408. doi:10.1242/jeb.156000.
- Brunk, U.T., Neuzil, J., Eaton, J.W., 2001. Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep.* 6, 91–97. doi:10.1179/135100001101536094.
- Bryant, D.A., 1994. The molecular biology of cyanobacteria, advances in photosynthesis and respiration, vol. 1. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, pp. 904

- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. [30] Microsomal lipid peroxidation, en: Fleischer, S., Packer, L. (Eds.), *Biomembranes - Part C: Biological Oxidations*. Academic Press, pp. 302–310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6.
- Buratti, F.M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., Funari, E., 2017. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* 91, 1049–1130. doi:10.1007/s00204-016-1913-6.
- Buratti, F.M., Scardala, S., Funari, E., Testai, E., 2013. The conjugation of microcystin-RR by human recombinant GSTs and hepatic cytosol. *Toxicol. Lett.* 219, 231–238. doi:10.1016/j.toxlet.2013.03.015.
- Bury, N.R., Newlands, A.D., Eddy, F.B., Codd, G.A. 1998. *In vivo* and *in vitro* intestinal transport of 3H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 42, 139–148. doi:10.1016/S0166-445X(98)00041-1.
- Cai, J., Chen, Y., Seth, S., Furukawa, S., Compans, R.W., Jones, D.P., 2003. Inhibition of influenza infection by glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 928–936. doi:10.1016/S0891-5849(03)00023-6.
- Calado, S.L. de M., Santos, G.S., Vicentini, M., Bozza, D.C., Prodocimo, V., de Magalhães, V.F., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2020. Multiple biomarkers response in a Neotropical fish exposed to paralytic shellfish toxins (PSTs). *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124616.
- Calado, S.L. de M., Santos, G.S., Wojciechowski, J., Magalhães, V.F. de, Silva de Assis, H.C., 2019. The accumulation dynamics, elimination and risk assessment of paralytic shellfish toxins in fish from a water supply reservoir. *Sci. Total Environ.* 651, 3222–3229. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.046.
- Calatayud, M., Barrios, J.A., Vélez, D., Devesa, V. 2012. *In vitro* study of transporters involved in absorption of inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.* 25: 446–453. doi:10.1021/tx200491f.
- Campos, A., Vasconcelos, V. 2010. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int. J. Mol. Sci.* 11(1): 268–287. doi:10.3390/ijms11010268.

- Cao, C., Leng, Y., Kufe, D., 2003. Catalase activity is regulated by c-abl and arg in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 278, 29667–29675. doi:10.1074/jbc.M301292200.
- Cárcamo, J.G., Aguilar, M.N., Barrientos, C.A., Carreño, C.F., Quezada, C.A., Bustos, C., Manríquez, R.A., Avendaño-Herrera, R., Yañez, A.J., 2011. Effect of emamectin benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the sea lice *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture* 321, 207–215. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.09.012.
- Cárcamo, J.G., Aguilar, M.N., Barrientos, C.A., Carreño, C.F., Yañez, A.J., 2014. Emamectin benzoate treatment alters the expression and activity of CYP1A, FMO and GST in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 434, 188–200. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.08.014.
- Carlson, E., Zelikoff, J.T. 2008. The Immune System of Fish: A Target Organ of Toxicity. En: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds). *Toxicology of Fishes*. CRC Press: 489-530.
- Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445–459. doi:10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x.
- Carmichael, W.W., An, J. 1999. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Nat. Toxins* 7, 377–385. doi:10.1002/1522-7189(199911/12)7:6<377::aid-nt80>3.0.co;2-8.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau, S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109, 663-668. doi:10.1289/ehp.01109663.
- Carreto, J.I., Montoya, N.G., Benavides, H.R., Carignan, M.O., Cucchi Colleoni, A.D., Aksel Man, R., 1998. *Alexandrium tamaerense* blooms and shellfish toxicity in the Argentine Sea: a retrospective view. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T., (Eds), *Harmful microalgae*, IOC-UNESCO: 131-134.

- Cazenave, J., Bistoni, M.A., Pesce, S.F., Wunderlin, D.A., 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat Toxicol* 76:1–12. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.011.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.D.L.Á., Amé, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: A field and laboratory study. *Aquat. Toxicol.* 75, 178–190. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.002.
- Cembella, A., Quilliam, M., Lewis, N., Bauder, A., Dell'Aversano, C., Thomas, K., Jellett, J., Cusack, R., 2002. The toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the probable cause of mortality of caged salmon in Nova Scotia. *Harmful Algae* 1, 313–325. doi:10.1016/S1568-9883(02)00048-3.
- Cembella, A.D., Shumway, S.E., Larocque, R., 1994. Sequestering and putative biotransformation of paralytic seasonal and spatial scales in natural populations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 180, 1–22. doi:10.1016/0022-0981(94)90075-2.
- Chan, L.M.S., Lowes, S., Hirst, B.H., 2004. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 25–51. doi:10.1016/j.ejps.2003.07.003.
- Chen, G., Jia, Z., Wang, L., Hu, T., 2020. Effect of acute exposure of saxitoxin on development of zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Environ. Res.* 185, 109432. doi:10.1016/j.envres.2020.109432.
- Chen, J., Li, Y., Liu, F., Hou, D.X., Xu, J., Zhao, X., Yang, F., Feng, X., 2019. Prodigiosin promotes nrf2 activation to inhibit oxidative stress induced by microcystin-LR in HepG2 cells. *Toxins (Basel)* 11(7), 403. doi:10.3390/toxins11070403.
- Chen, X., Sun, Y., Huang, H., Liu, W., Hu, P., Huang, X., Zou, F., Liu, J., 2018. Uncovering the proteome response of murine neuroblastoma cells against low-dose exposure to saxitoxin. *Toxicol. Mech. Methods* 28, 335–344. doi:10.1080/15376516.2017.1411413.

- Chen, X.M., Guo, G.L., Sun, L., Yang, Q.S., Wang, G.Q., Zhang, D.M., 2017. Modulatory role of L-carnitine against microcystin-LR-induced immunotoxicity and oxidative stress in common carp. *Fish Physiol. Biochem.* 43, 1081–1093. doi:10.1007/s10695-017-0354-3.
- Chen, Y., Zeng, S.F., Cao, Y.F., 2012. Oxidative stress response in zebrafish (*Danio rerio*) gill experimentally exposed to subchronic microcystin-LR. *Environ. Monit. Assess.* 184, 6775–6787. doi:10.1007/s10661-011-2457-0.
- Chen, Z.S., Guo, Y., Belinsky, M.G., Kotova, E., Kruh, G.D., 2005. Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17--D-glucuronide, and leukotriene C₄ by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol* 67: 545–557.
- Chen, Z.S., Hopper-Borge, E., Belinsky, M.G., Shchaveleva, I, Kotova, E., Kruh, G.D. 2003. Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol Pharmacol* 63: 351–358, 2003.
- Chia, M.A., Jankowiak, J.G., Kramer, B.J., Goleski, J.A., Huang, I.-S., Zimba, P. V, do Carmo Bittencourt-Oliveira, M., Gobler, C.J., 2018. Succession and toxicity of *Microcystis* and *Anabaena (Dolichospermum)* blooms are controlled by nutrient-dependent allelopathic interactions. *Harmful Algae* 74, 67–77. doi:10.1016/j.hal.2018.03.002.
- Chisaki, I., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., Iseki, K., 2009. Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP in the liver. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788, 2396–2403. doi:10.1016/j.bbamem.2009.08.014.
- Chorus, I., Bartram, J. (Eds). 1999. Toxic cyanobacteria: a guide to their public health consequences, monitoring and management. first ed. WHO, New York: 400.
- Christensen, V.G., Khan, E., 2020. Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. *Sci. Total Environ.* 736, 139515. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139515.
- Cianca, R. C. C., Pallares, M. A., Barbosa, R. D., Adan, L. V., Martins, J. M. L., Gago-Martínez, A., 2007. Application of precolumn oxidation HPLC method with

- fluorescence detection to evaluate saxitoxin levels in discrete brain regions of rats. *Toxicol* 49, 89–99. doi:10.1016/j.toxicol.2006.09.021.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research*. CRC Press, Florida, 283–284.
- Clarke, D.J., George, S.G., Burchell, B., 1991. Glucuronidation in fish. *Aquat. Toxicol.* 20, 35–56. doi:10.1016/0166-445X(91)90040-G.
- Clemente, Z., Busato, R.H., Oliveira, C.A., Cestari, M.M., Magalha, F., Wosiack, A.C., Silva, H.C., Assis, D., Ramsdorf, W.A., 2010. Toxicol Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir 55, 396–406. doi:10.1016/j.toxicol.2009.09.003.
- Cole, S.P.C., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M.V., Deeley, R.G., 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650–1654. doi:10.1126/science.1360704.
- Cordeiro-Araújo, M.K., Bittencourt-Oliveira, M.C., 2013. Active release of microcystins controlled by an endogenous rhythm in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Phycol Res* 61, 1–6. doi:10.1111/j.1440-1835.2012.00663.x.
- Costa, J., Reis-Henriques, M.A., Wilson, J.M., Ferreira, M., 2013. P-glycoprotein and CYP1A protein expression patterns in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) tissues after waterborne exposure to benzo(a)pyrene (BaP). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 611–625. doi:10.1016/j.etap.2013.05.017.
- Costa, P.R., Lage, S., Barata, M., Pousao-Ferreira, P., 2011. Uptake, transformation, and elimination kinetics of paralytic shellfish toxins in white seabream (*Diplodus sargus*). *Mar. Biol.* 158, 2805–2811. doi:10.1007/s00227-011-1779-3.
- Costa, P.R., Pereira, P., Guilherme, S., Barata, M., Nicolau, L., Santos, M.A., Pacheco, M., Pousão-Ferreira, P., 2012a. Biotransformation modulation and genotoxicity in white seabream upon exposure to paralytic shellfish toxins produced by *Gymnodinium catenatum*. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 42–47. doi:10.1016/j.aquatox.2011.08.023.

- Costa, P.R., Pereira, P., Guilherme, S., Barata, M., Santos, M.A., Pacheco, M., Pousão-Ferreira, P., 2012b. Hydroxybenzoate paralytic shellfish toxins induce transient GST activity depletion and chromosomal damage in white seabream (*Diplodus sargus*). *Mar. Environ. Res.* 79, 63–69. doi:10.1016/j.marenvres.2012.05.004.
- Coughtrie, M.W., Fisher, M.B., 2003. The role of sulfotransferases (SULTs) and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in human drug clearance and bioactivation. In: Lee, J.S., Obach, R.S., Fisher, M.B. (Eds.), *Drug Metabolizing Enzymes*. New York: Marcel Dekker, 541–575.
- Cruz-Garcia, L., Minghetti, M., Navarro, I., Tocher, D.R., 2009. Molecular cloning, tissue expression and regulation of liver X Receptor (LXR) transcription factors of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.cbpb.2009.02.001.
- Cui, H., Gu, X., Chen, J., Xie, Y., Ke, S., Wu, J., Golovko, A., Morpurgo, B., Yan, C., Phillips, T.D., Xie, W., Luo, J., Zhou, Z., Tian, Y., 2017. Pregnane X receptor regulates the AhR/Cyp1A1 pathway and protects liver cells from benzo-[α]-pyrene-induced DNA damage. *Toxicol. Lett.* 275, 67–76. doi:10.1016/j.toxlet.2017.03.028.
- Cusick, K.D., Sayler, G.S., 2013. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: Genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Mar. Drugs* 11, 991–1018. doi:10.3390/md11040991.
- Dano, K., 1972. Cross resistance between vinca alkaloids and anthracyclines in Ehrlich ascites tumor *in vivo*. *Cancer Chemother. Rep.* 56, 701–708.
- Dano, K., 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 323, 466–483.
- Dantas, Ê.W., Moura, A.N., Bittencourt-Oliveira, M. do C., 2011. Cyanobacterial blooms in stratified and destratified eutrophic reservoirs in semi-arid region of Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 83, 1327–1338. doi:10.1590/s0001-37652011000400019.

- Dayeh, V.R., Bols, N.C., Schirmer, K., Lee, L.E.J., 2003. The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants. *Curr. Protoc. Toxicol.* 15, 1–7. doi:10.1002/0471140856.tx0105s15.
- Dean, M., Annilo, T., 2005. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6, 123–142. doi:10.1146/annurev.genom.6.080604.162122.
- Deeds, J.R., Landsberg, J.H., Etheridge, S.M., Pitcher, G.C., 2008. Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning, 308–348. doi:10.3390/md20080015.
- Deeley, R.G., Westlake, C., Cole, S.P.C., 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-Binding Cassette Multidrug Resistance Proteins. *Physiol. Rev.* 86, 849–899. doi:10.1152/physrev.00035.2005.
- Denison, M.S., Soshilov, A.A., He, G., DeGroot, D.E., Zhao, B., 2011. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicological sciences*, 124(1), 1-22. doi:10.1093/toxsci/kfr218.
- Denver, R.J., Hopkins, P.M., McCormick, S.D., Propper, C.R., Riddiford, L., Sower, S.A., Wingfield, J.C., 2009. Comparative endocrinology in the 21st century. *Integr. Comp. Biol.* 49, 339–348. doi:10.1093/icb/icp082.
- Deponte, M., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3217–3266. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
- Dettbarn, W.D., 1971. Mechanism of Action of Tetrodotoxin (TTX) and Saxitoxin (STX). En: Simpson, L.L. (Ed.), *Neuropoisons*. Springer, Boston, MA. doi:10.1007/978-1-4684-2940-4_8.
- Deus, C.M., Yambire, K.F., Oliveira, P.J., Raimundo, N., 2020. Mitochondria–Lysosome Crosstalk: From Physiology to Neurodegeneration. *Trends Mol. Med.* 26, 71–88. doi:10.1016/j.molmed.2019.10.009.
- Dias, E., Andrade, M., Alverca, E., Pereira, P., Batoréu, M.C.C., Jordan, P., Silva, M.J., 2009. Comparative study of the cytotoxic effect of microcistin-LR and

- purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicol.* 53, 487–495. doi:10.1016/j.toxicol.2009.01.029.
- Ding, W., Ni, H.M., Gao, W., Hou, Y.F., Melan, M.A., Chen, X., Stolz, D.B., Shao, Z.M., Yin, X.M., 2007. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J. Biol. Chem.* 282 (7), 4702–4710. doi:10.1074/jbc.M609267200.
- Ding, W.X., 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* 32, 547–555. doi:10.1053/jhep.2000.16183.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Shen, Y., Zhu, H.G., Ong, C.N., 1998. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 106, 409–413. doi:10.2307/3434068.
- Doyle LA and Ross DD. 2003. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22: 7340–7358. doi:10.1038/sj.onc.1206938.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D.A., 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(26), 15665–15670. doi:10.1073/pnas.95.26.15665.
- Dutton, G.J., 1990. *Glucuronidation of Drugs and Other Compounds*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Echenique, R., Aguilera, A., 2009. Floraciones de Cyanobacteria tóxicas en la república Argentina: antecedentes. En: Gianuzzi, L. (Ed.). *Cianobacterias y Cianotoxinas. Identificación, Toxicología, Monitoreo y Evaluación de Riesgo*. Instituto Correntino del Agua y Administración de Obras Sanitarias de Corrientes. Moglia S.R.L., Corrientes, Argentina. p. 53-65.
- Echenique, R.O., Aguilera, A., Gianuzzi, L., 2014. Problems on drinking water related to toxigenic cyanobacteria: some cases studied in Argentina. *Adv. Limnol.* 65, 431–444. doi:10.1127/1612-166X/2014/0065-0055.

- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives Biochem. Biophys.* 82, 70–77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6.
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., MacManus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T., 2008. Efflux transporters: Newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3914–3920. doi:10.1021/es087187v.
- Eriksson, J.E., Grönberg, L., Nygård, S., Slotte, J.P., Meriluoto, J.A.O., 1990. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *BBA - Biomembr.* 1025, 60–66. doi:10.1016/0005-2736(90)90190-Y.
- Eriksson, J.E., Meriluoto, J.A.O., Lindholm, T., 1989. Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Hydrobiologia* 183, 211–216.
- Eriksson, J.E., Toivola, E., Meriluoto, J.A.O., Karaki, H., Han, Y.G., Hartshorne, D. 1990. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (3), 1347-53. doi:10.1016/S0006-291X(05)80936-2.
- Eroglu A., Dogan, Z., Kanak, E. G., Atli, G., Canli, M., 2015. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. *Environ Sci Pollut Res* .22, 3229-3237. doi:10.1007/s11356-014-2972.
- Espinoza, H.M., Williams, C.R., Gallagher, E.P., 2012. Effect of cadmium on Glutathione-S-transferase and metallothionein gene expression in coho salmon liver, gill and olfactory tissues. *Aquat. Toxicol.* 110–111, 37–44. doi:10.1016/j.aquatox.2011.12.012.Effect.
- Esterhuizen-Londt, M., von Schnehen, M., Kühn, S., Pflugmacher, S., 2016. Oxidative stress responses in the animal model, *Daphnia pulex* exposed to a natural bloom extract versus artificial cyanotoxin mixtures. *Aquat. Toxicol.* 179, 151–157. doi:10.1016/j.aquatox.2016.09.003.
- Etheridge, S.M., 2010. Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives. *Toxicon* 56, 108–122. doi:10.1016/j.toxicon.2009.12.013.

- Ettoumi, A., El Khalloufi, F.E., El Ghazali, I.E., Oudra, B., Amrani, A., Nasri, H., Bouaïcha, N., 2011. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health, Zooplankton and Phytoplankton: Types, Characteristics and Ecology. doi:10.13140/2.1.1959.5044.
- Evers, R., Kool, M., Smith, A.J., van Deemter, L., de Haas, M., Borst, P., 2000. Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-MRP1 and MRP2-mediated transport. *Cancer Res. Campaign.* 83(3): 366–374. doi:10.1054/bjoc.2000.1260.
- Evers, R., Kool, M., van Deemter, L., Janssen, H., Calafat J., Oomen, L.C., Paulusma, C.C., Oude Elferink, R.P., Baas, F., Schinkel, A.H., Borst, P., 1998. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J. Clin. Invest.* 101: 1310–1319. doi:10.1172/JCI119886.
- Falconer, I.R., 2008. Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 619, 607–612. doi:10.1007/978-0-387-75865-7_27.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2005. Health risk assessment of cyanobacterial (bluegreen algal) toxins in drinking water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2, 43–50. doi:10.3390/ijerph2005010043.
- Fan, J., Maeng, H. J., Du, Y., Kwan, D., & Pang, K. S., 2011. Transport of 5, 5-diphenylbarbituric acid and its precursors and their effect on P-gp, MRP2 and CYP3A4 in Caco-2 and LS180 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1-2), 19-29. doi:10.1016/j.ejps.2010.10.001.
- FAO, 2005. Biotoxinas marinas. Dirección de Alimentación y Nutrición, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- FAO/WHO, 2016. Technical paper on toxicity equivalency factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs.

- Fay, P., Van Baalen, C., 1987. The Cyanobacteria: a comprehensive review. Amsterdam, The Netherlands. Elsevier Science Publishers B.V.; New York, NY, USA:
- Ferguson, A, Reed, T.E., Cross, T.F., McGinnity, P., Prodöhl, P.A., 2019. Anadromy, potamodromy and residency in brown trout *Salmo trutta*: the role of genes and the environment. J Fish Biol. 2019 Sep;95(3), 692-718. doi:10.1111/jfb.14005.
- Ferrão-Filho, A.S., Costa, S.M., Ribeiro, M.G.L., Azevedo, S.M.F.O., 2008. Effects of a axitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. Environ. Toxicol., 23, 161–168. doi: 10.1002/tox.20320.
- Ferrão-Filho, A.S., de Abreu S. Silva, D., de Oliveira, T.A., de Magalhães, V.F., Pflugmacher, S., da Silva, E.M., 2017. Single and combined effects of microcystin -and saxitoxin- producing cyanobacteria on the fitness and antioxidant defenses of cladocerans. Environ Toxicol Chem, 36, 2689-2697. doi:10.1002/etc.3819.
- Ferrão-Filho, A.S., Kozłowski-Suzuki, B., 2011, Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. Mar. Drugs 9, 2729–2772. doi:10.3390/md9122729.
- Ferreira, M., Costa, J., Reis-Henriques, M.A. 2014. ABC transporters in fish species: a review. Fr. Physiol. 5 (266), 1-12. doi:10.3389/fphys.2014.00266
- Ferreira, M., Lago, J., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2008. World production of bivalve mollusks and socioeconomic facts related to the impact of marine biotoxins. En: Botana, L.M. Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection, Second Edition- Food Science and Technology (CRC Press).
- Ferreira, M.F.N., Oliveira, V.M., Oliveira, R., Vieira da Cunha, P., Grisolia, C.K., Pires Junior, O.R., 2010. Histopathological effects of [d-Leu(1)]Microcystin-LR variants on liver, skeletal muscle and intestinal tract of *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844). Toxicon 55: 1255–62. doi:10.1016/j.toxicon.2010.01.016.

- Feurstein, D., Holst, K., Fischer, A., Dietrich, D.R., 2009. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 247–255. doi:10.1016/j.taap.2008.10.011
- Feurstein, D., Kleinteich, J., Heussner, A.H., Stemmer, K., Dietrich, D.R., 2010. Investigation of microcystin congener-dependent uptake into primary murine neurons. *Environ. Health Perspect.* 118, 1370–1375. doi:10.1289/ehp.0901289.
- Fischer, S., Klüver, N., Burkhardt-Medicke, K., Pietsch, M., Schmidt, A.M., Wellner, P., Schirmer, K., Luckenbach, T., 2013. Abcb4 acts as multixenobiotic transporter and active barrier against chemical uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *BMC Biol.* 11, 69. doi:10.1186/1741-7007-11-69.
- Fischer, S., Loncar, J., Zaja, R., Schnell, S., Schirmer, K., Smital, T., Luckenbach, T., 2011. Constitutive mRNA expression and protein activity levels of nine ABC efflux transporters in seven permanent cell lines derived from different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 101, 438–446. doi:10.1016/j.aquatox.2010.11.010.
- Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, .R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 257–263. doi:10.1016/j.taap.2004.08.012.
- Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 257–263. doi:10.1016/j.taap.2004.08.012.
- Flewelling, L.J., Naar, J.P., Abbott, J.P., Baden, D.G., Barros, N.B., Bossart, G.D., Bottein, M.Y., Hammond, D.G., Haubold, E.M., Heil, C.A., Henry, M.S., Jacocks, H.M., Leighfield, T.A., Pierce, R.H., Pitchford, T.D., Rommel, S.A., Scott, P.S., Steidinger, K.A., Truby, E.W., Van Dolah, F.M., Landsberg, J.H., 2005. Brevetoxicosis: red tides and marine mammal mortalities. *Nature* 435, 755–756. doi:10.1038/nature435755a.

- Flik, G., Schoenmakers, T.J.M., Groot, J.A., van Os, C.H., Wendelaar Bonga, S.E., 1990. Calcium absorption by fish intestine: The involvement of ATP-and sodium-dependent calcium extrusion mechanisms. *J. Membr. Biol.* 113, 13–22. doi:10.1007/BF01869601.
- Folmar, L.C., Dickhoff, W.W., 1980 The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptations in salmonids. *Aquaculture* 21, 1–37. doi:10.1016/0044-8486(80)90123-4.
- Fonseca, J.R., Vieira, P.C.S., Kujbida, P., Costa, I.A.S., 2015. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystins and saxitoxins in reservoirs of the Brazilian semi-arid. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 27(1), 78-92. doi:10.1590/S2179-975X2814.
- Fontagné-dicharry, S., Lataillade, E., Surget, A., Larroquet, L., Cluzeaud, M., Kaushik, S., 2014. Antioxidant defense system is altered by dietary oxidized lipid in first-feeding rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 424–425, 220–227. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.01.009.
- Forastier, M.E., Zalocar, Y., Andrinolo, D., Domitrovic, H., 2016. Occurrence and toxicity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in the Paraná River, downstream of the Yacyretá dam (Argentina). *Revista de Biología Tropical* 64, 219–227. doi:10.15517/rbt.v64i1.8993.
- Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A., 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 30, 1–12. doi:10.1016/j.mam.2008.08.006.
- Franke, F., Armitage, S.A.O., Kutzer, M.A.M., Kurtz, J., Scharsack, J.P., 2017. Environmental temperature variation influences fitness trade-offs and tolerance in a fish-tapeworm association. *Parasit. Vectors* 10. doi:10.1186/s13071-017-2192-7.
- Funari, E., Testai, E., 2008. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 97–125. doi:10.1080/10408440701749454.
- Gaete, V., Canelo, E., Lagos, N., Zambrano, F., 1994. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxin on ion pumps of the gill of freshwater fish. *Toxicon* 32, 121–127. doi:10.1016/0041-0101(94)90028-0.

- Galanti, L.N., Amé, M.V., Wunderlin, D.A., 2013. Accumulation and detoxification dynamic of cyanotoxins in the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus*. *Harmful Algae* 27, 88–97. doi:10.1016/j.hal.2013.05.007.
- Galvão, J.A., Oetterer, M., Bittencourt-Oliveira, M.C., Gouvêa-Barros, S., Hiller, S., Erler, K., Luckas, B., Pinto, E., Kujbida, P., 2009. Saxitoxins accumulation by freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption. *Toxicon* 54, 891–894. doi:10.1016/j.toxicon.2009.06.021.
- Gan, N., Sun, X., Song, L., 2010. Activation of Nrf2 by microcystin-LR provides advantages for liver cancer cell growth. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 1477–1484. doi:10.1021/tx1001628.
- Gao, W., Kanahara, Y., Yamada, M., Tatsuno, R., Yoshikawa, H., Doi, H., Takatani, T., Arakawa, O., 2019. Contrasting toxin selectivity between the marine pufferfish *Takifugu pardalis* and the freshwater pufferfish *Pao suvattii*. *Toxins* 11(470), 1–11. doi:10.3390/toxins11080470.
- García, C., Barriga, A., Díaz, J.C., Lagos, M., Lagos, N., 2010. Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicon* 55, 135–144. doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.018.
- García, C., Bravo, M. del C., Lagos, M., Lagos, N., 2004. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon* 43, 149–158. doi:10.1016/j.toxicon.2003.11.018.
- García, C., Rodríguez-Navarro, A., Díaz, J.C., Torres, R., Lagos, N., 2009. Evidence of *in vitro* glucuronidation and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins by healthy human liver microsomes fraction. *Toxicon* 53, 206–213. doi:10.1016/j.toxicon.2008.10.028.
- Garg, P., Dhakne, R., Belekar, V., 2015. Role of breast cancer resistance protein (BCRP) as active efflux transporter on blood-brain barrier (BBB) permeability. *Mol. Divers.* 19, 163–172. doi:10.1007/s11030-014-9562-2.
- Gehring, M.M., 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett.* 557, 1–8. doi:10.1016/S0014-5793(03)01447-9.

- George, S.G., Leaver, M.J., Wright, J., Structural studies of a UDP-glucuronosyltransferase gene from the plaice (*Pleuronectes platessa*), Mar. Environ. Res., 46, 33, 1998. doi:10.1016/S0141-1136(97)00053-6.
- Gessner, B.D., Bell, P., Doucette, G.J., Moczydlowski, E., Poli, M.A., Van Dolah, F., Hall, S., 1997. Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. Toxicon 35, 711–722. doi:10.1016/S0041-0101(96)00154-7.
- Giannuzzi, L., Carvajal, G., Corradini, M.G., Araujo Andrade, C., Echenique, R., Andrinolo, D., 2012. Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in Rio de la Plata estuary, Argentina: field study and data analysis. J. Toxicol 2012. doi:10.1155/2012/373618.
- Glickman, A.H., Weitman, S.D., Lech, J.J., 1982. Differential toxicity of transpermethrin in rainbow trout and mice. I. Role of biotransformation, Toxicol. Appl. Pharmacol., 66, 153. doi:10.1016/0041-008X(82)90280-0
- Goldberg, J., Huang, H. Bin, Kwon, Y.G., Greengard, P., Nairn, A.C., Kuriyan, J., 1995. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. Nature. doi:10.1038/376745a0.
- Gordon, C.J., 2003. Role of environmental stress in the physiological response to chemical toxicants. Environ. Res. 92, 1–7. doi:10.1016/S0013-9351(02)00008-7.
- Gornicka, A., 2012. Adipocyte hypertrophy is associated with lysosomal permeability both *in vivo* and *in vitro*: role in adipose tissue inflammation. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 303(5), E597–E606. doi:10.1152/ajpendo.00022.2012.
- Gotoh, Y., Suzuki, H., Setsuo, K., Hirohashi, T., Kato, Y., Sugiyama, Y., 2000. Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 292(1), 433–439.

- Gottesman, M.M., Pastan, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.002125.
- Gregus, Z., Gyurasics, A. 2000. Role of glutathione in the biliary excretion of arsenical drugs trimelarsan and melarsoprol. *Biochem Pharmacol* 59(11), 1375-1385. doi:10.1016/S0006-2952(00)00263-X.
- Griffith, M.B., 2017. Toxicological perspective on the osmoregulation and ionoregulation physiology of major ions by freshwater animals: Teleost fish, crustacea, aquatic insects, and Mollusca. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 576–600. doi:10.1002/etc.3676.
- Grolleau, F., Gamelin, L., Boisdron-Celle, M., Lapied, B., Pelhate, M., Gamelin, E., 2001. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J. Neurophysiol.* 85, 2293–2297. doi:10.1152/jn.2001.85.5.2293.
- Grosell, M. 2010. The role of the gastrointestinal tract in salt and water balance. Grosell, M., Farrel, A.P., Brauner, C.J. (Eds), *The multifunctional gut of fish.* Elsevier, London, 448p.
- Groot, C., Margolis, L. (Eds), 1991. *Pacific Salmon Life Histories.* UBC Press, Vancouver, BC.
- Gu, X., Manautou, J.E., 2010. Regulation of hepatic ABCC transporters by xenobiotics and in disease states. *Drug Metab. Rev.* 42, 482–538. doi:10.3109/03602531003654915.
- Guarrera SA, Echenique RO. 1981. Cyanophyta, Hormogonophycydeae. En: Guarrera SA, Gamundi De Amos I, Matteri CM, editores. *Flora criptogámica de Tierra Del Fuego, tomo 1 (2).* Buenos Aires.
- Guarrera, S.A., Echenique, R.O., Casco, M., Labollita, H., 1995. Las algas del sistema del Río Limay (R. Argentina) I-Cyanophyta; 2-Hormogonales. *Rev. Mus. La Plata* XIV, 269–305.
- Gubbins, M.J., Eddy, F.B., Gallacher, S., Stagg, R.M., 2000. Paralytic shellfish poisoning toxins induce xenobiotic metabolising enzymes in Atlantic

- salmon (*Salmo salar*). Mar. Environ. Res. 50, 479–483. doi:10.1016/s0141-1136(00)00095-7.
- Guéguen, M., Baron, R., Bardouil, M., Truquet, P., Haberkorn, H., Lassus, P., Barillé, L., Amzil, Z., 2011. Modelling of paralytic shellfish toxin biotransformations in the course of *Crassostrea gigas* detoxification kinetics. Ecol. Modell. 222, 3394–3402. doi:10.1016/j.ecolmodel.2011.07.007.
- Guengerich, F.P., McCormick, W.A., Wheeler, J.B., 2003. Analysis of the Kinetic Mechanism of Haloalkane Conjugation by Mammalian θ -Class Glutathione Transferases. Chem. Res. Toxicol. 16, 1493–1499, doi:10.1021/tx034157r.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130–7140.
- Hagenbuch, B., Meier, P.J., 1994. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. J. Clin. Invest. 93, 1326–31. doi:10.1172/JCI117091.
- Halwachs, S., Wassermann, L., & Honscha, W., 2014. A novel MDCKII *in vitro* model for assessing ABCG2-drug interactions and regulation of ABCG2 transport activity in the caprine mammary gland by environmental pollutants and pesticides. Toxicology *In vitro*, 28(3), 432-441. doi:10.1016/j.tiv.2013.12.015.
- Hardwick, J.P., Eckman, K., Lee, Y.K., Abdelmegeed, M.A., Esterle, A., Chilian, W.M., Chiang, J.Y., Song, B.J., 2013. Eicosanoids in Metabolic Syndrome, Advances in Pharmacology. doi:10.1016/B978-0-12-404717-4.00005-6.
- Hariparsad, N., Chu, X., Yabut, J., Labhart, P., Hartley, D.P., Dai, X., Evers, R., 2009. Identification of pregnane-x-receptor target genes and coactivator and corepressor binding to promoter elements in human hepatocytes. Nucl Acid Res.; 37(4), 1160–1173. doi:10.1093/nar/gkn1047.
- Hayashi, A., Suzuki, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Sugiyama, Y., 2003. Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein1 in mouse embryo fibroblasts.

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 310, 824–829.
doi:10.1016/j.bbrc.2003.09.086.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2004. Glutathione transferases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 51–88.
doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
- Hayeshi, R., Chinyanga, F., Chenedza, S., Mukanganyama, S., 2006. Inhibition of human glutathione transferases by multidrug resistance chemomodulators in vitro. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 21, 581–587.
doi:10.1080/14756360600756105.
- He, S., Liang, X, Sun, J., Shen, Dan., 2013. Induction of liver GST transcriptions by tert-butylhydroquinone reduced microcystin-LR accumulation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Ecotoxicology and Environmental Safety 90, 128-135. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.12.021.
- Hegedüs, C., Telbisz, Á., Hegedus, T., Sarkadi, B., Özvegy-Laczka, C., 2015. Lipid regulation of the ABCB1 and ABCG2 multidrug transporters. Adv. Cancer Res. 125, 97–137. doi:10.1016/bs.acr.2014.10.004.
- Henderson, R., Ritchie, J. M., & Strichartz, G. R. 1973. The binding of labelled saxitoxin to the sodium channels in nerve membranes. The Journal of physiology, 235(3), 783–804. doi:10.1113/jphysiol.1973.sp010417.
- Herrera, N.A., Echeverri, L.F., Ferrão-Filho, A.S., 2015. Effects of phytoplankton extracts containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans. Toxicol 95, 38–45.
doi:10.1016/j.toxicol.2014.12.016.
- Hesketh, G.G., Wartosch, L., Davis, L.J., Bright, N A., Luzio, J.P., 2018. The lysosome and intracellular signalling. Prog. Mol. Subcell. Biol. 57, 151–180.
doi:10.1007/978-3-319-96704-2_6.
- Hoeger SJ, Hitzfeld BC, Dietrich DR. 2005. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. Toxicol Appl Pharmacol.;203:231-42.

- Hong, H., Lam, P.K.S., Hsieh, D.P.H., 2003. Interactions of paralytic shellfish toxins with xenobiotic-metabolizing and antioxidant enzymes in rodents. *Toxicol* 42(4), 425-431. doi:10.1016/S0041-0101(03)00175-2.
- Hoppe, H.-G. 1981: Blue-green algae agglomeration in surface water: a microbiotope of high bacterial activity. *Kieler Meeresforschungen*, nr. Sonderheft 5, 291-303.
- Huang, H., Liu, C., Fu, X., Zhang, S., Xin, Y., Li, Y., Xue, L., Cheng, X., Zhang, H., 2016. Microcystin-LR induced apoptosis in rat sertoli cells via the mitochondrial caspase-dependent pathway: Role of reactive oxygen species. *Front. Physiol.* 7, 1–10. doi:10.3389/fphys.2016.00397.
- Huang, H.C., Nguyen, T., Pickett, C.B., 2000. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12475–12480. doi:10.1073/pnas.220418997
- Huang, H.C., Nguyen, T., Pickett, C.B., 2002. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 42769–42774. doi:10.1074/jbc.M206911200
- Hubatsch, I., Ridderstrom M., and Mannervik, B., Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation, *Biochem. J.* 330, 175, 1998. doi:10.1042/bj3300175.
- Huber, V., Wagner, C., Gerten, D., Adrian, R., 2012. To bloom or not to bloom: contrasting responses of cyanobacteria to recent heat waves explained by critical thresholds of abiotic drivers. *Oecologia* 169, 245–256. doi:10.1007/s00442-011-2186-7.
- Ibbotson, K., Yell, J., Ronaldson, P.T., 2017. Nrf2 signaling increases expression of ATP-binding cassette subfamily C mRNA transcripts at the blood-brain barrier following hypoxia-reoxygenation stress. *Fluids Barriers CNS* 14, 1–10. doi:10.1186/s12987-017-0055-4.

- Ibelings, B.W., Bruning, K., de Jonge, J., Wolfstein, K., Dionisio Pires, L.M., Postma, J., Burger, T., 2005. Distribution of microcystins in a Lake food-web: no evidence for biomagnification. *Microb. Ecol.* 49, 487–500. doi:10.1007/s00248-004-0014-x.
- Ibelings, B.W., Chorus, I., 2007. Accumulation of Cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. *Environ. Pollut.* 150, 177–192. doi:10.1016/j.envpol.2007.04.012.
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 54, 287–293. doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001.
- Ihunna, C.A., Jiang, M., Xie, W., 2011. Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(8), 956-963. doi:10.1016/j.bbadis.2011.01.014.
- Ishikawa, T., 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* 17, 463–468. doi:10.1016/0968-0004(92)90489-V.
- Ito, E., Takai, A., Kondo, F., Masui, H., Imanishi, S., Harada, K., 2002. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 40(7), 1017–1025. doi:10.1016/S0041-0101(02)00099-5.
- Iummato, M., Hualde, P., Castro, J.M., Luquet, C., 2018. Determinación de parámetros de calidad de agua en los distintos piletos y en la descarga de la planta de tratamiento de efluentes, Junin de los Andes.
- Jacquín, L., Gandar, A., Aguirre-Smith, M., Perrault, A., Hénaff, M. Le, Jong, L. De, Paris-Palacios, S., Laffaille, P., Jean, S., 2019. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 255–264. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.01.085.
- Jaishy, B., Abel, E.D., 2016. Lipids, lysosomes, and autophagy. *J. Lipid. Res.* 57, 1619–1635. doi:10.1194/jlr.R067520.

- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson A., Persson, B., 1999. Common structural features of MAPEG: a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism, *Protein Sci.* 8, 689–692. doi:10.1110/ps.8.3.689.
- James, M.O., Cherie, S.H., Hawkins, W.E., 1988. Effect of 3-methylcholanthrene on mono-oxygenase, epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase activities in small estuarine and freshwater fish 12, 1–15. doi:10.1016/0166-445X(88)90015-X.
- Jeddi, F., Soozangar, N., Sadeghi, M.R., Somi, M.H., Shirmohamadi, M., Eftekharsadat, A.T., Samadi, N., 2018. Nrf2 overexpression is associated with P-glycoprotein upregulation in gastric cancer. *Biomed. Pharmacother.* 97, 286–292. doi:10.1016/j.biopha.2017.10.129.
- Jeppesen, E., Søndergaard, M., Meerhoff, M., Lauridsen, T.L., Jensen, J.P., 2007. Shallow lake restoration by nutrient loading reduction—some recent findings and challenges ahead. *Hydrobiologia* 584, 239–252. doi:10.1007/s10750-007-0596-7.
- Jia, Z., 1997. Protein phosphatases: Structures and implications. *Biochem. Cell Biol.* 75, 17–26. doi:10.1139/o97-022.
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ Toxicol Chem* 24, 2701–2713. doi:10.1897/04-431r.1.
- Jos, Á., Cameán, A.M., Akcaalan, R., Albay, M., 2017. The Effect of Cyanobacteria and Their Toxins on Fish. En: Berillis, P. (Ed), *Trends in Fisheries and Aquatic Animal Health*. Bentham Science Publishers, 182-226. doi:10.2174/9781681085807117010011.
- Jos, Á., Pichardo, S., Prieto, A.I., Repetto, G., Vázquez, C.M., Moreno, I., Cameán, A.M., 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 72, 261–271. doi:10.1016/j.aquatox.2005.01.003.

- Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2012. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3145–3175. doi:10.3390/ijms13033145.
- Juliano, R.L. Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455(1), 152–162. doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7.
- Kala, S.V., Neely, M.W., Kala, G., Prater, C.I., Atwood, D.W., Rice, J.S., Lieberman, M.W. 2000. The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *The Journal of biological chemistry*, 275(43), 33404-33408. doi:10.1074/jbc.M007030200.
- Kamalam, B.S., Rajesh, M., Kaushik, S., 2020. Nutrition and Feeding of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). En: Ninawe, A.S., Dhanze, J.R., Dhanze, R., Indulkar, S.T. (Eds.), *Fish Nutrition and Its Relevance to Human Health*. 299–332. doi:10.1201/9781003107583-12.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H., Levonen, A., 2013. Redox Biology The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45–49. doi:10.1016/j.redox.2012.10.001.
- Kellmann, R., Ploux, O., Neilan, B.A., 2013. Neurotoxic alkaloids from cyanobacteria. En: Ramawat, K.G., Merillon, J.-M. (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Springer Berlin Heidelberg, p. 4285. doi:10.1007/978-3-642-22144-6.
- Kendall, N.W., McMillan, J.R., Sloat, M.R., Buehrens, T.W., Quinn, T.P., Pess, G.R., Kuzishchin, K. V., McClure, M.M., Zabel, R.W., 2015. Anadromy and residency in steelhead and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A review of the Processes and Patterns. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 72, 319–342. doi:10.1139/cjfas-2014-0192.
- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldán, Á., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., Edwards, P.A., 2005. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation, *Cell Metab.* 1, 121–131. doi:10.1016/j.cmet.2005.01.002.

- Kim, J.H., Raisuddin, S., Rhee, J.S., Lee, Y.M., Han, K.N., Lee, J.S., 2009. Molecular cloning, phylogenetic analysis and expression of a MAPEG superfamily gene from the pufferfish *Takifugu obscurus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 358–362. doi:10.1016/j.cbpc.2008.09.003.
- Kim, Y., Huang, J., Cohen, P., Matthews, H.R., 1993. Protein phosphatases 1, 2A, and 2C are protein histidine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 268, 18513–18518.
- Kimberly DA, Salice CJ. 2014. Complex interactions between climate change and toxicants: evidence that temperature variability increases sensitivity to cadmium. *Ecotoxicology* 3(5), 809-817. doi:10.1007/s10646-014-1221-y.
- Klaassen, C.D., Aleksunes, L.M., 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* 62(1), 1-96. doi:10.1124/pr.109.002014.
- Kleinow, K.M., Doi, A.M., Smith, A.A., 2000. Distribution and inducibility of P-glycoprotein in the catfish: immunohistochemical detection using the mammalian C-219 monoclonal. *Mar. Environ. Res.*, 50, 313–317. doi:10.1016/S0141-1136(00)00116-1.
- Kleinow, K.M., Nichols, J.W., Hayton, W.L., McKim, J.M., Barron, M.G. 2008. Toxicokinetics in Fishes. En: Di Giulio, R. T., Hinton, D. E. (Eds.). *Toxicology of Fishes*. CRC Press: 55-152. doi:10.1201/9780203647295.ch3.
- Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y., Yamamoto, M., 2009. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Molecular and cellular biology*, 29(2), 493–502. doi:10.1128/MCB.01080-08.
- Kodama, S., Negishi, M., 2013. PXR cross-talks with internal and external signals in physiological and pathophysiological responses. *Drug Metab. Rev.* 45, 300–310. doi:10.3109/03602532.2013.795585.
- Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Okumura, M., Ishikawa, N., Harada, K. ichi, Matsuura, K., Murata, H., Suzuki, M., 1992. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 591–596. doi:10.1021/tx00029a002.

- Konishi, T., Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M., Tamura, Y., 2005. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream, *Pagrus major*, *Biochem. J.*, 388, 299–307. doi:10.1042/BJ20041578.
- Kotak, B.G., Semalulu, S., Fritz, D.L., Prepas, E.E., Hrudey, S.E., Coppock, R.W., 1996. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 34, 517–525. doi:10.1016/0041-0101(96)00009-8.
- Kumagai, Y., Sumi, D., 2007. Arsenic: signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 243–62. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105144.
- Kurelec, B., 1997. A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance. *Environ. Health Perspect.* 105, 855–860. doi:10.1289/ehp.97105s4855.
- Kurz, T., Eaton, J.W., Brunk, U.T., 2011. The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1686–1697. doi:10.1016/j.biocel.2011.08.016.
- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., Brunk, U.T., 2008. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1780, 1291–1303. doi:10.1016/j.bbagen.2008.01.009.
- Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T.W., 2002. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the Nrf2 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2883–2892. doi:10.1128/mcb.22.9.2883-2892.2002.
- Kwak, M.-K., Wakabayashi, N., Kensler, T.W., 2004. Chemoprevention through the Keap1–Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 555, 133–148. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.041.
- Kwong, R.W.M., Niyogi, S., 2012. Cadmium transport in isolated enterocytes of freshwater rainbow trout: Interactions with zinc and iron, effects of complexation with cysteine, and an ATPase-coupled efflux. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 155, 238–246. doi:10.1016/j.cbpc.2011.09.001.

- Kwong, R.W.M., Wang, W., Lam, P.K.S., Yu, P.K.N., 2006. The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates. *Aquat. Toxicol.* 80, 82–91. doi:10.1016/j.aquatox.2006.07.016.
- Ladner, J.E., Parsons, J.F., Rife, C.L., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., 2003. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1, *Biochemistry* 43, 352–361. doi:10.1021/bi035832z.
- Lagos, N., 2003. Paralytic shellfish poisoning phycotoxins: Occurrence in South America. *Comments Toxicol.* 9, 175–193. doi:10.1080/08865140390215053.
- Lahti, M., Brozinski, J.-M., Jylha, A., Kronberg, L., Oikari, A., 2011. Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1403–1411. doi:10.1002/etc.501.
- Lance, E., Arnich, N., Maignien, T., Biré, R., 2018. Occurrence of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers in aquatic environments and aquatic food sources for humans. *Toxins (Basel)* 10, 1–23. doi:10.3390/toxins10020083.
- Landsberg, J.H., 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.* 10, 113–390. doi:10.1080/20026491051695.
- La-Salette, R., Oliveira, M.M., Palmeira, C.A., Almeida, J., Peixoto, F.P., 2008. Mitochondria a key role in microcystin-LR kidney intoxication. *J. Appl. Toxicol.* 28, 55–62. doi:10.1002/jat.1251.
- Lawrence, R.E., Zoncu, R., 2019. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nat. Cell. Biol.* 21, 133–142. doi:10.1038/s41556-018-0244-7.
- Lee, H.J., Pyo, M.C., Shin, H.S., Ryu, D., Lee, K.W., 2018. Renal toxicity through AhR, PXR, and Nrf2 signaling pathway activation of ochratoxin A-induced oxidative stress in kidney cells. *Food Chem. Toxicol.* 122, 59–68. doi:10.1016/j.fct.2018.10.004.

- Lefebvre, K.A., Trainer, V.L., Scholz, N.L., 2004. Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin, *Aquat. Toxicol.* 66, 159-170. doi:10.1016/j.aquatox.2003.08.006.
- Lehmann, J.M., McKee, D.D., Watson, M.A., Willson, T.M., Moore, J.T., Kliewer, S.A., 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 102(5), 1016–1023. doi:10.1172/JCI3703.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 216–237. doi:10.1016/j.taap.2004.10.012.
- Li, G., Xie, P., Li, H., Hao, L., Xiong, Q., Qiu, T., Li, Y., 2009. Acute effects of microcystins on the transcription of 14 glutathione S-transferase isoforms in wistar rat. *Environmental Toxicology, Inc.*, 187–194. doi:10.1002/tox.20542.
- Li, L., Xie, P., Li, S., Qiu, T., Guo, L., 2007. Sequential ultrastructural and biochemical changes induced *in vivo* by the hepatotoxic microcystins in liver of the phytoplanktivorous silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 357–367. doi:10.1016/j.cbpc.2007.04.008.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J.S.H., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio L.*) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon* 42, 85–89. doi:10.1016/S0041-0101(03)00104-1.
- Li, X., Ma, J., 2017. Mitochondria and lysosomes play a key role in HepG2 cell apoptosis induced by microcystin-LR. *Toxin Rev.* 36, 63–72. doi:10.1080/15569543.2016.1230133.
- Li, X., Ma, J., Fang, Q., Li, Y., 2013. Transcription alterations of microRNAs, cytochrome P4501A1 and 3A65, and AhR and PXR in the liver of zebrafish exposed to crude microcystins. *Toxicon* 73, 17–22. doi:10.1016/j.toxicon.2013.07.002.
- Li, X.Y., Chung, I.K., Kim, J.I., Lee, J.A., 2005. Oral exposure to *Microcystis* increases activity-augmented antioxidant enzymes in the liver of loach (*Misgurnus*

- mizolepis*) and has no effect on lipid peroxidation. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 141, 292–296. doi:10.1016/j.cca.2005.07.004.
- Lindsay, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A., 2006. Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia spp.* by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon* 48, 995–1001. doi:10.1016/j.toxicon.2006.07.036.
- Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., Bates, S.E., 2001. From MDR to MXR: New understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 931–959. doi:10.1007/PL00000912.
- Liu, X., Li, S., Peng, W., Feng, S., Feng, J., Mahboob, S., Al-Ghanim, K.A., Xu, P., 2016. Genome-wide identification, characterization and Phylogenetic analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter genes in common carp (*Cyprinus carpio*). *PLoS One* 11, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0153246.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Llewellyn, L.E., 2006. Saxitoxin, a Toxic Marine Natural Product That Targets a Multitude of Receptors. *Nat. Prod. Rep.* 23, 200-222. doi:10.1039/b501296c.
- Lončar, J., Popović, M., Zaja, R., Smital, T. 2010. Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Phys. C* 151, 209-215. doi:10.1016/j.cbpc.2009.10.009.
- Long, R.R., Sargent, J.C., Hammer, K., 1990. Paralytic shellfish poisoning: a case report and serial electrophysiological observations. *Neurology* 40, 1310–1311. doi:10.1212/wnl.40.8.1310.
- Lopes, V.M., Baptista, M., Repolho, T., Rosa, R., Reis, P., 2014. Uptake, transfer and elimination kinetics of paralytic shellfish toxins in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquat. Toxicol.* 146, 205–211. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.011.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265–75.
- Lu, Y.F., Liu, J., Wu, K.C., Qu, Q., Fan, G., Klaassen, C.D., 2014. Overexpression of Nrf2 protects against microcystin-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS One* 9(3), e93013. doi:10.1371/journal.pone.0093013.
- Luckenbach, T., Fischer, S., Sturm, A. 2014. Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comp. Biochem. Phys. C* 165, 28-52. doi:10.1016/j.cbpc.2014.05.002.
- Lukowski, A.L., Denomme, N., Hinze, M.E., Hall, S., Isom, L.L., Narayan, A.R.H., 2019. Biocatalytic detoxification of paralytic shellfish toxins. *ACS Chem. Biol.* 14, 941-948. doi:10.1021/acscchembio.9b00123.
- Lundqvist, J., Pekar, H., Oskarsson, A., 2017. Microcystins activate nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in human liver cells *in vitro* – Implications for an oxidative stress induction by microcystins. *Toxicol* 126, 47-50. doi:10.1016/j.toxicol.2016.12.012.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006.
- McCormick, S.D., 2001. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. *Am. Zool.* 41, 781–794. doi:10.1093/icb/41.4.781.
- Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Bélanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D.W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J.R., Ritter, J.K., Schachter, H., Tephly, T.R., Tipton, K.F., Nebert, D.W., 1997. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, 7(4), 255–269. doi:10.1097/00008571-199708000-00001.
- MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A., 1990. Cyanobacterial MCYST-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264, 187–192. doi:10.1016/0014-5793(90)80245-e.

- MacKintosh, R.W., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T.W., Cohen, P., MacKintosh, C., 1995. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* 371: 236-240. doi:10.1016/0014-5793(95)00888-g.
- Madigan, T., Malhi, N., Tan, J., Mcleod, C., Stewart, I., Harwood, T., Mann, G., Turnbull, A., 2018. Experimental uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in Southern Rock Lobster, *Jasusedwardsii*. *Toxicon* 143, 44–50. doi:10.1016/j.toxicon.2018.01.001.
- Magalhães, V.F., Marinho, M.M., Domingos, P., Oliviera, A.C., Costa, S.M., Azevedo, L.O., Azevedo, S.M.F.O., 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* 42, 289–295. doi:10.1016/S0041-0101(03)00144-2.
- Maher, J.M., Cheng, X., Slitt, A.L., Dieter, M.Z., Klaassen, C.D., 2005. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab. Dispos.* 33, 956–962. doi:10.1124/dmd.105.003798.
- Maher, J.M., Dieter, M.Z., Aleksunes, L.M., Slitt, A.L., Guo, G., Tanaka, Y., Scheffer, G.L., Chan, J.Y., Manautou, J.E., Chen, Y., Dalton, T.P., Yamamoto, M., Klaassen, C.D., 2007. Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology* 46, 1597–1610. doi:10.1002/hep.21831.
- Malbrouck, C., Kestmont, P., 2006. Effects of microcystins on fish. *Environ. Toxicol.Chem.* 25(1), 72–86. doi:10.1897/05-029r.1.
- Malbrouck, C., Trausch, G., Devos, P., Kestemont, P., 2003. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus L.* *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 135, 39–48. doi:10.1016/S1532-0456(03)00047-4.
- Mamaca, E., Bechmann, R.K., Torgrimsen, S., Aas, E., Bjørnstad, A., Baussant, T., Le Floch, S., 2005. The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus*

- melops*) exposed to styrene. *Aquat. Toxicol.* 75, 191–201. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.001.
- Mannervik, B., Danielson, U.H., 1988: Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 23, 283-337. doi:10.3109/10409238809088226.
- Mao, Q., 2005. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J.* 7, E118–E133. doi: 10.1208/aapsj070112.
- Marnett, L.J., Riggins, J.N., West, J.D., 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.* 111, 583–593. doi:10.1172/JCI200318022.
- Martin, R.M., Bereman, M.S., Marsden, K.C., 2020. Exposure to a mixture of BMAA and MCLR synergistically modulates behavior in larval zebrafish while exacerbating molecular changes related to neurodegeneration. *bioRxiv* 2020.07.15.205617. doi:10.1101/2020.07.15.205617.
- Martin, R.M., Stallrich, J., Bereman, M.S., 2019. Mixture designs to investigate adverse effects upon co-exposure to environmental cyanotoxins. *Toxicology* 421, 74–83. doi:10.1016/j.tox.2019.04.013.
- Martina, J.A., Puertollano, R., 2013. Rag GTPases mediate amino acid-dependent recruitment of TFEB and MITF to lysosomes. *J. Cell Biol.* 200, 475–491. doi:10.1083/jcb.201209135.
- Matthews, H.R., 1995. Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: A possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol. Ther.* 67, 323–350. doi:10.1016/0163-7258(95)00020-8.
- Mazur, M., 2015. The effect of temperature on paralytic shellfish toxin uptake by blue mussels (*Mytilus Edulis*) and sea scallops (*Placopecten magellanicus*). Honors College Paper 216.
- McCord, J. M., Fridovich, I., 1969. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite,

- dimethyl sulfoxide, and oxygen. *The Journal of biological chemistry*, 244(22), 6056–6063.
- Meier-Abt, F., Hammann-Hanni, A., Stieger, B., Ballatori, N., Boyer, J.L., 2007. The organic anion transport polypeptide 1d1 (Oatp1d1) mediates hepatocellular uptake of phalloidin and microcystin into skate liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218(3), 274–279. doi:10.1016/j.taap.2006.11.015.
- Meijer, A.J., Codogno, P., 2004. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2445–2462. doi:10.1016/j.biocel.2004.02.002.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711–760. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.
- Menezes, C., Alverca, E., Dias, E., Sam-Bento, F., Pereira, P., 2013. Involvement of endoplasmic reticulum and autophagy in microcystin-LR toxicity in Vero-E6 and HepG2 cell lines. *Toxicol. Vitro.* 27, 138–148. doi:10.1016/j.tiv.2012.09.009.
- Menezes, C., Alverca, E., Dias, E., Sam-Bento, F., Pereira, P., 2013. Involvement of endoplasmic reticulum and autophagy in microcystin-LR toxicity in Vero-E6 and HepG2 cell lines. *Toxicol. Vitro.* 27, 138–148. doi:10.1016/j.tiv.2012.09.009.
- Menon, D., Coll, R., O'Neill, L.A., Board, P.G., 2014. Glutathione transferase omega 1 is required for the lipopolysaccharide-stimulated induction of NADPH oxidase 1 and the production of reactive oxygen species in macrophages. *Free Radic Biol Med* 73, 318–327. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.020.
- Menon, D., Coll, R., O'Neill, L.A., Board, P.G., 2015. GSTO1-1 modulates metabolism in macrophages activated through the LPS and TLR4 pathway. *J Cell Sci* 128(10), 1982–1990. doi:10.1242/jcs.167858.
- Mészáros, G., Pasquier, A., Vivot, K., Goginashvili, A., Ricci, R. 2018. Lysosomes in nutrient signalling: a focus on pancreatic β -cells. *Diabetes Obes. Metab.* 20, 104–115. doi:10.1111/dom.13389.

- Metcalf, J.S., Banack, S.A., Lindsay, J., Morrison, L.F., Cox, P.A., Codd, G.A., 2008. Co-occurrence of β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004. *Environ. Microbiol.*, 10, 702–708. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01492.x.
- Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Pflugmacher, S., Codd, G.A., 2000. Immuno-cross reactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *Microbiol Lett.* 189(2), 155-158. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09222.x.
- Metcalf, J.S., Codd, G.A., 2012. Cyanotoxins. En: Whitton, B.A., *Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time*, in: *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, 651–675. doi:10.1007/978-94-007-3855-3.
- Miao, W., Hu, L., Scrivens, P.J., Batist, G., 2005. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: Direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 280(21), 20340-20348. doi:10.1074/jbc.M412081200.
- Mikhailov, A., Härmälä-Braskén, A.S., Hellman, J., Meriluoto, J., Eriksson, J.E., 2003. Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chem. Biol. Interact.* 142, 223–237. doi:10.1016/S0009-2797(02)00075-3.
- Miller, D.S., Masereeuw, R., Karnaky, K.J., 2002. Regulation of MRP2-mediated transport in shark rectal salt gland tubules. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, R774-81. doi:10.1152/ajpregu.00333.2001.
- Miller, D.S., Shaw, J.R., Stanton, C.R., Barnaby, R., Karlson, K.H., Hamilton, J.W., Stanton, B.A., 2007. MRP2 and Acquired Tolerance to Inorganic Arsenic in the Kidney of Killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Toxicol. Sci.* 97(1), 103–110. doi:10.1093/toxsci/kfm030.
- Milutinović, M.G., Nikodijević, D.D., Stanković, M.S., Cvetković, D.M., Marković, S.D., 2019. Altered apoptosis and biotransformation signaling in HCT-116

- colorectal carcinoma cells induced by *Teucrium chamaedrys* L. extract. *Kragujevac Journal of Science* 41, 77-86. doi:10.5937/KgJSci1941077M.
- Minami, S., Ito, K., Honma, M., Ikebuchi, Y., Anzai, N., Kanai, Y., Nishida, T., Tsukita, S., Sekine, S., Horie, T., Suzuki, H., 2009. Posttranslational regulation of *Abcc2* expression by SUMOylation system. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 296, 406–413. doi:10.1152/ajpgi.90309.2008.
- Mitrovic, S.M., Pflugmacher, S., James, K.J., Furey, A., 2004. Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. *Aquat. Toxicol.* 68, 185–192. doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.017.
- Montebruno, D., 1993. Intoxicación por consumo de mariscos contaminados con veneno paralizante en la XII región, Chile. Estudio anatomopatológico. *Rev Med Chile* 121, 94–97.
- Montoya, N.G., Akselman, R., Pajaro, M., Perrota, R.G., Carreto, J.I., 2019. Toxinas paralizantes de moluscos en el Mar Argentino: impacto, transferencia trófica y perspectiva. *Mar. Fish. Sci.* 32(1), 47-69. doi:10.47193/mafis.3212019061805.
- Montoya, N.G., Akselman, R., Pajaro, M., Perrota, R.G., Carreto, J.I., 1997. Presencia de veneno paralizante de moluscos en hígado de caballa de la región costera bonaerense. *Rev. Invest. Des. Pesq.* 11, 145-152.
- Moore, M.N., Kohler, A., Lowe, D., Viarengo, A., 2009. Lysosomes and autophagy in aquatic animals. *Methods Enzymol.* 451, 581–620. doi:10.1016/S0076-6879(08)03233-3.
- Morel, F., Aninat, C., 2011. The glutathione transferase kappa family. *Drug Metab. Rev.* 43, 281–291. doi:10.3109/03602532.2011.556122.
- Moreno, I.M., Mate, A., Repetto, G., Vázquez, C.M., Cameán, A.M., 2003. Influence of microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. *J. Physiol. Biochem.* 59, 293–299. doi:10.1007/BF03179887.
- Moss, B., Allam, B., 2006. Fluorometric measurement of oxidative burst in lobster hemocytes and inhibiting effect of pathogenic bacteria and hypoxia. *J.*

- Shellfish Res. 25, 1051–1057. doi:10.2983/0730-8000(2006)25[1051:FMOOBI]2.0.CO;2.
- Mottino, A.D., Hoffman, T., Jennes, L., Cao, J., Vore, M., 2001. Expression of multidrugresistance-associated protein 2 in small intestine from pregnant and postpartumrats. Am. J. Physiol. Gastr. L. 280(6), 1261–1273. doi:10.1152/ajpgi.2001.280.6.G1261.
- Movileanu, L., Flonta, M.L., Mihailescu, D., Frangopol, P.T. 1998. Characteristics of ionic transport processes in fish intestinal epithelial cells. Biosystems. Feb 45(2):123-40. doi:10.1016/s0303-2647(97)00071-3.
- Mowe, M.A., Mitrovic, S., Lim, R., Furey, A., Yeo, D.C., 2015. Tropical cyanobacterial blooms: a review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. J. Limnol. 79, 205–224. doi:10.4081/jlimnol.2014.1005.
- Mulder, G. J., 1981., Sulfation of Drugs and Related Compounds. CRC Press, Boca Raton, FL., pp 250. doi:10.1201/9780429279911.
- Müller, J., Keiser, M., Drozdzik, M., Oswald, S., 2017. Expression, regulation and function of intestinal drug transporters: An update. Biol. Chem. 398, 175–192. doi:10.1515/hsz-2016-0259.
- Mullor, J.B., 1945. Algas tóxicas. Su estudio. Rev. del Colegio de Doctores en Bioquímica y Farmacia. Año 1.
- Myint, K., Biswas, R., Li, Y., Jong, N., Jamieson, S., Liu, J., Han, C., Squire, C., Merien, F., Lu, J., Nakanishi, T., Tamai, I., Mckeage, M., 2019. Identification of MRP2 as a targetable factor limiting oxaliplatin accumulation and response in gastrointestinal cancer. Sci. Rep., 1–12. doi:10.1038/s41598-019-38667-8.
- Namikoshi, M., Murakami, T., Watanabe, M.F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., Nagai, H., Oishi, S., 2003. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. Toxicon 42, 533–538. doi:10.1016/S0041-0101(03)00233-2.

- Naseem, S. M., 1996. Toxicokinetics of [3H]saxitoxinol in peripheral and central nervous system of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 141, 49–58. doi:10.1006/taap.1996.0259.
- Nguyen, T., Yang, C.S., Pickett, C.B., 2004. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 433–441. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.033.
- Nichols, K.M, Edo AF, Wheeler, P.A, Thorgaard, G.H., 2008. The genetic basis of smoltification-related traits in *Oncorhynchus mykiss*. *Genetics* 179(3), 1559–75. doi:10.1534/genetics.107.084251.
- Nixon, R. A. 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 19, 983–997. doi:10.1038/nm.3232.
- Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D., 2009. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environ. Int.* 35, 971–986. doi:10.1016/j.envint.2009.02.006.
- Oehrle, S.A., Southwell, B., Westrick J., 2010. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon* 55, 965–972. doi:10.1016/j.toxicon.2009.10.001.
- Oliveira, M., Maria, V.L., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M., Santos, M.A., 2009. Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata* - An integrated biomarker approach. *Environ. Pollut.* 157(3), 959–967. doi:10.1016/j.envpol.2008.10.019.
- Oliver, C.J., Shenolikar, S., 1998. Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Frontiers in Bioscience* 3, 961–972. doi:10.2741/a336.
- Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2005. Toxicity assessment of environmentally relevant pollutant mixtures using a heuristic model. *Integr Environ Assess Manag* 1, 114–122. doi:10.1897/ieam_2004-005r.1.

- Olsson, C. 2010. The enteric nervous system. The multifunctional gut of fish. Elsevier, London, 448p.
- Omiecinski, C.J., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H., Peters, J.M., 2011. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol. Sci.* 120, 49–75. doi:10.1093/toxsci/kfq338.
- O'Rourke B. 2007. Mitochondrial ion channels. *Annual review of physiology*, 69, 19–49. doi:10.1146/annurev.physiol.69.031905.163804.
- Osswald, J., Carvalho, A.P., Claro, J., Vasconcelos, V., 2009. Effects of cyanobacterial extracts containing anatoxin-a and of pure anatoxin-a on early developmental stages of carp. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 473–478. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.05.011.
- Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V., 2007. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment International* 33, 1070-1089. doi:10.1016/j.envint.2007.06.003.
- Otaño, S., Salerno, G., Ruiz, M., Aguilera, A., Echenique, R., 2012. Argentina: cyanobacteria and cyanotoxins: identification, toxicology, monitoring and risk assessment. En: Chorus, I. (Ed.), *Current Approaches to Cyanotoxin Risk Assessment, Risk Management and Regulations in Different Countries*. Umweltbundesamt, Berlin, pp.16–20.
- Otaño, S.H., 2009. Saxitoxins in Argentinian inland waters. *Harmful Algae News* 39, 19.
- Othaz Brida, M., Agúndez, J., Gil, M., Labollita, H., 2010. Control de floraciones algales en los embalses de la Cuenca del Río Negro. VI Congreso Argentino de presas y aprovechamientos hidroeléctricos, Neuquén, Argentina.
- Ozawa, K., Yokohama, A., Ishikawa, K., Kumagai, M., Watanabe, M.F., Park, H.-D., 2003. Accumulation and depuration of microcystin produced by the cyanobacterium *Microcystis* in a freshwater snail. *Limnology* 4, 131–138. doi:10.1007/s10201-003-0106-1.

- Pace, J.G., Robinson, N.A., Miura, G.A., Matson, C.F., Geisbert, T.W., White, J.D., 1991. Toxicity and kinetics of 3H-microcystin-LR in isolated perfused rat livers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107, 391–401. doi:10.1016/0041-008x(91)90303-v.
- Paerl, H.W., Huisman, J., 2008. Climate-blooms like it hot. *Science* 320, 57–58. doi:10.1126/science.1155398.
- Paerl, H.W., Huisman, J., 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ Microbiol Rep* 1, 27–37. doi:10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x.
- Paerl, H.W., Millie, D.F., 1996. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia* 35, 160–167. doi:10.2216/i0031-8884-35-6s-160.1.
- Paerl, H.W., Paul, V.J., 2012. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 46, 1349–1363. doi:10.1016/j.watres.2011.08.002.
- Painefilu, J.C., 2016. Efectos en el transporte celular y efectos tóxicos del arsénico en interacción con microcistina-LR, en intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*. Tesis de Licenciatura. Centro regional Universitario Bariloche. Universidad Nacional del Comahue: 50 pp.
- Painefilú, J.C., Pascual, M.M., Bieczynski, F., Laspoumaderes, C., González, C., Villanueva, S.S.M., Luquet, C.M., 2019. *Ex vivo* and *in vivo* effects of arsenite on GST and ABCC2 activity and expression in the middle intestine of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 225. doi:10.1016/j.cbpc.2019.108566.
- Paskerová, H., Hilscherová, K., Bláha, L., 2012. Oxidative stress and detoxification biomarker responses in aquatic freshwater vertebrates exposed to microcystins and cyanobacterial biomass. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 2024–2037. doi:10.1007/s11356-012-0960-7.
- Pastore, N., Vainshtein, A., Klisch, T.J., Armani, A., Huynh, T., Herz, N.J., Polishchuk, E.V., Sandri, M., Ballabio, A., 2017. TFE3 regulates whole-body energy metabolism in cooperation with TFEB. *EMBO Mol. Med.* 9, 605–621. doi:10.15252/emmm.201607204.

- Pathania, S., Bhatia, R., Baldi, A., Singh, R., Rawal, R.K., 2018. Drug metabolizing enzymes and their inhibitors' role in cancer resistance. *Biomed. Pharmacother.* 105, 53–65. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.117.
- Patra, R.W., Chapman, J.C., Lim, R.P., Gehrke, P.C., 2007. The effects of three organic chemicals on the upper thermal tolerances of four freshwater fishes. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1454–1459. doi:10.1897/06-156R1.1.
- Patra, R.W., Chapman, J.C., Lim, R.P., Gehrke, P.C., Sunderam, R.M., 2015. Interactions between water temperature and contaminant toxicity to freshwater fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1809–1817. doi:10.1002/etc.2990.
- Paul, N., Chakraborty, S., Sengupta, M., 2014. Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*. *Aquat. Toxicol.* 152, 105–112. doi:10.1016/j.aquatox.2014.03.017.
- Peng, W., Minakaki, G., Nguyen, M., Krainc, D., 2019. Preserving lysosomal function in the ageing brain: insights from neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 16, 611–634. doi:10.1007/s13311-019-00742-3.
- Petitjean, Q., Jean, S., Côte, J., Larcher, T., Angelier, F., Ribout, C., Perrault, A., Laffaille, P., Jacquin, L., 2020. Direct and indirect effects of multiple environmental stressors on fish health in human-altered rivers. *Sci. Total Environ.* 742, 140657. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140657.
- Peuthert, A., Wiegand, C., 2004. Glutathione involvement in the biotransformation of microcystins in *Dreissena polymorpha*. Poster abstract, 6th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC) 21.–27. June, Bergen, Norway.
- Pflugmacher, S., Amé, V., Wiegand, C., Steinberg, C. 2001. Cyanobacterial toxins and endotoxins-their origin and thier ecophysiological effects in aquatic organisms. *Wasser y Boden*, 53/4, 15-20.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W. 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta* 1425: 527-533.

- Pichardo, S., Jos, A., Zurita, J.L., Salguero, M., Camean, A.M., Repetto, G., 2005. The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR. *Toxicol. Vitr.* 19, 865–873. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.016.
- Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A., Loureiro, S., Vasconcelos, V., 2013. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. *Hydrobiologia* 705, 27–42. doi:10.1007/s10750-012-1372-x.
- Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A., Vasconcelos, V., Loureiro, S. 2016. The interactive effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on the growth rate of the freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology* 25, 745–758. doi:10.1007/s10646-016-1633-y.
- Pizzolon, L., Tracanna, B., Prósperi, C., Guerrero, J.M., 1999. Cyanobacterial blooms in Argentinean inland waters. *Lakes Reserv. Res. Manag.* 4, 101–105. doi:10.1046/j.1440-1770.1999.00085.x.
- Porter, K.G., Orcutt, J.D., 1980: Nutritional adequacy, manageability and toxicity as factors that determine the food quality of green and blue-green algae for *Daphnia*. – In: Kerfoot, W.C., (ed.), *Ecology and evolution in zooplankton communities*, pp. 268-281. University press of NewEngland, Hanover.
- Poste, A.E., Hecky, R.E., Guildford, S.J., 2011. Evaluating microcystin exposure risk through fish consumption. *Environ. Sci. Technol.* 45 (13), 5806-5811. doi:10.1021/es200285c.
- Pourahmad, J., Hosseini, M.J., Eskandari, M.R., Shekarabi, S.M., Daraei, B., 2010. Mitochondrial/lysosomal toxic cross-talk plays a key role in cisplatin nephrotoxicity. *Xenobiotica* 40, 763–771. doi:10.3109/00498254.2010.512093.
- Prunet, P., Sturm, A., Milla, S. 2006. Multiple corticosteroid receptors in fish: from old ideas to new concepts. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147:17-23. doi:10.1016/j.ygcen.2006.01.015.

- PubChem, 2020. Acceso: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. - Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E.E., 2019., PubChem 2019. Improved access to chemical data. *Nucleic acids research*, 47(D1), D1102–D1109. doi:10.1093/nar/gky1033.
- Qin, W., Xu, L., Zhang, X., Wang, Y., Meng, X., Miao, A., Yang, L., 2010. Endoplasmic reticulum stress in murine liver and kidney exposed to microcystin-LR. *Toxicol* 56, 1334 -1341. doi:10.1016/j.toxicol.2010.07.017.
- Quiros, R., Drago, E., 1985. Relaciones entre variables físicas, morfométricas y climáticas en lago patagónicos. *Rev. la Asoc. Ciencias Nat. del Litoral* 16, 181–199. doi:10.14409/natura.v2i16.
- Ramos, P., Schmitz, M., Gama, S., Portantiolo, A., Durruthy, M.G., de Souza Votto, A.P., Cornetet, L.R., dos Santos Machado, K., Wehrli, A., Tonel, M.Z., Binotto Fagan, S., Monserrat, J.M., 2018. Cytoprotection of lipoic acid against toxicity induced by saxitoxin in hippocampal cell line HT-22 through in silico modeling and *in vitro* assays. *Toxicology* 393, 171–184. doi:10.1016/j.tox.2017.11.004.
- Raposo, M., Gomes, M., Botelho, M.J., Rudnitskaya, A., 2020. Paralytic Shellfish Toxins (PST)-Transforming Enzymes: A Review. *Toxins* 12(5), 344. doi:10.3390/toxins12050344.
- Rauhala, P., Andoh, T., Chiueh, C.C., 2005. Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 91–95. doi:10.1016/j.taap.2005.02.028.
- Rebbeor, J.F., Connolly, G.C., Henson, J.H., Boyer, J.L., Ballatori, N., 2000. ATP-dependent GSH and glutathione S-conjugate transport in skate liver: Role of an Mrp functional homologue. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 279, 417–425. doi:10.1152/ajpgi.2000.279.2.g417.
- Rebbeor, J.F., Connolly, G.C., Henson, J.H., Boyer, J.L., Ballatori, N., 2000. ATP-dependent GSH and glutathione S-conjugate transport in skate liver: Role of an Mrp functional homologue. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 279, 417–425. doi:10.1152/ajpgi.2000.279.2.g417.

- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131. doi:10.1038/nprot.2008.75.
- Rhee, S.G., 1999. Redox signaling: Hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* 31, 53–59. doi:10.1038/emmm.1999.9.
- Rigalli, J.P., Tocchetti, G.N., Weiss, J., 2018. Modulation of ABC Transporters by Nuclear Receptors: Physiological, Pathological and Pharmacological Aspects. *Curr. Med. Chem.* 26, 1079–1112. doi:10.2174/0929867324666170920141707.
- Ringuelet RA, Olivier SR, Guarrera SA, Aramburu RH. 1955., Observaciones sobre antoplancton y mortandad de peces en la laguna del monte (Buenos Aires, República Argentina). *Notas Mus. La Plata (zool. 159)*; 18: 71-80.
- Ritchie, J.M., Rogart, R.B., 1977. The binding of saxitoxin and tetrodotoxin to excitable tissue. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 79, 1–50, doi:10.1007/BFb0037088.
- Robinson-Rechavi, M., Garcia, H.E., Laudet, V., 2003. The nuclear receptor superfamily. *J. Cell Sci.* 116, 585–586. doi:10.1242/jcs.00247.
- Rong, X., Albert, C. J., Hong, C., Duerr, M. A., Chamberlain, B. T., Tarling, E. J., Ito, A., Gao, J., Wang, B. Edwards, P.A., Jung, M.E., Ford, D.A., Tontonoz, P., 2013. LXRs regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition. *Cell Metabolism*, 18, 685–697. doi: 10.1016/j.cmet.2013.10.002.
- Rosenfeld, J.M., Vargas Jr, R., Xie, W., Evans, R.M., 2003. Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptorpregnane X receptor. *Molecular endocrinology*, 17(7), 1268-1282. doi:10.1210/me.2002-0421.
- Rosengren, M., Thörnqvist, P.-O., Winberg, S., Sundell, K., 2018. The brain-gut axis of fish: Rainbow trout with low and high cortisol response show innate differences in intestinal integrity and brain gene expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 257, 235–245. doi:10.1016/j.ygcen.2017.09.020.

- Rovetta, F., Stacchiotti, A., Consiglio, A., Cadei, M., Grigolato, P.G., Lavazza, A., Rezzani, R., Aleo, M.F., 2012. ER signaling regulation drives the switch between autophagy and apoptosis in NRK-52E cells exposed to cisplatin. *Exp. Cell Res.* 318, 238–250. doi:10.1016/j.yexcr.2011.11.008.
- Runnegar, M.T, Berndt, N., Kong, S.M., Lee, E.Y.C., Zhang, L.F., 1995a. *In vivo* and *in vitro* binding of microcystin to protein phosphatase-1 and phosphatase-2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 162–169. doi:10.1006/bbrc.1995.2605.
- Runnegar, M.T., Kong, S.-M., Zhong, Y.-Z., Lu, S.C., 1995b. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 219–225. doi:10.1016/S0006-2952(94)00466-8.
- Runnegar, M.T., Seward, D.J., Ballatori, N., Crawford, J.M., Boyer, J.M. 1999. Hepatic toxicity and persistence of ser/thr protein phosphatase inhibition by microcystin in the little skate *Raja erinacea*. *Toxicol. Appl. Pharm.* 161, 40-49. doi: 10.1006/taap.1999.8783.
- Rushmore, T.H., and Kong, A.-N.T., 2002. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzyme. *Curr. Drug Metab.* 3, 481–490. doi:10.2174/1389200023337171.
- Rutkowska, M., Płotka-Wasyłka, J., Majchrzak, T., Wojnowski, W., Mazur-Marzec, H., Namieśnik, J., 2019. Recent trends in determination of neurotoxins in aquatic environmental samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112, 112–122. doi:10.1016/j.trac.2019.01.001.
- Ryan, D.E., Levin, W., 1990. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450, *Pharmaceut. Therapeut.*, 45, 153. doi:10.1016/0163-7258(90)90029-2.
- Rymuszka, A., Sierosławska, A., Bownik, A., Skowronski, T., 2007. *In vitro* effects of pure microcystin-LR on the lymphocyte proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 22, 289–292. doi:10.1016/j.fsi.2006.06.002.

- Sabatini, S.E., Brena, B.M., Luquet, C.M., San Julián, M., Pirez, M., Ríos de Molina, M.C., 2011. Microcystin accumulation and antioxidant responses in the freshwater clam *Diplodon chilensis* patagonicus upon subchronic exposure to toxic *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1188–1194. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.03.012.
- Sadeghi, M.R., Jeddi, F., Soozangar, N., Somi, M.H., Shirmohamadi, M., Khaze, V., Samadi, N., 2018. Nrf2/P-glycoprotein axis is associated with clinicopathological characteristics in colorectal cancer. *Biomed. Pharmacother.* 104, 458–464. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.062.
- Sahin, A., Tencalla, F.G., Dietrich, D.R., Naegeli, H. 1996. Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. *Toxicology* 106: 123–130.
- Sakamoto, S., Sato, S., Ogata, T., Kodama, M., 2000. Formation of intermediate conjugates in the reductive transformation of gonyautoxins to saxitoxins by thiol compounds. *Fish. Sci.* 66, 136–141. doi:10.1046/j.1444-2906.2000.00020.x.
- Sant'Anna, C.L., de Carvalho, L.R., Fiore, M.F., Silva-Stenico, M.E., Lorenzi, A.S., Rios, F.R., Konno, K., Garcia, C., Lagos, N., 2011. Highly Toxic *Microcystis aeruginosa* Strain, Isolated from São Paulo—Brazil, Produce Hepatotoxins and Paralytic Shellfish Poison Neurotoxins. *Neurotox. Res.* 19, 389–402. doi:10.1007/s12640-010-9177-z.
- Santinelli, N. 2013. Monitoreo de FAN en la costa de la provincia de Chubut. Taller FAN, Chubut, Argentina. <http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/zonificacion>
- Sato, S., Sakai, R., Kodama, M., 2000. Identification of thioether intermediates in the reductive transformation of gonyautoxins into saxitoxins by thiols 10, 1787–1789. doi:10.1016/S0960-894X(00)00332-2.
- Schaedle, M., Bassham, J.A., 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol.* 59, 1011–1012. doi:10.1104/pp.59.5.1011.

- Scheffer, M., Rinaldi, S., Gragnani, A., Mur, L.R., van Nes, E.H., 1997. On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology* 78, 272–282. doi:10.1890/0012-9658(1997)078[0272:OTDOFC]2.0.CO;2.
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E., George, S., James, M., Kullman, S., van den Huk, P., Willet, K., 2008. Biotransformation in Fishes. En: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, New York, p. 1101.
- Schmidt, J.V., Bradfield, C.A., 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annual review of cell and developmental biology*, 12(1), 55-89.
- Schmuck, E.M., Board, P.G., Whitbread, A.K., Tetlow, N., Cavanaugh, J.A., Blackburn, A.C., Masoumi, A., 2005. Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age at onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Pharmacogenet Genomics* 15(7), 493–501. doi:10.1097/01.fpc.0000165725.81559.e3
- Schopf, J.W., 2002. The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. *The Ecology of Cyanobacteria*. doi:10.1007/0-306-46855-7.
- Sephton, D.H., Haya, K., Martin, J.L., Legresley, M.M., Page, F.H., 2007. Paralytic shellfish toxins in zooplankton, mussels, lobsters and caged Atlantic salmon, *Salmo salar*, during a bloom of *Alexandrium fundyense* off Grand Manan Island, in the Bay of Fundy 6, 745–758. doi:10.1016/j.hal.2007.03.002
- Settembre, C., Ballabio, A., 2014. Lysosomal adaptation: how the lysosome responds to external cues. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* May 5;6(6):a016907. doi:10.1101/cshperspect.a016907.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D.C., Ballabio, A., 2011. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6036), 1429–1433. doi:10.1126/science.1204592.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., Ballabio, A., 2013. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 283–296.

- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., Facchinetti, V., Sabatini, D.M., Ballabio, A., 2012. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO journal*, 31(5), 1095–1108. doi:10.1038/emboj.2012.32.
- Shaw, J.R., Jackson, B., Gabor, K., Stanton, S., Hamilton, J.W., Stanton, B. A. 2007. The influence of exposure history on arsenic accumulation and toxicity in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Environmental toxicology and chemistry/SETAC*, 26(12): 2704-2709.
- Sheath, D.J., Andreou, D., Britton, J.R., 2016. Interactions of warming and exposure affect susceptibility to parasite infection in a temperate fish species. *Parasitology* 143, 1340–1346. doi:10.1017/S0031182016000846.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Shelby, M. K., & Klaassen, C. D. 2006. Induction of rat UDP-glucuronosyl-transferases in liver and duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional pathways. *Drug metabolism and disposition*.
- Shen, H., Li, Z., Jiang, Y., Pan, X., Wu, J., Cristofori-Armstrong, B., Smith, J.J., Chin, Y.K.Y., Lei, J., Zhou, Q., King, G.F., Yan, N., 2018. Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins. *science* 362, 16–18, doi:10.1126/science.aau2596.
- Shen, X., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Wickramasinghe, W., 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 40, 1499–1501. doi:10.1016/S0041-0101(02)00151-4.
- Shenolikar, S., 1994. Protein serine/threonine phosphatases - New avenues for cell regulation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 55–86. doi:10.1146/annurev.cb.10.110194.000415.

- Sies, H., 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 11, 613–619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035.
- Sies, H., 2020. Chapter 1 - Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. En: Sies, H. (Ed.), *Oxidative Stress*. Academic Press, pp. 3–12. doi:10.1016/B978-0-12-818606-0.00001-8.
- Silva, C.A., Oba, E.T., Ramsdorf, W.A., Magalhães, V.F., Cestari, M.M., Alberto, C., Ribeiro, O., Silva, H.C., Assis, D., 2011. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicon* 57, 141–147. doi:10.1016/j.toxicon.2010.10.015
- Singh, A., Wu, H., Zhang, P., Happel, C., Ma, J., Biswal, S., 2010. Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Mol. Cancer Ther.* 9, 2365–2376. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0108.
- Sipiak, V.O., Kankaanpak, H.T., Pflugmacher, S., Flinkman, J., Furey, A., Jamesa, K.J., 2002. Bioaccumulation and Detoxication of Nodularin in Tissues of Flounder (*Platichthys flesus*), Mussels (*Mytilus edulis*, *Dreissena polymorpha*), and Clams (*Macoma balthica*) from the Northern Baltic Sea. *Ecotoxicol. Environ. Saf. Environ. Res. Sect. B* 53, 305–311. doi:10.1006/eesa.2002.2222.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Chapter 3: Cyanobacterial toxins. En: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.*, first ed. WHO, New York, NY, 400 pp.
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A.M., Vega, R.L., Epel, D., 2004. Emerging contaminants-pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutat. Res.* 552 (1–2), 101–117. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.006.
- Smith, J.L., Boyer, G.L., Zimba, P.V., 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in

- aquaculture. Aquaculture 280, 5–20.
doi:10.1016/j.aquaculture.2008.05.007.
- Sommer, H., Meyer, K.F., 1937. Paralytic shellfish poisoning. Arch. Pathol., 24, 560-598.
- Sotero-Santos, R.B., De Sousa e Silva, C.R., Verani, N.F., Nonaka, K.O., Rocha, O., 2006. Toxicity of a cyanobacteria bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tiete River, Sao Paulo, Brazil). Ecotoxicol. Environ. Safe. 64, 163–170.
doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.011.
- Stafford, R.G., Hines, H.B., 1995. Urinary elimination of saxitoxin after intravenous injection. Toxicol., 33, 1501–1510. doi:10.1016/0041-0101(95)00081-V.
- Steffen, M.M., Li, Z., Effler, T.C., Hauser, L.J., Boyer, G.L, Wilhelm, S.W., 2012. Comparative metagenomics of toxic freshwater cyanobacteria bloom communities on two continents. PLoS One 7(8): e44002.
doi:10.1371/journal.pone.0044002.
- Steiner, K., Zimmermann, L., Hagenbuch, B., Dietrich, D., 2016. Zebrafish Oatp-mediated transport of microcystin congeners. Arch. Toxicol. 90, 1129–1139.
doi:10.1007/s00204-015-1544-3.
- Stephensen, E., Sturve, J., Förlin, L., 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133, 435–442.
doi:10.1016/S1532-0456(02)00129-1.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., Förlin, L., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. Aquat. Toxicol. 48, 431–442. doi:10.1016/S0166-445X(99)00062-4.
- Straus, D.L., Chambers, J.E., 1995. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion, and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). Aquat. Toxicol. 33, 311–324.
doi:10.1016/0166-445X(95)00024-X.

- Suárez Isla, B.A, Guzmán Méndez, L., 1992. Floraciones de algas nocivas: Mareas Rojas y Toxinas Marinas. Rev. Sanid. la Def. Nac. 9, 133–138.
- Suarez Isla, B.A., 2016. Saxitoxin and Other Paralytic Toxins: Toxicological Profile. In: Gopalakrishnakone P., Haddad Jr. V., Tubaro A., Kim E., Kem W. (eds) Marine and Freshwater Toxins. Toxinology. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-007-6419-4_25.
- Takenaka, S. 2001. Covalent glutathione to cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione-S transferase. Environ. Toxicol. Pharmacol. 9, 135–139. doi:10.1016/S1382-6689(00)00049-1
- Tanaka, T., Uchiumi, T., Hinoshita, E., Inokuchi, A., Toh, S., Wada, M., Takano, H., Kohno, K., Kuwano, M., 1999. The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. Hepatology. Dec;30(6), 1507-12. doi:10.1002/hep.510300617. PMID: 10573531.
- Teixera, MG, Costa MC, Carvalho VL, Pereira M.S, Hage E., 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. Bull. Pan. Am. Health Organ. 27(3), 244-253.
- Tencalla, F., Dietrich, D. 1997. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicon 35, 583–595. doi:10.1016/S0041-0101(96)00153-5.
- Testai, E., Buratti, F.M., Funari, E., Manganelli, M., Vichi, S., Arnich, N., Biré, R., Fessard, V., Sialehaamo, A., 2016a. Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. EFSA Support. Publ. 13, 998E. doi:10.2903/sp.efsa.2016.EN-998.
- Testai, E., Scardala, S., Vichi, S., Buratti, F.M., 2016b. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. Crit. Rev. in Toxicol. 46(5), 385-419. doi:10.3109/10408444.2015.1137865.
- Thottumkara, A.P., Parsons, W.H., Du Bois, J., 2014. Saxitoxin. Angew. Chem. Int. Ed. 53, 5760-5784. doi:10.1002/anie.201308235.

- Torres, R., Pizarro, L., Csendes, A., 2007. GTX 2/3 epimers permeate the intestine through a paracellular pathway. *J. Toxicol. Sci.* 32(3), 241–248. doi:10.2131/jts.32.241.
- Trauner, M., Boyer, J.L., 2003. Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function, and Regulation. *Physiol. Rev.* 83, 633–671. doi:10.1152/physrev.00027.2002.
- Turner, C., Gammie, A., Hollinrake, K., Codd, G., 1990. Pneumonia associated with cyanobacteria. *Br. Med. J.* 300, 1440-1441. doi:10.1136/bmj.300.6737.1440.
- Unoki, T., Akiyama, M., Kumagai, Y., 2020. Nrf2 activation and its coordination with the protective defense systems in response to electrophilic stress. *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi:10.3390/ijms21020545.
- Vale, P., 2008. Saxitoxin and analogs: ecobiology, origin, chemistry, and detection. En: Botana, L.M. *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*, Second Edition- Food Science and Technology (CRC Press).
- Valério, E.; Chaves, S.; Tenreiro, R., 2010. Diversity and Impact of Prokaryotic Toxins on Aquatic Environments: A Review. *Toxins* 2, 2359-2410. doi:10.3390/toxins2102359.
- Van de Waal, D.B., Tillmann, U., Martens, H., Krock, B., van Scheppingen, Y., John, U., 2015. Characterization of multiple isolates from an *Alexandrium ostenfeldii* bloom in The Netherlands. *Harmful Algae* 49, 94–104. doi:10.1016/j.hal.2015.08.002.
- Vasas, G., Gáspár, A., Páger, C., Surányi, G., Máthé, C., Hamvas, M.M., Borbely, G., 2004. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25, 108–115. doi:10.1002/elps.200305641.
- Vasconcelos, V., Oliveira, S., Teles, F.O., 2001. Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Toxicon* 39(10), 1461–1470. doi:10.1016/S0041-0101(01)00105-2.
- Venkateswaran, B.A. Laffitte, S.B. Joseph, Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., Tontonoz, P., 2000. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear

- oxysterol receptor LXR α , Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97(22), 12097–12102. doi:10.1073/pnas.200367697.
- Venturino, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Cocca, C., Bergoc, R.M., Pechen De D'Angelo, A.M., 2001. Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. Comp. Biochem. Physiol. part C 130, 191–198. doi:10.1016/S1532-0456(01)00241-1.
- Verdile, N., Pasquariello, R., Scolari, M., Scirè, G., Brevini, T.A.L., Gandolfi, F., 2020. A detailed study of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) intestine revealed that digestive and absorptive functions are not linearly distributed along its length. Animals 10, 19. doi:10.3390/ani10040745.
- Vollrath, V., Wielandt, A.M., Iruretagoyena, M., Chianale, J., 2006. Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. Biochem. J. 395, 599–609. doi:10.1042/BJ20051518.
- Wagner, C., Adrian, R., 2009, Cyanobacteria dominance: Quantifying the effects of climate change. Limnology and Oceanography, 54, doi:10.4319/lo.2009.54.6_part_2.2460.
- Wagner, M., Halilbasic, E., Marschall, H. U., Zollner, G., Fickert, P., Langner, C., & Trauner, M., 2005. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. Hepatology, 42(2), 420-430. doi:10.1002/hep.20784.
- Wallace, K.B., Dargan, J.E., 1987. Intrinsic metabolic clearance of parathion and paraoxon by livers from fish and rodents. Toxicol. Appl. Pharmacol. 90, 235–242. doi:10.1016/0041-008X(87)90331-0.
- Wang, X., Campos, C.R., Peart, J.C., Smith, L.K., Boni, J.L., Cannon, R.E., Miller, D.S., 2014. Nrf2 upregulates ATP binding cassette transporter expression and activity at the blood-brain and blood-spinal cord barriers. J. Neurosci. 34, 8585–8593. doi:10.1523/JNEUROSCI.2935-13.2014.
- Wassmur, B., Gräns, J., Kling, P., & Celander, M. C., 2010. Interactions of pharmaceuticals and other xenobiotics on hepatic pregnane X receptor and cytochrome P450 3A signaling pathway in rainbow trout (*Oncorhynchus*

- mykiss*). Aquatic toxicology, 100(1), 91-100.
doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.013.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77:591-625.
doi:10.1152/physrev.1997.77.3.591.
- Wheeler, J.B., Stourman, N.V, Thier, R., Dommermuth, A., Vuilleumier, S., Rose, J.A., Armstrong, R.N., Guengerich, F.P., 2001. Conjugation of haloalkanes by bacterial and mammalian glutathione transferases: mono- and dihalomethanes. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1118–1127.
doi:10.1021/tx010019v.
- Whitbread, A.K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M., Board, P.G., 2005. Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Meth. Enzymol.* 401, 78–99. doi:10.1016/S0076-6879(05)01005-0.
- White, A.W., 1980. Recurrence of kills of Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) caused by dinoflagellate toxins transferred through herbivorous zooplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 2262–2265. doi:10.1139/f80-271.
- WHO, 1984. Paralytic Shellfish Poisoning. WHO Offset Publication No.79.
- WHO, 2019. Cyanobacterial toxins: saxitoxins. *Guidel. Drink. Qual. Guidel. Safe Recreat. Water Environ.* 1-19.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203: 201–218. doi:10.1016/j.taap.2004.11.002.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2010. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Mar. Drugs* 8, 2185–2211. doi:10.3390/md8072185.
- Williams, D.E., Craig, M., Dawe, S.C., Kent, M.L., Holmes, C.F.B., Andersen, R.J., 1997. Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and Dungeness crab larvae. *Chem Res Toxicol* 10:463–469.
doi:10.1021/tx9601519.
- Wilson, J.M., Castro, L.F.C., 2010. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. En: Grosell, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *The*

- Multifunctional Gut of Fish. Amsterdam, 1-55. doi:10.1016/S1546-5098(10)03001-3.
- Woynarovich, A., Hoitsy, G., Moth-Poulsen, T., 2011. Small-scale rainbow trout farming, FAO fisheries and aquaculture. Technical Paper No. 561. Rome, FAO: 81 pp.
- Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2004. Glutathione metabolism and its Implications for health. J. Nutr. 134, 489–492 doi:10.1093/jn/134.3.489.
- Wu, Y., Li, L., Zheng, L., Dai, G., Ma, H., Shan, K., Wu, H., Zhou, Q., Song, L., 2016, Patterns of succession between bloom-forming cyanobacteria *Aphanizomenon flos-aquae* and *Microcystis* and related environmental factors in large, shallow Dianchi Lake, China. Hydrobiologia 765, 1-13. doi:10.1007/s10750-015-2392-0.
- Xie, L., Xie, P., Guo, L., Li, L., Miyabara, Y., Park, H.D., 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. Environ. Toxicol. 20, 293–300. doi:10.1002/tox.20120.
- Xu, H., Ren, D., 2015. Lysosomal Physiology. Annu. Rev. Physiol. 77, 57–80. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071649.
- Yanaka, A., 2018. Role of NRF2 in protection of the gastrointestinal tract against oxidative stress. J. Clin. Biochem. Nutr. 63, 18–25. doi:10.3164/jcbtn.17-139
- Yasumoto, T., 2005. Chemistry, etiology, and food chain dynamics of marine toxins. Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. 81, 43–51. doi:10.2183/pjab.81.43.
- Zaja, R., Munić, V., Sauerborn Klobučar, R., Ambriović-Ristov, A., Smital, T., 2008. Cloning and molecular characterization of apical efflux transporters (ABCB1, ABCB11 and ABCC2) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Aquat.Toxicol. 90, 322–332. doi:10.1016/j.aquatox.2008.09.012.
- Zakharyan, R.A., Sampayo-Reyes, A., Healy, S.M., Tsaprailis, G., Board, P.G., Liebler, D.C., Aposhian, H.V., 2001. Human monomethylarsonic acid (MMA(V))

- reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem Res Toxicol.* Aug;14(8), 1051-1057. doi:10.1021/tx010052h.
- Zamek-Gliszczyński, M.J., Hoffmaster, K.A., Nezasa, K.I., Tallman, M.N., Brouwer, K.L.R., 2006. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 447–486. doi:10.1016/j.ejps.2005.12.007.
- Zanchett, G., Oliveira-Filho, E.C., 2013. Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effects. *Toxins* 5(10), 1896-1917. doi:10.3390/toxins5101896.
- Zar, J., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th Edition. (Prentice Hall).
- Zdolsek, J., Zhang, H., Roberg, K., Brunk, U., 1993. H₂O₂-mediated damage to lysosomal membranes of J-774 cells. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 71–85. doi:10.3109/10715769309147344
- Žegura, B., Lah, T.T., Filipič, M., 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* 200, 59–68. doi:10.1016/j.tox.2004.03.006.
- Zeng, C., Sun, H., Xie, P., Wang, J., Zhang, G., Chen, N., Yan, W., Li, G., 2014. The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos, *Aquatic Toxicology*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.021.
- Zhang, G., Li, B., Lee, C.H., Parkin, K.L., 2010. Cysteine and Glutathione Mixed-Disulfide Conjugates of Thiosulfinates: Chemical Synthesis and Biological Activities. *J. Agric. Food Chem.* 58(3), 1564-1571. doi:10.1021/jf9029354.
- Zhang, H., Cai, C., Wu, Y., Shao, D., Ye, B., Zhang, Y., Liu, J., Wang, J., Jia, X., 2013b. Mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways involved in microcystin-LR-induced apoptosis of the testes of male frog (*Rana nigromaculata*) *in vivo*. *J. Hazard. Mater.* 252-253, 382-389. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.017
- Zhao, M., Antunes, F., Eaton, J.W., Brunk, U.T., 2003. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and

- apoptosis, Eur.J. Biochem. 270(18). 3778–3786. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03765.x.
- Zhao, Y., Xie, P., Tang, R., Zhang, X., Li, L., Li, D., 2008. *In vivo* studies on the toxic effects of microcystins on mitochondrial electron transport chain and ion regulation in liver and heart of rabbit. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 148, 204–210. doi:10.1016/j.cbpc.2008.05.008.
- Zhong, Y., Shen, L., Ye, X., Zhou, D., He, Y., Li, Y., Ding, Y., Zhu, W., Ding, J., Zhang, H., 2020. Neurotoxic Anatoxin-a can also exert immunotoxicity by the induction of apoptosis on *Carassius auratus* lymphocytes *in vitro* when exposed to environmentally relevant concentrations. Front. Physiol. 11, 1–10. doi:10.3389/fphys.2020.00316.
- Zhou, M., Tu, W.W., Xu, J., 2015. Mechanisms of microcystin-LR-induced cytoskeletal disruption in animal cells. Toxicol. 101, 92–100. doi:10.1016/j.toxicol.2015.05.005..

ANEXO I

Tabla 1. Compilación de los principales resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, en intestino medio de *Oncorhynchus mykiss*, a partir de exposiciones *in vivo* a microcistina-LR (MCLR) 0,5 $\mu\text{g g pez}^{-1}$ y exposiciones *ex vivo* o *in vitro* a las toxinas paralizantes de moluscos (PST). Las flechas punteadas corresponden a resultados que no se repitieron en más de un experimento.

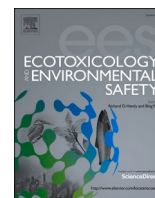
Exposición <i>in vivo</i> a MCLR	12 h	24 h	48 h	48 h				
Exposición <i>ex vivo/in vitro</i> a PST	0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$		0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$				
GSH	↓	↓↓↓	-	↓	-	↓		
GSSG			-	-	-	-		
GSH/GSSG			-	-	-	↓		
Glutación total			-	-	-	-		
Actividad GST			↓	-	↓	-	-	↓
Actividad GR	-	↑	-	-	↑	-		
Actividad CAT	↑	-			-	↑		
Peroxidación lipídica	-	-						
Producción de ROS	-			-				↑
Membrana lisosomal	↓			↓	↓	↓	↓	
Actividad PP1	-	-	↓	↓	↓	-		
Transporte ABCC	Basolateral	↓			↓	-	↑	↑
	Apical	-			↓	-	↑	↑

ANEXO II

Artículo de respaldo

A continuación se adjunta el artículo de respaldo para la presente tesis doctoral, el cual corresponde al Capítulo I: Efectos de las toxinas paralizantes de moluscos sobre marcadores de estrés oxidativo, función lisosomal y actividad de los transportadores ABCC.

Painefilú, J.C, Bianchi, V.A., Krock, B., De Anna, J.S., Kristoff, G., Luquet, C.M., 2020. Effects of paralytic shellfish toxins on the middle intestine of *Oncorhynchus mykiss*: Glutathione metabolism, oxidative status, lysosomal function and ATP-binding cassette class C (ABCC) proteins activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 204, 111069. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111069.



Effects of paralytic shellfish toxins on the middle intestine of *Oncorhynchus mykiss*: Glutathione metabolism, oxidative status, lysosomal function and ATP-binding cassette class C (ABCC) proteins activity

Julio C. Paineofilú^a, Virginia A. Bianchi^a, Bernd Krock^b, Julieta S. De Anna^a, Gisela Kristoff^{c,d}, Carlos M. Luquet^{a,*}

^a Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, Subsele INIBIOMA-CEAN (CONICET-UNCo), ruta provincial 61, km 3, CCP 7, Junín de los Andes, 8371, Neuquén, Argentina

^b Ökologische Chemie, Alfred Wegener Institut-Helmholtz Zentrum für Polar- und Meeresforschung, Am Handelshafen 12, 27570, Bremerhaven, Germany

^c Laboratorio de Ecotoxicología Acuática Invertebrados Nativos, Departamento de Química Biológica, IQUBICEN (CONICET-UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Intendente Güiraldes, 2160, CABA, Argentina

^d Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Intendente Güiraldes, 2160, CABA, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Saxitoxin
Multixenobiotic resistance
ABCC
Lysosomal membrane
Toxicokinetics
Rainbow trout

ABSTRACT

We studied the absorption, cytotoxicity and oxidative stress markers of Paralytic Shellfish Toxins (PST) from three extracts from *Alexandrium catenella* and *A. ostenfeldii*, in middle *Oncorhynchus mykiss* intestine *in vitro* and *ex vivo* preparations. We measured glutathione (GSH) content, glutathione-S transferase (GST), glutathione reductase (GR) and catalase (CAT) enzymatic activity, and lipid peroxidation in isolated epithelium exposed to 0.13 and 1.3 μM PST. ROS production and lysosomal membrane stability (as neutral red retention time 50%, NRRT50) were analyzed in isolated enterocytes exposed to PST alone or plus 3 μM of the ABCC transport inhibitor MK571. In addition, the concentration-dependent effects of PST on NRRT50 were assayed in a concentration range from 0 to 1.3 μM PST. We studied the effects of three different PST extracts on the transport rate of the ABCC substrate DNP-SG by isolated epithelium. The extract with highest inhibition capacity was selected for studying polarized DNP-SG transport in everted and non-everted intestinal segments. We registered lower GSH content and GST activity, and higher GR activity, with no significant changes in CAT activity, lipid peroxidation or ROS level. PST exposure decreased NRRT50 in a concentration-depend manner ($\text{IC}_{50} = 0.0045 \mu\text{M}$), but PST effects were not augmented by addition of MK571. All the three PST extracts inhibited ABCC transport activity, but this inhibition was effective only when the toxins were applied to the apical side of the intestine and DNP-SG transport was measured at the basolateral side. Our results indicate that PST are absorbed by the enterocytes from the intestine lumen. Inside the enterocytes, these toxins decrease GSH content and inhibit the basolateral ABCC transporters affecting the normal functions of the cell. Furthermore, PST produce a strong cytotoxic effect to the enterocytes by damaging the lysosomal membrane, even at low, non-neurotoxic concentrations.

1. Introduction

Paralytic shellfish toxins (PST) are neurotoxic compounds that inhibit voltage-gated sodium channels interrupting the action potential in nerve and muscle cells (Catterall, 1980, for a review). PST comprise several structural variants, such as saxitoxin (STX), sulfated gonyautoxins (GTX) and N-sulfocarbamoyl toxins (B- and C-toxins), of which STX is the most neurotoxic one (Thottumkara et al., 2014). These compounds are produced by marine dinoflagellates and freshwater

cyanobacteria (Lagos, 2003, for a review; Kellmann et al., 2013), and can reach high levels in blooms or surface scums, which can particularly affect the use of water for tap water production, aquaculture and recreational activities (Testai et al., 2016a, for a review). PST may be accumulated in aquatic organisms and incorporated into the trophic chain (Ferrão-Filho and Kozłowski-Suzuki, 2011; Lopes et al., 2014; Madigan et al., 2018; Suárez-Isla, 2016). In fish, besides neuromotor effects (Bakke and Horsberg, 2007; Bakke et al., 2010; Lefebvre et al., 2004), PST can produce oxidative stress (Clemente et al., 2010; da Silva et al., 2011) and lethal effects (Montoya et al., 1997; White, 1980).

* Corresponding author.

E-mail address: luquetc@comahue-conicet.gob.ar (C.M. Luquet).

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111069>

Received 20 June 2020; Received in revised form 21 July 2020; Accepted 23 July 2020

Available online 3 August 2020

0147-6513/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations

ABCC	ATP-binding cassette class C protein
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
DCFDA	2,7-dichlorofluorescein diacetate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNP-SG	(dinitrophenyl-S-glutathione)
DTNB	5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
GST	Glutathione-S-transferase
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NRRT50	Neutral Red Retention Time 50%
PST	Paralytic Shellfish Toxins
ROS	Reactive Oxygen Species
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethane

The highest amounts of these toxins are mostly found in gut content and liver (Deeds et al., 2008) although accumulation of PST in muscle has been reported to occur in two freshwater fish species used for human consumption, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Galvão et al., 2009) and *Geophagus brasiliensis* (Calado et al., 2020). Therefore, it is important to know the capacity of fish used in aquaculture for biotransformation and excretion of PST, in order to avoid possible risks of human poisoning (Etheridge, 2010). For example, the Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the Atlantic cod (*Gadus morhua*) can excrete PST from their organs (Bakke and Horsberg, 2010), but the biotransformation and excretion mechanisms involved are not clear yet.

The biotransformation of PST has been reported to occur in bacteria, marine invertebrates and mammals (García et al., 2010, 2004), through chemical reactions that include glucuronidation, oxidation, epimerization and reduction (Bricelj and Shumway, 1998, for a review; Lukowski et al., 2019). Fish like white seabream (*Diplodus sargus*) are able to biotransform the *N*-sulfocarbamoyl PST analogues, incorporated through the diet, into B1 and decarbamoyl saxitoxin (dcSTX) (Costa et al., 2011). This kind of biotransformation was reported to occur in bivalves and bacteria, in the presence of thiols like those present in the tripeptide glutathione (GSH) (Asakawa et al., 1987; Sakamoto et al., 2000; Sato et al., 2000). These reactions can include conjugation with GSH catalyzed by enzymes of the glutathione-S-transferase family (GST) and/or toxin reduction coupled to GSH oxidation to GSSG. In turn, GSH levels can be rapidly restored by reduction of GSSG catalyzed by the enzyme glutathione reductase (GR). PST can induce GST activity in fish, which suggests the participation of this enzyme in their biotransformation (Costa et al., 2012; Gubbins et al., 2000).

It has been widely shown that GSH-conjugated xenobiotics are more easily detoxified than the original molecules (Schlenk et al., 2008; Parkinson and Ogilvie, 2008), in the context of the multixenobiotic resistance (MXR) system, the aquatic species' analog of the multidrug resistance of mammals (MDR), first described for chemotherapy resistance in cancer cells (Kurelec, 1992; Bard, 2000). This system involves the active extrusion of a wide range of compounds by membrane proteins of the ATP-binding cassette family. Many xenobiotic and endobiotic compounds are conjugated with GSH and then exported from the cell through ATP-binding cassette class C (ABCC) transporters (Epel et al., 2008; Omiecinski et al., 2011, for a review). For example, the cyanotoxin microcystin-LR and arsenite have been shown to be detoxified through this mechanism in the middle intestine of *Oncorhynchus mykiss* and *Odontesthes hatchery* (Bieczynski et al., 2014, 2016; Paineofilú et al., 2019). Since fish are in contact with PST mainly through the diet

and drinking, both, the permeability and the biotransformation-excretion capacity of the intestinal epithelium are critical for absorption of toxins and toxicity. However, despite that excretion of some voltage-gated sodium channel blockers such as oxalipatin through ABCCs has been studied (Grolleau et al., 2001; Myint et al., 2019), there is no report on the involvement of these transporters on elimination of PST.

Besides being widely used as model species for physiological and toxicological experiments, the rainbow trout *O. mykiss* is the principal aquaculture resource in Argentina, where most of the production takes place in freshwater reservoirs of North Patagonia. In these environments, there are frequent blooms of potentially PST- and microcystin-producing cyanobacteria of the genus *Dolichospermum*. Studies of our laboratory have analyzed the toxicity and cellular transport of cyanotoxins and arsenite in intact fish and in *ex vivo* preparations of *O. mykiss* intestine and liver (Bieczynski et al., 2014; Paineofilú et al., 2019).

The aim of this work was to evaluate the absorption and intracellular effects of PST in intestinal epithelial cells of *O. mykiss* middle intestine by measuring lysosomal membrane stability, ROS production, GSH content, GR and GST activity, and lipid peroxidation. Furthermore, we studied the interaction between PST and the MXR system through ABCC transport experiments in *ex-vivo* and *in vitro* preparations.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), MK571 sodium salt hydrate, glutathione (GSH), 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Dithiothreitol, Bovine serum albumin, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), Neutral red, Trypan blue, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and butylhydroxytoluene were purchased from Sigma (USA). Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) was purchased from Serva (Germany). 5-Sulfosalicylic acid was purchased from Mallinckrodt Chemicals (Ireland). Folin Ciocalteu reagent was purchased from Biopack (Argentina). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and acetic acid were purchased from Cicarelli (Argentina). Glutathione disulfide (GSSG) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (USA). Trichloroacetic acid and Thiobarbituric acid were purchased from Merck (Germany). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Anedra (Argentina). Sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) was purchased from Stanton (Argentina). Lysing matrix D was purchased from MP Bio-medicals (USA).

2.2. Paralytic shellfish toxin extracts

PST were extracted from cultures of *Alexandrium catenella* (PST 1) and *Alexandrium ostenfeldii* (PST2 and PST3) (Table 1). The cell pellet

Table 1

Relative Paralytic Shellfish Toxin (PST) profiles of the extracts used in the experiments. Total PST concentrations are expressed as μg saxitoxin toxicity equivalents L^{-1} (μg STXeq L^{-1}), μmol saxitoxin toxicity equivalents L^{-1} (μmol STXeq L^{-1}), according to FAO/WHO (2016), and as μmol PST L^{-1} .

	<i>A. catenella</i>		<i>A. ostenfeldii</i>		Molecular weight (g mol^{-1})
	PST1	PST2	PST3		
C1/C2	35.13	92.64	87.79	475.40	
GTX1/4	39.19	0.00	0.00	411.35	
GTX2/3	0.27	0.00	5.23	395.35	
B1	0.03	1.23	1.16	379.35	
NEO	23.67	0.00	0.00	315.29	
STX	1.61	6.13	5.82	299.29	
Total (μg STXeq L^{-1})	37.39	5.65	5.47		
Total (μmol STXeq L^{-1})	0.11	0.016	0.015		
Total (μmol PST L^{-1})	0.13	0.11	0.11		

was lysed with 500 μL of 0.03 N acetic acid and 0.9 g lysing matrix D in a sample disruption instrument (FastPrep®, Thermo Savant, Illkirch, France) and homogenized by reciprocal shaking at 6.5 ms^{-1} for 45 s. After this, samples were centrifuged at $16,100\times g$ at 4°C , for 15 min. The supernatant was filtered (0.45 μm pore size) and centrifuged at $800\times g$ for 30 s. The toxins contained in the extract were determined by HPLC/FLD with post-column derivatization (Column: Phenomenex Luna C18, 5 μm , $250 \times 4.6 \text{ mm}$) a detailed in [Van de Waal et al. \(2015\)](#).

2.3. Fish and experimental models

O. mykiss individuals ($280 \pm 40 \text{ g}$) were maintained in tanks with circulating freshwater ($T^\circ = 17 \pm 3.6^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.13 \pm 0.7$, $\text{DO} = 9.84 \pm 0.24 \text{ mg L}^{-1}$) from Chimehuin river, in the Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN, Argentina). Fish were fasted for 24 h before sacrificed by a blow to the head and decapitation. The middle intestine was removed, rinsed in Cortland solution and used for obtaining intestinal segments, isolated epithelium or isolated enterocytes. For all these preparations, the intestine of each individual was used to obtain the control and the treated preparations. Six to nine individuals were used for each experiment. These experimental protocols were approved by the Bioethics Committee, Faculty of Biochemical and Pharmaceutical Sciences, National University of Rosario, Argentina (6060/116).

The use of different experimental models allowed the measurement of a broad range of variables with more realistic to more detailed approaches. The intestinal segments allow to maintain the epithelium polarity to differentiate apical from basolateral transport. We used the isolated epithelium in *ex vivo* assays to avoid any interference from the sub-epithelial muscle layers and to obtain sensitive responses. Finally, the isolated enterocytes allowed the determination of reactive oxygen species (ROS) levels and lysosomal membrane stability.

2.3.1. Intestinal segments

According to [Bieczynski et al. \(2014\)](#), to prepare paired everted and non-everted preparations, the middle intestine was separated and cut into two transversal segments (one for control and the other for the treatment), weighed, ligated at both ends and filled with Cortland solution with a Teflon cannula attached to a Hamilton syringe. For the everted preparations, the segment was everted by sliding a crochet needle inside the intestine tube.

2.3.2. Isolated epithelium

The middle intestine was opened longitudinally and cut into strips. From each strip, the epithelial layer was separated from the muscular layer with a 170 μm thick PVC sheet. The isolated epithelium was incubated with PST according to the variable to be measured. After each incubation, the epithelium was put in ice-cold homogenization buffer (Tris 40 mM; KCl 150 mM; 0.5 mM EDTA), pH 8.6, and homogenized with a Cole-Parmer LabGen 7 homogenizer at 35,000 rpm. Homogenates were centrifuged at $9700\times g$ for 15 min at 4°C and supernatants were used for determinations.

2.3.3. Isolated enterocytes

Enterocytes were isolated according to the protocol described by [Kwong and Niyogi \(2012\)](#), with slight modifications. The middle intestine was cut into strips and incubated for 5 min in 5 mL of citrate buffer (pH 7.4) and 20 min in 5 mL of isolation buffer (154 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 5.5 mM glucose, pH 7.4). After this, enterocytes were removed from the muscular layer using a cell scraper and the clumped cells were carefully dispersed using a plastic pipette. The suspension was filtered through a 200 μm polyester mesh and centrifuged at $600\times g$ for 4 min, at 4°C . The pellet was washed and centrifuged 3 times using Cortland solution in order to remove the isolation buffer, and then resuspended in Cortland solution and filtered through a 75 μm polyester mesh. Cell viability and density were checked using the trypan blue (0.1%) exclusion method, in a Neubauer chamber

under a light microscope. Cell viability after the procedure was always higher than 90%.

2.4. Intracellular effects

2.4.1. Protein content in isolated epithelium

The results of the experiments conducted with isolated epithelium were referred to total soluble protein, which was the standardization variable with lowest variability in preliminary assays. Total protein content was measured in the supernatant of epithelium homogenates by the method of [Lowry et al. \(1951\)](#), using bovine serum albumin as standard and were expressed as $\text{mg protein mL}^{-1}$.

2.4.2. Glutathione and associated enzymes

We measured GSH content, GST activity, and glutathione reductase (GR) activity in isolated epithelium incubated for 1 h in glass vials with 3 mL of Cortland solution alone or plus 0.13 μM (50 $\mu\text{g L}^{-1}$) or 1.3 μM (500 $\mu\text{g L}^{-1}$) PST1. These concentrations were defined according to cellular PST contents and cell numbers reported for several dinoflagellate blooms ([Cembella et al., 2002](#); [Sephton et al., 2007](#); [Testai et al., 2016a](#); for a review).

GSH content was measured according to Ellman's method ([1959](#)), modified by [Venturino et al. \(2001\)](#). Supernatants (section 2.3.2) were deproteinized by treatment with 5% sulfosalicylic acid, final concentration and centrifuged at $6700\times g$ for 10 min. These supernatants were incubated for 5 min with 2 mM DTNB, final concentration, in 250 mM phosphate buffer, pH 8, and absorbance was read at 412 nm. The results were expressed in $\text{nmol GSH mg protein}^{-1}$.

GST activity was measured according to [Habig et al. \(1974\)](#). The absorbance was measured through 180 s in 100 mM phosphate buffer, pH 6.5, with 100 mM GSH and 100 mM CDNB as substrates. Activity was expressed in $\text{nmol s}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$.

GR activity was measured according to [Schaedle and Bassham \(1977\)](#), with modifications. Absorbance was read at 340 nm for 300 s in 143 mM phosphate buffer plus 6.3 mM EDTA, pH 7.5, with 0.13 mM NADPH and 10 mM GSSG as substrates. The activity was expressed in $\text{nmol s}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$.

2.4.3. Oxidative stress biomarkers

We measured catalase (CAT) activity and lipid peroxidation in supernatants of homogenates from isolated epithelium (section 2.3.2) incubated for 1 h in glass vials with 3 mL of Cortland solution alone or plus 0.13 μM or 1.3 μM of PST1 extract and ROS production in isolated enterocytes (section 2.3.3) incubated for 1 h in glass vials with 1 mL of Cortland solution alone, plus 0.13 μM PST1 extract, or plus 0.13 μM PST1 extract with 3 μM MK571.

CAT activity was measured according to [Aebi \(1984\)](#), with modifications. Absorbance was read at 240 nm for 30 s in 50 mmol L^{-1} phosphate buffer, pH 7 with 0.3 M H_2O_2 as substrate. Activity was expressed in $\text{nmol s}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$.

Lipid peroxidation was measured according to [Fraga et al. \(1988\)](#) by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method. Absorbance was read at 532 nm in a reaction mixture with 26 mM thiobarbituric acid, 2% HCl, 15% trichloroacetic acid and 100 mM butylhydroxytoluene. The results were expressed as $\mu\text{mol mg protein}^{-1}$.

ROS production was measured according to [Amado et al. \(2009\)](#) and [Moss and Bassem \(2006\)](#), with modifications. A suspension of isolated enterocytes (10^5 viable cells mL^{-1}) was added to the reaction buffer (30 mM Hepes, 200 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , pH 7.2), with 40 μM DCFDA as substrate. Fluorescence was recorded in a Qubit fluorometer (Invitrogen, USA) at 485/530 nm for 60 min. Fluorescence units measured along time were adjusted to a second order polynomial function and the area under the curve (AUC) was calculated and standardized to 5×10^4 viable cells mL^{-1} ([Amado et al., 2009](#)). Data are shown as percentage of the control.

2.4.4. Lysosomal membrane stability

Isolated enterocytes (10^6 viable cells mL^{-1} , final concentration) were incubated for 1 h in glass vials with 0.5 mL of Cortland solution and PST1 at seven increasing concentrations from 0 to $1.3 \mu\text{M}$. Then, the lysosomal membrane stability was evaluated using the Neutral Red Retention Time assay (NRRT50), according to Mamaca et al. (2005) and Dayeh et al. (2003), with modifications. After incubation with PST, the isolated enterocytes were incubated with $66 \mu\text{M}$ (final concentration) neutral red dye for 5 min. Each sample was observed under a light microscope and the number of red stained cells was counted every 10 min, until reaching 50% of the total cells. The results were expressed as neutral red retention time 50% (NRRT50, min). Data were adjusted to a non-linear regression analysis of NRRT50 (as percentage of the control) vs. log PST concentration.

2.5. ABCC activity

The experiments of this section are based on that CDNB is a membrane permeant compound, which diffuses into the cell, where it is conjugated with GSH in a reaction catalyzed by GST. The conjugation product, dinitrophenyl-S-glutathione (DNP-SG) is exported by ABCC proteins from the cell to the external bath, where it is detected spectrophotometrically (Fig. 1).

2.5.1. DNP-SG transport in isolated epithelium

We studied the effects of three PST extracts (PST1, PST2 and PST3) on DNP-SG transport rate in isolated intestinal epithelium. We incubated isolated epithelium strips in glass vials with 3 mL of Cortland solution

plus $200 \mu\text{M}$ of CDNB. All PST extracts were applied at final concentrations of $0.13 \mu\text{M}$ for PST1 and $0.11 \mu\text{M}$, for PST2 and PST3. These concentrations are equivalent to $50 \mu\text{g L}^{-1}$ for all extracts. Transport rate results were expressed as $\text{nmol DNP-SG mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

2.5.2. DNP-SG transport in intestinal segments

The effects of PST on the apical (luminal) and basolateral DNP-SG transport were studied in paired everted and non-everted intestinal segments, respectively. In both types of preparation, the PST were applied either at the apical or at the basolateral side, in order to study the permeability of both membranes to PST. In all cases, CDNB was added in the bathing solution (Fig. 1). PST2 was selected for this experiment because it was the most effective in the previous experiment with isolated epithelium.

DNP-SG absorbance was measured at 340 nm every 10 min for 1 h and the DNP-SG transport rate was calculated as the slope of a cumulative absorbance vs. time plot, and using an extinction coefficient of 9.6 mM cm^{-1} . The transport rate was normalized to wet tissue mass and the result for each individual was calculated as percentage of the corresponding control. The specificity of the assay for DNP-SG transport was previously confirmed in similar preparations by HPLC analysis (Bieczynski et al., 2014).

2.5.3. Effects of ABCC transport inhibition on PST cytotoxicity

In order to investigate whether PST are exported by ABCC transporters, we studied NRRT50, as a cell toxicity marker, in enterocytes treated with PST and the ABCC transport inhibitor MK571. We incubated a suspension of isolated enterocytes (10^6 viable cells mL^{-1} , final

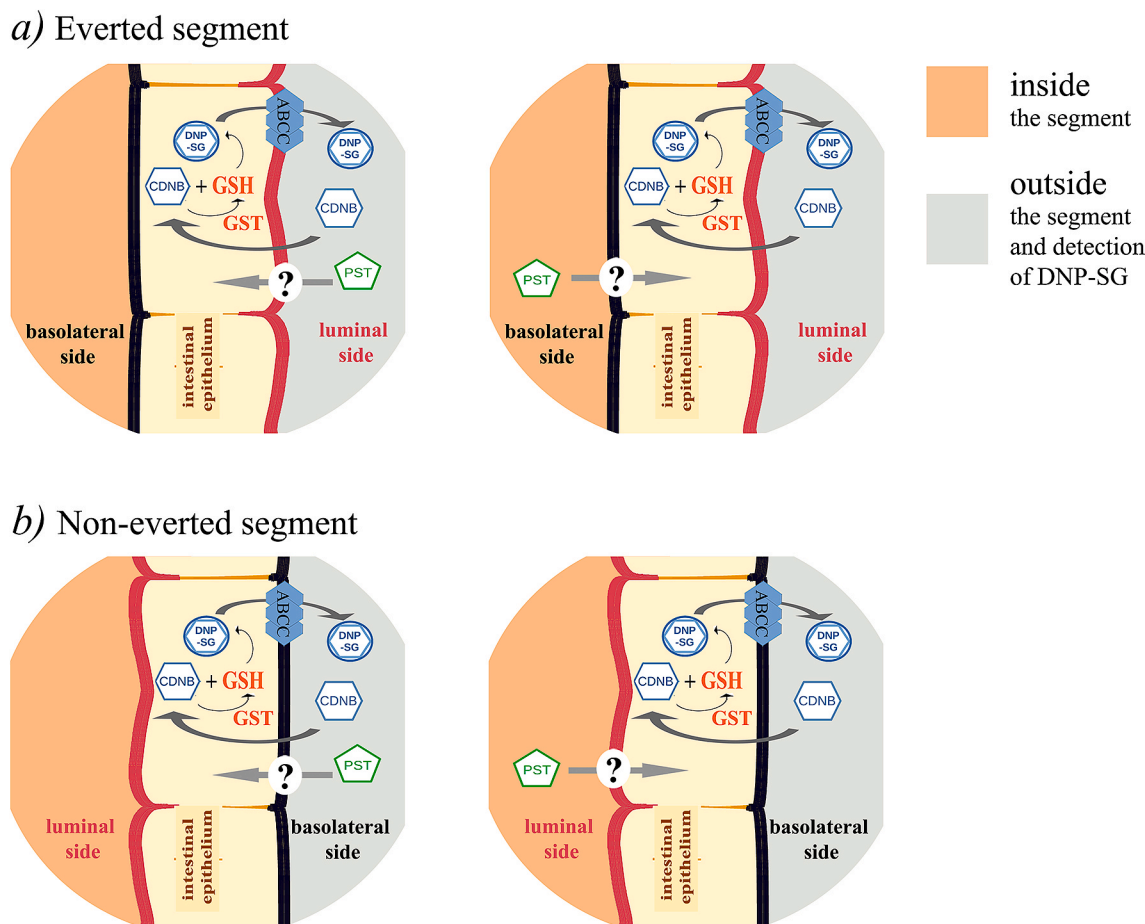


Fig. 1. Ex-vivo exposure design used to study polarized DNP-SG transport in *Oncorhynchus mykiss* middle intestine. Different preparations allowed the study of different possible routes of PST uptake and exportation by the cell a) Everted segments. b) Non-everted segments. In all the preparations DNP-SG concentration was measured in the bathing solution.

concentration) for 1 h with 0.0033 μM PST1, with or without 0.1 μM MK571, dissolved in DMSO. This MK571 concentration was selected from a preliminary study of the concentration-dependent effects of this inhibitor on NRRT50 in isolated enterocytes (Fig. 6a) and on DNP-SG transport assays (Fig. 6b). In NRRT50 assays, we included a solvent control (DMSO). In both, NRRT50 and DNP-SG transport assays, the DMSO concentration was lower than 0.002%.

2.6. Statistics

Bartlett's test was used to check homogeneity of variance and Kolmogorov-Smirnov test was used for checking normality. Differences among treatments were tested by paired Student's t-test, or repeated measures one-way ANOVA. We used Dunnett's *pos hoc* comparisons when the treatments were compared against the control, and Tukey's *pos hoc* comparisons for comparing among treatments. $P < 0.05$ was considered as statistically significant (Zar, 1999). The arcsine square root transformation was applied before analyzing percentage data.

3. Results

3.1. Intracellular effects

3.1.1. Glutathione and GSH-associated enzymes

The intracellular glutathione metabolism was affected by 1 h of *ex vivo* exposure to PST1 in the intestinal epithelium. The GSH content was diminished by 16.33% after exposure to 0.13 μM PST1 and by 16.24%, with 1.3 μM PST1 (repeated measures, one-way ANOVA and Dunnett's *pos hoc* comparisons, $F_{1,2, 9,3} = 1.50$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, $n = 9$) (Fig. 2a). GST activity decreased 19.3% after exposure to 0.13 μM PST1 (repeated measures, one-way ANOVA and Dunnett's *pos hoc* comparisons, $F_{1,9, 11,6} = 4.639$, $p < 0.05$, $n = 7$) but was not affected by 1.3 μM PST1 (Fig. 2b). GR activity increased 14.27% with 0.13 μM PST1 and 15.64% with 1.3 μM PST1 but the effect was statistically significant only at the highest PST1 concentration (repeated measures, one-way ANOVA and Dunnett's *pos hoc* comparisons, $F_{1,7, 11,6} = 6.483$, $p < 0.05$, $n = 8$) (Fig. 2c).

3.1.2. Oxidative stress biomarkers

There were no significant effects of PST1 on the oxidative status of the middle intestine epithelium. Neither CAT activity nor lipid peroxidation in isolated epithelium were affected by PST1 (Fig. 3). ROS production in isolated enterocytes was not significantly augmented by 0.13 μM PST1, neither by PST1 plus 3 μM MK571 (Fig. 3).

3.1.3. Lysosomal membrane stability

Lysosomal membrane stability was evaluated in order to find a sensitive marker for intracellular effects of PST. We registered a concentration-dependent effect of PST1, which fitted to a non-linear regression of NRRT50 (as percentage of the control) vs. log PST concentration ($\text{IC}_{50} = 0.0045 \mu\text{M}$ PST1; 95% CI = 0.0016 to 0.0125; $r^2 = 0.80$; $n = 6-7$) (Fig. 4).

3.2. ABCC activity

3.2.1. DNP-SG transport

All the tested PST extracts inhibited DNP-SG transport in isolated intestinal epithelium with respect to the control preparations (30.08, 50.66 and 32.26% for PST1, PST2 and PST3, respectively (repeated measures, one-way ANOVA and Dunnett's *pos hoc* comparisons, $F_{2,2, 13,1} = 16.82$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively, $n = 7$) (Fig. 5a).

According to these results, PST2 was selected for performing the assays with everted intestine segments. PST2 inhibited the basolateral DNP-SG transport by 17.62%, but only when it was applied at the apical side (paired Student's t-test, $t_7 = 3.99$, $p < 0.01$, $n = 8$) (Fig. 5b). There was no effect of PST2 on apical DNP-SG transport.

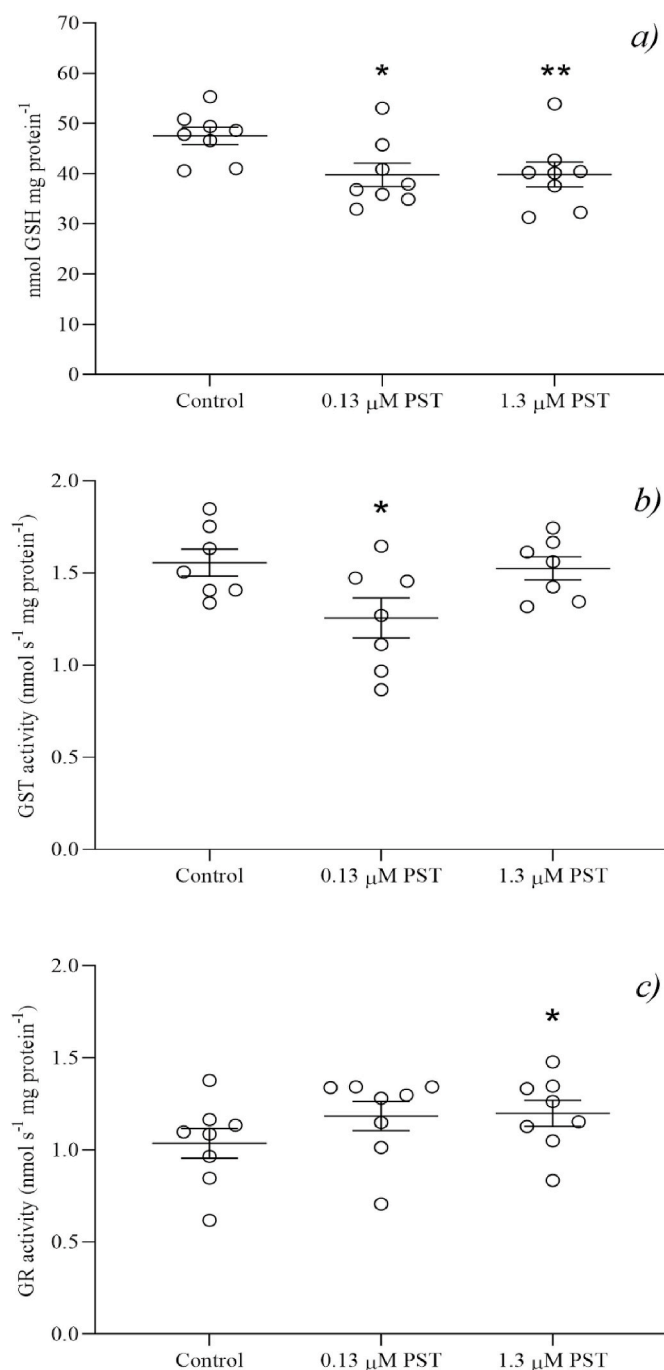


Fig. 2. Glutathione (GSH) content, and glutathione-S transferase (GST) and glutathione reductase (GR) activity in isolated *Oncorhynchus mykiss* middle intestine epithelium exposed *ex vivo* for 1 h to 0.13 μM and 1.3 μM PST1. Asterisks denote significant differences among treatments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). a) GSH content ($n = 9$). b) GST activity ($n = 7$). c) GR activity ($n = 8$).

3.2.2. Effects of ABCC transport inhibition on PST cytotoxicity

In a preliminary experiment with, isolated enterocytes, the exposure to 0.1–3 μM of the ABCC transport inhibitor MK571, decreased NRRT50 in a concentration-dependent fashion (Fig. 6a). In addition, 0.1 μM MK571 proved to be effective for inhibiting DNP-SG transport (one-way ANOVA and Dunnett's *post hoc* comparisons, $F_{2, 21} = 4.74$, $p < 0.05$, $n = 6-9$) (Fig. 6b). Consequently, we chose the lowest MK571 concentration (0.1 μM) for the following assays, in order to avoid the effect of MK571 on NRRT50 as much as possible.

In the isolated enterocytes exposed to 0.1 μM MK571, NRRT50 was

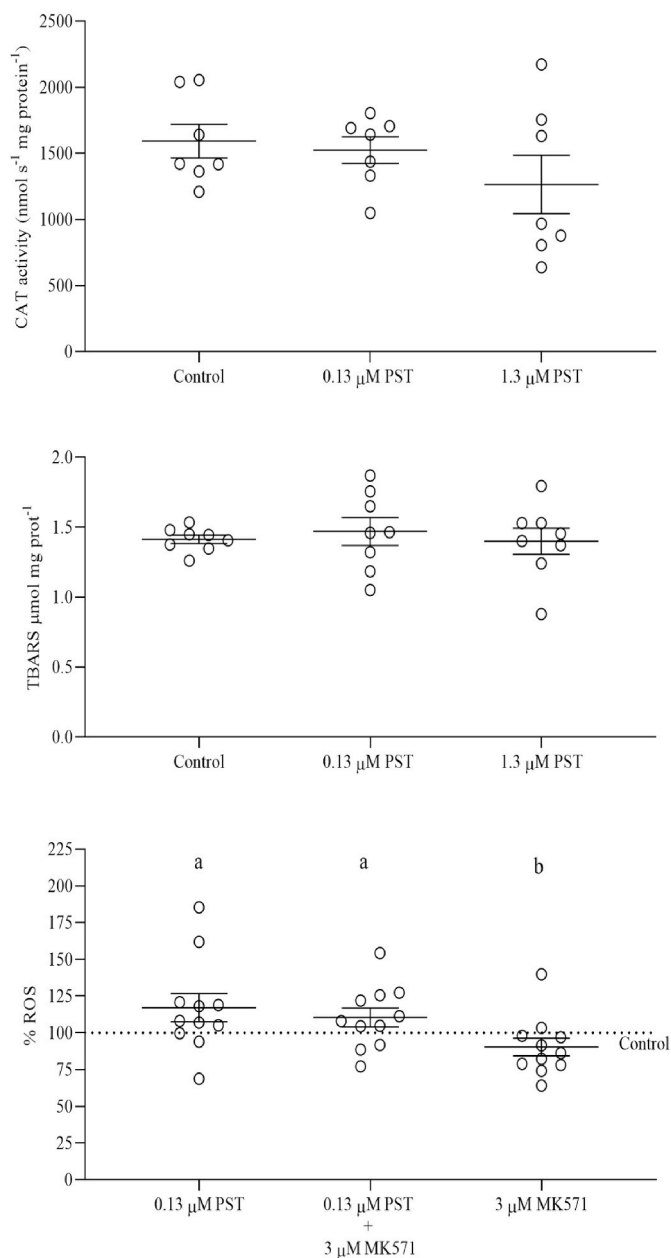


Fig. 3. Oxidative stress biomarkers in isolated *Oncorhynchus mykiss* middle intestine epithelium exposed *ex vivo* for 1 h to 0.13 μM and 1.3 μM PST1 (a, b) and to 0.13 μM PST1, 0.13 μM PST1 plus 3 μM of the ABC transport inhibitor MK571 and 3 μM MK571 (c). a) Catalase activity (n = 7); b) Lipid peroxidation (TBARS, n = 8); c) Reactive oxygen substances (ROS) level as % of the control (n = 7); different letters indicate significant differences among treatments with $p < 0.05$.

reduced by 18.17%, with respect to the control, but this effect was not statistically significant. In turn, in the isolated enterocytes exposed to 0.0033 μM PST1, NRRT50 was 51.40% lower than in control enterocytes (Tukey's *post hoc* comparisons, $F_{3, 15} = 27.99$, $p < 0.0001$, n = 6). The co-exposure to 0.0033 μM PST1 plus 0.1 μM MK571 reduced NRRT50 by 65.85%, with respect to the control (Tukey's *post hoc* comparisons, $F_{3, 15} = 27.99$, $p < 0.0001$, n = 6). There were not significant differences between the effects of PST1 alone and PST1 plus 0.1 μM MK571 (Fig. 6c).

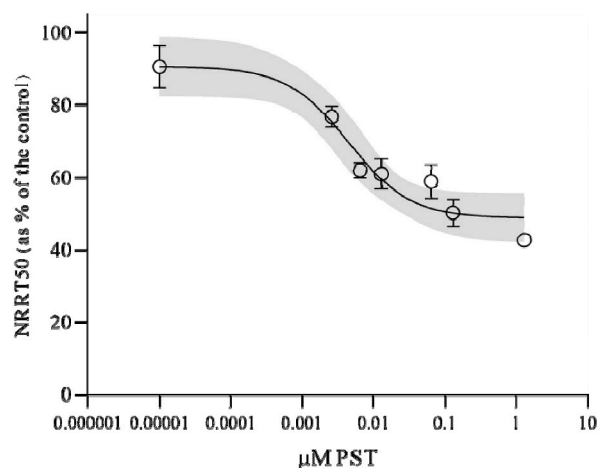


Fig. 4. Lysosomal damage in isolated *Oncorhynchus mykiss* enterocytes exposed *in vitro* for 1 h to PST1. Non-linear regression curve for log PST1 concentration (μM) vs. neutral red retention time 50% (NRRT50) (min) expressed as percentage of the control. Values are mean \pm SEM (n = 6–7), $\text{IC}_{50} = 0.0045$ μM PST1, 95% CI = 0.0016 to 0.0125 (grey area), $r^2 = 0.80$.

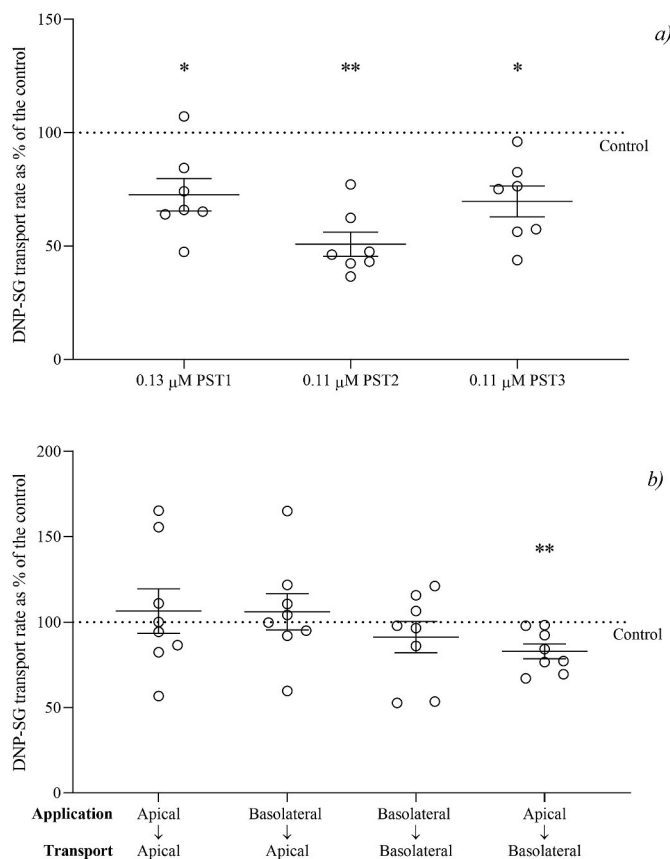


Fig. 5. DNP-SG transport rate as percentage of the control in *Oncorhynchus mykiss* middle intestine preparations. a) Isolated epithelium (n = 7). b) Everted and non-everted segments (n = 8). The statistical analysis was run with raw data. Asterisks denote significant differences with respect the the control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4. Discussion

This study provides evidence on the absorption of PST by the middle intestine epithelium of *O. mykiss* obtained in *ex vivo* and *in vitro* experiments. The obtained results show, for the first time, that these toxins are

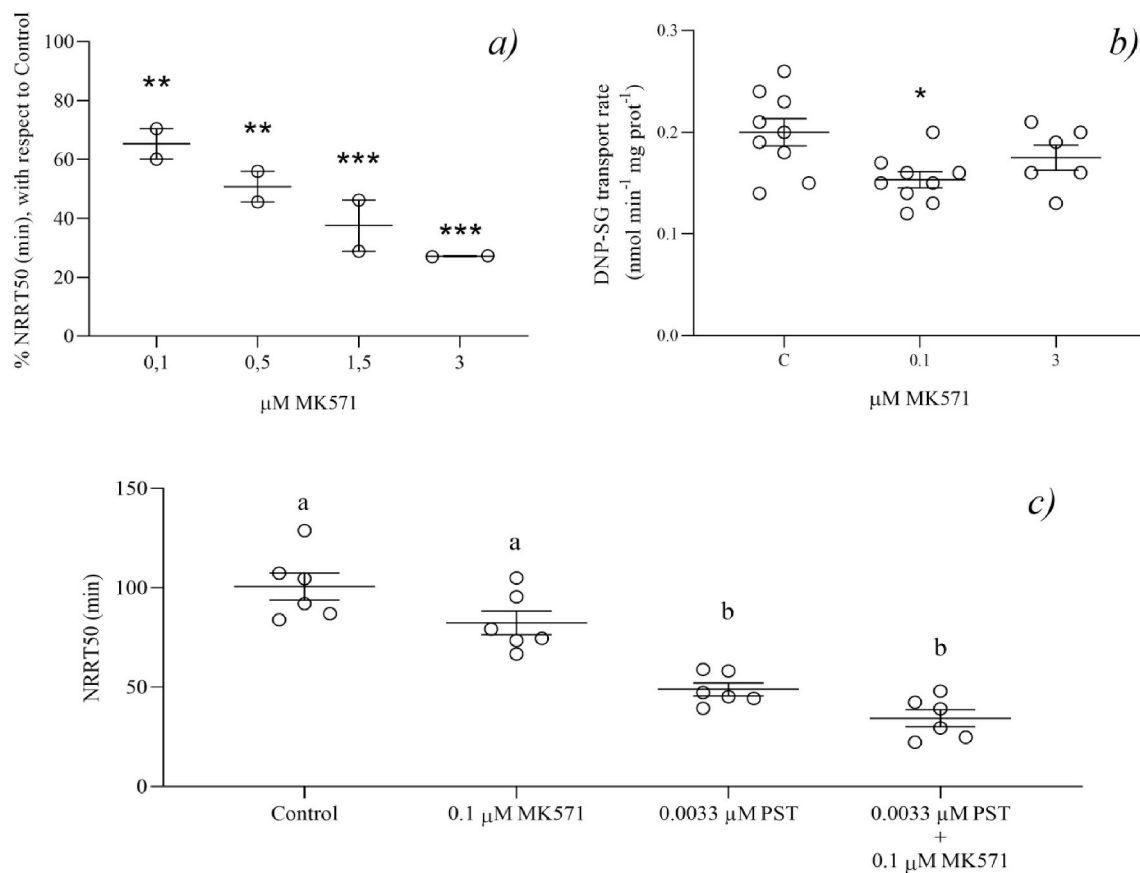


Fig. 6. Lysosomal membrane stability (as NRRT50) and DNP-SG transport in *Oncorhynchus mykiss* middle intestine preparations. a) NRRT50, expressed as % of the control, in isolated enterocytes incubated with 0.1–3 μM of the ABCC transport inhibitor MK571 (n = 2). b) DNP-SG transport rate in isolated intestinal epithelium incubated with 0.1 or 3 μM MK571 (n = 5–9). Asterisks denote significant differences with respect to the control calculated with raw data (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). c) NRRT50 in isolated enterocytes exposed to 0.1 μM MK571, 0.0033 μM PST or 0.0033 μM PST + 0.1 μM MK571, for 1 h. Different characters indicate significant differences among groups ($p < 0.01$, n = 6).

taken up by the cells of fish intestine epithelium, affect glutathione metabolism and produce cytotoxic effects even after a short exposure (1 h) to PST concentrations below the recommended values for drinking water. We also show for, the first time, that PST interfere with the MXR defense system by inhibiting ABCC-mediated transport.

Several works report that in mammals, including humans, PST are absorbed in the intestine through paracellular transport (Andrinolo et al., 2002a, 2002b; Torres et al., 2007) and that their elimination takes place mostly in the kidney by glomerular filtration. However, reports on the presence of PST in bile (García et al., 2004, 2010; Gessner et al., 1997) and the report of STX being transported through ABCB1 (Pgp) in a mouse hippocampal cell line (Ramos et al., 2018) suggest that PST can be transported transcellularly by active transporters such as ABC proteins.

In contrast, PST intestinal absorption in fish has received little attention. Gao et al. (2019) reported that the seawater pufferfish *Takifugu pardalis* fed with tetrodotoxin (TTX) and STX rapidly accumulates TTX in specific tissues while most STX remains in the intestine. The opposite occurs with the freshwater pufferfish *Pao suvattii*, which accumulates STX in skin, ovary and intestine but keeps little or no TTX in the body (Gao et al., 2019). These studies do not analyze the mechanisms by which a specific toxin can cross the intestinal wall, while the other cannot, but suggest the selectivity of fish intestine for different toxins. However, as far as we know, there are no reports on the transcellular uptake of PST in vertebrates' intestine, neither on intracellular effects of PST in this organ.

GSH depletion is generally regarded as indicative of pro-oxidant conditions since GSH is oxidized to GSSG in the presence of ROS

(Deponte, 2013; Meister and Anderson, 1983; Wu et al., 2004). We have found that 0.13 μM PST1 causes a mild but significant decrease of intracellular GSH content, but the effect is not increased at a higher PST1 concentration (1.3 μM PST1). Accordingly, the increase in GR activity at the highest PST1 concentration could explain the lack of concentration dependence in GSH content through augmented recycling of GSSG to GSH. The fact that the increase in GR activity seems to stabilize the GSH content but does not reverse the depletion suggests that GSH is being consumed or oxidized in some biotransformation reaction. In this sense, the conversion between PST analogues, such as GTXs into SXTs, with the formation of thiol-conjugated intermediates, has been demonstrated by Sato et al. (2000) and Sakamoto et al. (2000) for bacteria and in laboratory reactions. In bivalves, N-sulfocarbamoyl toxins (C1 and C2) are reduced to carbamoyl toxins (GTX1-GTX4, NEO and STX) (Cembella et al., 1994; Asakawa et al., 1987). In fish, this kind of biotransformation has been suggested in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) and in the white seabream (*Diplodus sargus*), respectively Gubbins et al. (2000) and Costa et al. (2011). Considering that PST1 contains 39% GTX1/4 and 35% of C1/2, the decrease in GSH content observed in our experiment could reflect the occurrence of biotransformation reactions that involve GSH conjugation and/or oxidation in *O. mykiss* enterocytes. Another alternative explanation for the observed decrease in GSH content of enterocytes could be the exportation of GSH from the cells as a co-substrate for the transport of toxins through ABCC proteins.

The participation of GST in the detoxification of PST is still unclear. In fish, GST activity has been reported to increase after exposure to PST (Calado et al., 2020; Clemente et al., 2010; Gubbins et al., 2000), or to decrease (Silva et al., 2011; Barbosa et al., 2019), while in mice and in

cladoceran crustaceans, PST have no effect on GST activity (Ferrão-Filho et al., 2017; Hong et al., 2003). An increase in GST activity can be related with increased antioxidant and/or biotransformation activity (Calado et al., 2020; Stephensen et al., 2002; Paineofilú et al., 2019). In the present work, we observe a decrease in GST activity with 0.13 μM PST1, which could be related to GSH depletion; however, this effect is not evident at higher PST1 concentration (1.3 μM). At this concentration, GR activity is significantly increased and could provide GSH by reducing GSSG to maintain GST activity, at least in the short term (Li et al., 2011; Vieira et al., 2009). However, we could not measure GSSG content to further support this idea.

All the PST extracts studied in this work inhibited the DNP-SG transport. According to their composition (see Table 1), PST2 and PST3 should be 6-fold less neurotoxic than PST1. On the other hand, PST2 resulted the most potent transport inhibitor (50% at 0.11 μM). In the experiments with polarized preparations, PST2 was able to inhibit basolateral but not apical DNP-SG transport, which differs from previous reports by our group, in which microcystin-LR and arsenite have inhibited DNP-SG transport at both sides of *O. mykiss* intestinal epithelium (Bieczynski et al., 2014; Paineofilú et al., 2019). In addition, PST2 inhibited basolateral transport only when it was applied to the apical side. This suggests that at least one of the toxins contained in PST2 can cross the apical membrane of the enterocytes and inhibit DNP-SG transport through basolateral ABCC proteins either as competitive (substrate) or noncompetitive inhibitor. This also suggests that PST do not enter the enterocytes from the blood.

García et al. (2010, 2009) have proposed that PST can be detoxified by oxidation followed by glucuronidation, which is considered an important process for detoxification of xenobiotics in rainbow trout (Clarke et al., 1991, for a review; Lahti et al., 2011). Besides, glucuronide conjugates have been described as substrates for basolateral ABC transporters, such as ABCC3 and ABCC4 (Bai et al., 2004; Deeley et al., 2006, for a review; Zamek-Gliszczynski et al., 2006, for a review). Unlike the apical ABCC2, human basolateral ABCCs, especially ABCC3 have more affinity for glucuronide conjugates than for GSH conjugates such as DNP-SG (Zamek-Gliszczynski et al., 2006). Thus, the possible transport of glucuronide-conjugated PST through ABCC3 and/or ABCC4 in *O. mykiss* deserves further analysis.

In order to gather more evidence about the possible transport of PST or their metabolites through basolateral ABCC proteins, we have studied the effects of PST1 alone or combined with the ABCC inhibitor MK571. PST1 significantly reduces NRRT50, but blocking ABCCs with MK571 does not increase this effect, as it would be expected, if PST were transported through ABCCs (Bieczynski et al., 2014, 2016). Thus, PST components would more likely inhibit basolateral ABCC-mediated transport by a non-competitive mechanism.

The strong concentration-dependent effect of PST1 on lysosomal neutral red retention ($\text{IC}_{50} = 0.0045 \mu\text{M}$ ($1.34 \mu\text{g STXeq L}^{-1}$)) shows that these toxins are absorbed into *O. mykiss* enterocytes and are cytotoxic at concentrations that are lower than the guideline values for drinking water (3 $\mu\text{g STXeq L}^{-1}$ for children, and 20 $\mu\text{g STXeq L}^{-1}$ for adults, WHO, 2019). Besides the considerations for human health, this finding suggests that PST producing blooms could affect the digestive system of fish, particularly in aquaculture facilities, at non-neurotoxic concentrations (FAO, 2016; Testai et al., 2016b). The observed cytotoxic effects could be explained by toxin binding to voltage-gated Na^+ and/or Ca^+ channels in the lysosomal membrane, which are critical for lysosomal functions (Xu and Ren, 2016). This also suggests NRRT50 in *O. mykiss* enterocytes as a sensitive end-point for PST toxicology.

5. Conclusions

In *O. mykiss*, PST present in the intestinal lumen are absorbed into the epithelial cells and produce cytotoxic effects, even at low concentrations. This means that the digestive physiology of fish can be altered when are exposed to blooms or surface scums of PST producing

microorganisms, e.g. in aquaculture facilities. These alterations can produce adverse consequences in fish health and growth, in the absence of visible neurotoxic effects. In addition, the fact that PST inhibit the basolateral ABCC transporters suggests that these toxins can enhance the toxicity of other toxins by delaying their transport out of the intestinal cells. Particularly, microcystin-LR can be produced together with PST by freshwater cyanobacteria and are exported from fish intestinal cells through ABCC proteins.

We can conclude that PST are not eliminated from *O. mykiss* intestinal cells by ABCC transporters but affect their function. Thus, the participation of other xenobiotic transporters, which are expressed in the intestine and in other organs of fish, such as ABCB1 and ATP-binding cassette class G protein 2 (ABCG2), together with biotransformation enzymes, should be investigated in order to understand PST detoxification and transport in fish.

Ethics approval

The experimental protocols were approved by the Bioethics Committee, Faculty of Biochemical and Pharmaceutical Sciences, National University of Rosario, Argentina (6060/116).

Credit author statement

Julio C. Paineofilú: Conceptualization, Methodology, Investigation, Visualization, Formal analysis, Writing- Original Draft. Virginia A. Bianchi: Investigation. Bernd Krock: Methodology, Writing-Review & Editing. Julieta S. De Anna: Investigation. Gisela Kristoff, Writing-Reviewing and Editing. Carlos M. Luquet: Conceptualization, Resources, Supervision, Writing- Reviewing and Editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants CONICET PIP 11220130100529CO; and ANPCYT-PICT 2013-1415 and 2018-02653 to CML. We would like to thank the Centro de Ecología Acuática del Neuquén staff, particularly to Pablo Hualde, Pablo Morzenti and Water Torres for their kind help with fish and aquaria.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Amado, L.L., García, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115–2123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>.
- Andrinolo, D., Gomes, P., Fraga, S., Soares-da-Silva, P., Lagos, N., 2002a. Transport of the organic cations gonyautoxin 2/3 epimers, a paralytic shellfish poison toxin, through the human and rat intestinal epitheliums. *Toxicol.* 40, 1389–1397.
- Andrinolo, D., Iglesias, V., García, C., Lagos, N., 2002b. Toxicokinetics and toxicodynamics of gonyautoxins after an oral toxin dose in cats. *Toxicol.* 40, 699–709.
- Asakawa, M., Takagi, M., Iida, A., Oishi, K., 1987. Studies on the conversion of Paralytic Shellfish Poison (PSP) components by biochemical reducing agents. *Eisei Kagaku* 33, 50–55.
- Bai, J., Lai, L., Ching, H., Cher, B., Tan, T.M.C., 2004. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediates efflux of bimane-glutathione. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 247–257. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00236-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00236-X).
- Bakke, J.M., Horsberg, T.E., 2007. Effects of algal-produced neurotoxins on metabolic activity in telencephalon, optic tectum and cerebellum of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 85, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.08.003>.
- Bakke, J.M., Horsberg, T.E., 2010. Kinetic properties of saxitoxin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, C 152, 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.07.005>.
- Bakke, M.J., Hustoft, H.K., Horsberg, T.E., 2010. Subclinical effects of saxitoxin and domoic acid on aggressive behaviour and monoaminergic turnover in rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 99, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.03.013>.
- Barbosa, B., Santos, M., Anacleto, P., Maulvault, A.L., Pousão-Ferreira, P., Costa, P.C., Marques, A., 2019. Paralytic shellfish toxins and ocean warming: bioaccumulation and ecotoxicological responses in juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Toxins* 11, 408. <https://doi.org/10.3390/toxins11070408>.
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00088-6).
- Bieczynski, F., Anna, J.S. De, Pirez, M., Brena, B.M., Villanueva, S.S.M., Luquet, C.M., 2014. Cellular transport of microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across the intestinal wall: possible involvement of multidrug resistance-associated proteins. *Aquat. Toxicol.* 154, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.003>.
- Bieczynski, F., Torres, W.D.C., Paineñilú, J.C., Castro, J.M., Bianchi, V.A., Frontera, J.L., Paz, D.A., González, C., Martín, A., Villanueva, S.S.M., Luquet, C.M., 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. *Aquat. Toxicol.* 178, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.016>.
- Bricelj, V.M., Shumway, S.E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.* 6 (4), 315–383.
- Calado, S.L. de M., Santos, G.S., Vicentini, M., Bozza, D.C., Prodocimo, V., Magalhães, V. F. de, Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2020. Multiple biomarkers response in a Neotropical fish exposed to paralytic shellfish toxins (PSTs). *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124616>.
- Catterall, W.A., 1980. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 15–43. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.20.040180.000311>.
- Cembella, A., Quilliam, M., Lewis, N., Bauder, A., Dell'Aversano, C., Thomas, K., Jellett, J., Cusack, R., 2002. The toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the probable cause of mortality of caged salmon in Nova Scotia. *Harmful Algae* 1, 313–325. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(02\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00048-3).
- Cembella, A.D., Shumway, S.E., Larocque, R., 1994. Sequestering and putative biotransformation of paralytic seasonal and spatial scales in natural populations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 180, 1–22.
- Clarke, D.J., George, S.G., Burchell, B., 1991. Glucuronidation in fish. *Aquat. Toxicol.* 20, 35–56.
- Clemente, Z., Busato, R.H., Oliveira, C.A., Cestari, M.M., Magalha, F., Wosiack, A.C., Silva, H.C., Assis, D., Ramsdorf, W.A., 2010. *Toxic Analyses of Paralytic Shellfish Toxins and Biomarkers in a Southern Brazilian Reservoir*, vol. 55, pp. 396–406. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.09.003>.
- Costa, P.R., Lage, S., Barata, M., Pousao-Ferreira, P., 2011. Uptake, transformation, and elimination kinetics of paralytic shellfish toxins in white seabream (*Diplodus sargus*). *Mar. Biol.* 158, 2805–2811. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1779-3>.
- Costa, P.R., Pereira, P., Guilherme, S., Barata, M., Nicolau, L., Santos, M.A., Pacheco, M., Pousão-Ferreira, P., 2012. Biotransformation modulation and genotoxicity in white seabream upon exposure to paralytic shellfish toxins produced by *Gymnodinium catenatum*. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.023>.
- Dayeh, V.R., Bols, N.C., Schirmer, K., Lee, L.E.J., 2003. The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants. *Curr. Protoc. Toxicol.* 15, 1–7. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx010515>.
- Deeds, J.R., Landsberg, J.H., Etheridge, S.M., Pitcher, G.C., 2008. Non-traditional Vectors for Paralytic Shellfish Poisoning, pp. 308–348. <https://doi.org/10.3390/md20080015>.
- Deeley, R.G., Westlake, C., Cole, S.P.C., 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol. Rev.* 86, 849–899. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2005>.
- Deponte, M., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3217–3266. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., MacManus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T., 2008. Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3914–3920. <https://doi.org/10.1021/es07187v>.
- Etheridge, S.M., 2010. Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives. *Toxicol.* 56, 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.12.013>.
- FAO/WHO, 2016. *Technical paper on toxicity equivalency factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs*.
- Ferrão-Filho, A.S., Abreu, S.S.D., Oliveira, T.A., Magalhães, V.F., Pflugmacher, S., Silva, S. M., 2017. Single and combined effects of microcystin- and saxitoxin-producing cyanobacteria on the fitness and antioxidant defenses of cladocerans. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 2689–2697. <https://doi.org/10.1002/etc.3819>.
- Ferrão-Filho, A.S., Kozlowsky-Suzuki, B., 2011. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Mar. Drugs* 9, 2729–2772. <https://doi.org/10.3390/md9122729>.
- Fraga, C.G., Leibovitz, B.E., Tappel, A.L., 1988. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic. Biol. Med.* 4, 155–161. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90023-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90023-8).
- Galvão, J.A., Oetterer, M., Bittencourt-Oliveira, M.C., Gouvêa-Barros, S., Hiller, S., Erler, K., Lucas, B., Pinto, E., Kujbida, P., 2009. Saxitoxins accumulation by freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption. *Toxicol.* 54, 891–894. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.06.021>.
- Gao, W., Kanahara, Y., Yamada, M., Tatsuno, R., Yoshikawa, H., Doi, H., Takatani, T., Arakawa, O., 2019. Contrasting toxin selectivity between the marine pufferfish *Takifugu pardalis* and the freshwater pufferfish *Pao suvattii*. *Toxins* 11 (470), 1–11. <https://doi.org/10.3390/toxins11080470>.
- García, C., Barriga, A., Díaz, J.C., Lagos, M., Lagos, N., 2010. Route of metabolism and detoxification of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicol.* 55, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.07.018>.
- García, C., Bravo, M., del, C., Lagos, M., Lagos, N., 2004. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicol.* 43, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2003.11.018>.
- García, C., Rodríguez-Navarro, A., Díaz, J.C., Torres, R., Lagos, N., 2009. Evidence of *in vitro* glucuronidation and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins by healthy human liver microsomes fraction. *Toxicol.* 53, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2008.10.028>.
- Gessner, B.D., Bell, P., Doucette, G.J., Moczydlowski, E., Poli, M.A., Van Dolah, F., Hall, S., 1997. Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicol.* 35, 711–722. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00154-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00154-7).
- Grolleau, F., Gamelin, L., Boisdron-Celle, M., Lapiet, B., Pelhate, M., Gamelin, E., 2001. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J. Neurophysiol.* 85, 2293–2297. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.5.2293>.
- Gubbins, M.J., Eddy, F.B., Gallacher, S., Stagg, R.M., 2000. Paralytic shellfish poisoning toxins induce xenobiotic metabolising enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar. Environ. Res.* 50, 479–483.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7140.
- Hong, H., Lam, P.K.S., Hsieh, D.H.S., 2003. Interactions of paralytic shellfish toxins with xenobiotic-metabolizing and antioxidant enzymes in rodents. *Toxicol.* 42 (4), 425–431. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00175-2).
- Kellmann, R., Ploux, O., Neilan, B.A., 2013. Neurotoxic alkaloids from cyanobacteria. In: Ramawat, K.G., Merillon, J.-M. (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer Berlin Heidelberg, p. 4285. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>.
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 23–43. <https://doi.org/10.3109/10408449209145320>.
- Kwong, R.W.M., Niyogi, S., 2012. Cadmium transport in isolated enterocytes of freshwater rainbow trout: interactions with zinc and iron, effects of complexation with cysteine, and an ATPase-coupled efflux. *Comp. Biochem. Physiol.*, C 155, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.09.001>.
- Lagos, N., 2003. Paralytic shellfish poisoning phycotoxins: occurrence in South America. *Comments Toxicol.* 9, 175–193. <https://doi.org/10.1080/08865140390215053>.
- Lahti, M., Brozinski, J.-M., Jylha, A., Kronberg, L., Oikari, A., 2011. Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1403–1411. <https://doi.org/10.1002/etc.501>.
- Lefebvre, K.A., Trainer, V.L., Scholz, N.L., 2004. Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin. *Aquat. Toxicol.* 66, 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.08.006>.
- Li, Z., Li, P., Randak, T., 2011. Evaluating the toxicity of environmental concentrations of waterborne chromium (VI) to a model teleost, *Oncorhynchus mykiss*: a comparative study of *in vivo* and *in vitro*. *Comp. Biochem. Physiol.*, C 153, 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.01.005>.
- Lopes, V.M., Baptista, M., Repolho, T., Rosa, R., Reis, P., 2014. Uptake, transfer and elimination kinetics of paralytic shellfish toxins in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquat. Toxicol.* 146, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.011>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lukowski, A.L., Denomme, N., Hinze, M.E., Hall, S., Isom, L.L., Narayan, A.R.H., 2019. Biocatalytic detoxification of paralytic shellfish toxins. *ACS Chem. Biol.* 14, 941–948. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00123>.
- Madigan, T., Malhi, N., Tan, J., McLeod, C., Stewart, I., Harwood, T., Mann, G., Turnbull, A., 2018. Experimental uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in Southern Rock Lobster, *Jasus edwardsii*. *Toxicol.* 143, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2018.01.001>.
- Mamaca, E., Bechmann, R.K., Torgrimsen, S., Aas, E., Bjørnstad, A., Baussant, T., Floch, S. L., 2005. The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquat. Toxicol.* 75, 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.001>.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711–760.
- Montoya, N.G., Akselman, R., Pajaro, M., Perrota, R.G., Carreto, J.I., 1997. Presencia de veneno paralizante de moluscos en hígado de caballa de la región costera bonaerense. *Rev. Invest. Desarro. Pesq.* 11, 145–152.
- Moss, B., Bassem, A., 2006. Fluorometric measurement of oxidative burst in lobster hemocytes and inhibiting effect of pathogenic bacteria and hypoxia. *J. Shellfish Res.* 25 (3), 1051–1057. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2006\)25\[1051:FMOOB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[1051:FMOOB]2.0.CO;2).
- Myint, K., Biswas, R., Li, Y., Jong, N., Jamieson, S., Liu, J., Han, C., Squire, C., Merien, F., Lu, J., Nakanishi, T., Tamai, I., Mckeage, M., 2019. Identification of MRP2 as a targetable factor limiting oxaliplatin accumulation and response in gastrointestinal cancer. *Sci. Rep.* 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38667-8>.
- Omicinski, C.J., Vanden Heuvel, J.P., Peredew, G.H., Peters, J.M., 2011. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical

- phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol. Sci.* 120, 49–75. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq338>.
- Paineñilú, J.C., Pascual, M.M., Bieczynski, F., Laspoumaderes, C., González, C., Villanueva, S.S.M., Luquet, C.M., 2019. *Ex vivo* and *in vivo* effects of arsenite on GST and ABCC2 activity and expression in the middle intestine of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 225 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108566>.
- Parkinson, A., Ogilvie, B.W., 2008. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen, C.D. (Ed.), *Toxicology: the Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, New York, p. 1331. <https://doi.org/10.1036/0071470514>.
- Ramos, P., Schmitz, M., Gama, S., Portantiolo, A., Durruthy, M.G., de Souza Votto, A.P., Cornetet, L.R., dos Santos Machado, K., Wehrli, A., Tonel, M.Z., Binotto Fagan, S., Monserrat, J.M., 2018. Cytoprotection of lipoic acid against toxicity induced by saxitoxin in hippocampal cell line HT-22 through *in silico* modeling and *in vitro* assays. *Toxicology* 393, 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.11.004>.
- Sakamoto, S., Sato, S., Ogata, T., Kodama, M., 2000. Formation of intermediate conjugates in the reductive transformation of gonyautoxins to saxitoxins by thiol compounds. *Fish. Sci.* 66, 136–141.
- Sato, S., Sakai, R., Kodama, M., 2000. Identification of Thioether Intermediates in the Reductive Transformation of Gonyautoxins into Saxitoxins by Thiols, vol. 10, pp. 1787–1789.
- Schaedle, M., Bassham, J.A., 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol.* 59, 1011–1012. <https://doi.org/10.1104/pp.59.5.1011>.
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E., George, S., James, M., Kullman, S., van den Huk, P., Willet, K., 2008. Biotransformation in fishes. In: Di Giulio, R., Hinton, D. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, New York, p. 1101.
- Sephton, D.H., Haya, K., Martin, J.L., Legresley, M.M., Page, F.H., 2007. Paralytic shellfish toxins in zooplankton, mussels, lobsters and caged Atlantic salmon, *Salmo salar*, during a bloom of *Alexandrium fundyense* off Grand Manan Island. the Bay of Fundy 6, 745–758. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.03.002>.
- Silva, C.A., Oba, E.T., Ramsdorf, W.A., Magalhães, V.F., Cestari, M.M., Alberto, C., Ribeiro, O., Silva, H.C., Assis, D., 2011. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicon* 57, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.10.015>.
- Stephensen, E., Sturve, J., Förlin, L., 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol., C* 133, 435–442. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00129-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00129-1).
- Suárez-Isla, B.A., 2016. Marine and freshwater toxins. *Mar. Freshw. Toxins* 23–41. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6419-4>.
- Testai, E., Buratti, F.M., Funari, E., Manganelli, M., Vichi, S., Arnich, N., Biré, R., Fessard, V., Sialehaamo, A., 2016a. Review and Analysis of Occurrence, Exposure and Toxicity of Cyanobacteria Toxins in Food. EFSA supporting publication, p. 309.
- Testai, E., Scardala, S., Vichi, S., Buratti, F.M., 2016b. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Crit. Rev. Toxicol.* 46 (5), 385–419. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1137865>.
- Thottumkara, A.P., Parsons, W.H., Du Bois, J., 2014. Saxitoxin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 5760–5784. <https://doi.org/10.1002/anie.201308235>.
- Torres, R., Pizarro, L., Csendes, A., 2007. Gtx 2/3 epimers permeate the intestine through a paracellular pathway. *J. Toxicol. Sci.* 32 (3), 241–248.
- Van de Waal, D.B., Tillmann, U., Martens, H., Krock, B., van Scheppingen, Y., John, U., 2015. Characterization of multiple isolates from an *Alexandrium ostenfeldii* bloom in The Netherlands. *Harmful Algae* 49, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.08.002>.
- Venturino, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Cocca, C., Bergoc, R.M., Pechen De D'Angelo, A.M., 2001. Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comp. Biochem. Physiol., C* 130, 191–198. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00241-1).
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76, 1416–1427. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.005>.
- White, A.W., 1980. Recurrence of kills of Atlantic Herring (*Clupea harengus harengus*) caused by dinoflagellate toxins transferred through herbivorous zooplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 2262–2265. <https://doi.org/10.1139/f80-271>.
- Who, 2019. Cyanobacterial toxins: saxitoxins. *Guidel. Drink. Qual. Guidel. Safe Recreat. Water Environ.* 1–19.
- Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2004. Glutathione metabolism and its Implications for health. *J. Nutr.* 134, 489–492. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>.
- Xu, H., Ren, D., 2016. Lysosomal physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 77, 57–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071649>. Lysosomal.
- Zamek-Gliszczyński, M.J., Hoffmaster, K.A., Nezasa, K.I., Tallman, M.N., Brouwer, K.L.R., 2006. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 27, 447–486. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.12.007>.
- Zar, J., 1999. *Biostatistical Analysis*, fourth ed. Prentice Hall.