



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL MODO DE ACCIÓN DE
TOXINAS DE DINOFLAGELADOS Y CIANOBACTERIAS
EN CÉLULAS HEPÁTICAS

Tesis doctoral

Henar López Alonso

Lugo, 2013



DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
Facultad de Veterinaria
Campus Universitario
27002, Lugo (Spain)
Tel.: + 34 982822233
Fax: + 34 982822233

Luis M. Botana López, Catedrático de Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA:

Que la tesis doctoral titulada “Evaluación del modo de acción de toxinas de dinoflagelados y cianobacterias en células hepáticas”, recogida en la presente memoria, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria por la Universidad de Santiago de Compostela Dña. **Henar López Alonso**, ha sido realizada bajo su codirección en el departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria y cumple las condiciones exigidas para que su autora pueda optar al grado de Doctora por la Universidad de Santiago de Compostela, otorgando su aprobación para la lectura y defensa de la misma.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Lugo, a 24 de Septiembre de 2013.

Luis M. Botana López
Doctor en Farmacia
Codirector de tesis

Henar López Alonso



DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
Facultad de Veterinaria
Campus Universitario
27002, Lugo (Spain)
Tel.: + 34 982822233
Fax: + 34 982822233

Juan Andrés Rubiolo, Doctor contratado por el departamento de Farmacología de la universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA:

Que la tesis doctoral titulada “Evaluación del modo de acción de toxinas de dinoflagelados y cianobacterias en células hepáticas”, recogida en la presente memoria, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria por la Universidad de Santiago de Compostela Dña. **Henar López Alonso**, ha sido realizada bajo su codirección en el departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria y cumple las condiciones exigidas para que su autora pueda optar al grado de Doctora por la Universidad de Santiago de Compostela, otorgando su aprobación para la lectura y defensa de la misma.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Lugo, a 24 de Septiembre de 2013.

Juan Andrés Rubiolo
Doctor en Ciencias e
Ingeniería de los Alimentos
Codirector de tesis

Henar López Alonso

AGRADECIMIENTOS

A Luis M. Botana por haberme dado la oportunidad de trabajar en este laboratorio, por sus esfuerzos para que este cuente con la financiación suficiente, por los valiosos consejos que han hecho más fácil el desarrollo de esta tesis, y por hacer de este departamento, diverso y numeroso, un grupo al que es fácil unirse en el trabajo y la convivencia.

A Juan, por estar siempre dispuesto a explicar, por haberme enseñado, ayudado y animado en algunos momentos difíciles. Por haberme ofrecido **siempre** una actitud amable y educada, y por haberme tratado como a un compañero. En definitiva, por ser un gran investigador y una mejor persona.

A toda la gente que trabaja en el laboratorio y que directa o indirectamente ha participado en esta tesis, por su ayuda en estos años.

A mis dos compañeros del antiguo “comedor”, por los buenos momentos, las charlas agradables, las risas, y por hacer que uno tenga más ganas de venir a trabajar cada mañana.

A mis compañeros de pasillo, a mis “compis” de despacho, y en especial a la encargada de la intendencia, por hacer de éste un ambiente agradable donde estudiar, escribir, comentar, e incluso merendar.

Y mil gracias a todos los que me quieren y que por supuesto adoro, en especial a los “míos” (grandes y pequeños), por su eterno e incondicional apoyo.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AO: Ácido okadaico

ASP: Envenenamiento por toxinas amnésicas

AZP: Azaspirácidos

CA: Ciclina A

CB: Ciclina B

CD: Ciclina D

CDKs: Quinasa dependientes de ciclinas

CE: Ciclina E

CFP: Envenenamiento por ciguatoxina

CYN: Cilindrospermopsina

CYP450: Citocromo P450

Da: Dalton

DL₅₀: Dosis letal 50

DSP: Envenenamiento por toxinas diarréicas

DTX-1, DTX-2, DTX-3: Dinofisistoxina -1, -2, -3

DTXs: Dinofisistoxinas

EGF: Factor de crecimiento epitelial

eq: equivalentes

EU-NRL: Laboratorios nacionales de referencia de la unión europea

FAO: Organización de la naciones unidas para la agricultura y la alimentación

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

h: hora

HAB: Floraciones algales nocivas

HGF: Factor de crecimiento hepático

H.P.: Hepatocitos Primarios

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

IOC: Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO

I.P.: Yoduro de propidio

kg: Kilogramo

LDH: Lactato deshidrogenasa

MC: Microcistina

mg: Miligramo

ml: Mililitro

MTT: Metiltiazoltetrazolio

ng: Nanogramo

nM: Nanomolar

NSP: Envenenamiento por toxinas neurotóxicas

OMS: Organización mundial de la salud

PC: Punto de control

PP1, PP2, PP3: Fosfatasas de serina-treonina 1, 2A y 3

PR: Punto de restricción

PSP: Envenenamiento por toxinas paralizantes

PTXs: Palitoxinas

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Ub: Ubiquitina

UE-NLRs: laboratorios de referencia de la UE de biotoxinas marinas

WHO: Organización mundial de la salud

μg: Microgramo

ÍNDICE

1-INTRODUCCIÓN.....	2
1.1-CLASIFICACIÓN DE LAS FICOTOXINAS	6
1.2-HEPATOTOXINAS.....	10
1.2.1-HEPATOTOXINAS DE ORIGEN MARINO	10
1.2.2-HEPATOTOXINAS DE AGUA DULCE	16
1.3-HÍGADO COMO MODELO DE ESTUDIO	22
2-OBJETIVOS	25
3-PUBLICACIONES.....	28
3.1-Estudio comparado de AO y DTX-2 sobre células hepáticas.....	28
3.1.1-Okadaic acid and dinophysin toxin 2 have differential toxicological effects in hepatic cell lines inducing cell cycle arrest, at G0/G1 or G2/M with aberrant mitosis depending on the cell line.	28
3.1.2- Comparative study of toxicological and cell cycle effects of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in primary rat hepatocytes.	40
3.2-Estudio de la CYN sobre H.P. de rata.	49
3.2.1-Protein Synthesis Inhibition and Oxidative Stress Induced by Cyindrospermopsin Elicit Apoptosis in Primary Rat Hepatocytes	49
4-DISCUSIÓN.....	61
4.1.-Estudio del efecto de las toxinas diarreas (AO y DTX-2) sobre hepatocitos primarios y transformados	61
4.1.1-Estudio de la citotoxicidad del AO y la DTX-2 en células hepáticas	62
4.1.2-EI AO y la DTX-2 afectan de distinta manera el ciclo celular de distintos tipos de células hepáticas	63
4.1.3-EI AO y la DTX-2 alteran la expresión de ciclinas en las células estudiadas.....	65
4.1.4-Efecto del AO y la DTX-2 sobre la expresión de p53 en células hepáticas	68
4.1.5-EI AO y la DTX-2 tienen distintos efectos sobre el citoesqueleto de tubulina de hepatocitos	69
4.2-Estudio del efecto de CYN sobre hepatocitos primarios.	70
4.2.1-La CYN, a concentraciones nanomolares, es tóxica e induce apoptosis en H.P.	70
4.2.2-La CYN inhibe la síntesis de proteína a concentraciones nanomolares en H.P.	72
4.2.3-EI estrés oxidativo está involucrado en la citotoxicidad de CYN en H.P.....	74
5-CONCLUSIONES	77
5.1-Conclusiones del estudio del AO y la DTX-2 en células hepáticas:	77
5.2-Conclusiones del estudio CYN sobre H.P. de rata.	78
6-BIBLIOGRAFÍA.....	80

INTRODUCCIÓN

1-INTRODUCCIÓN

Entre los ecosistemas acuáticos del planeta se encuentran mares, océanos, ríos, lagos y cualquier otro hábitat en el que exista un cuerpo de agua. Se clasifican en ecosistemas de agua dulce y ecosistemas marinos. Estos ambientes acuáticos ofrecen unas condiciones ambientales uniformes y relativamente estables para el desarrollo y supervivencia de diversas biocenosis (conjunto de especies que coexisten en un biotipo: microorganismos, especies vegetales y animales) [1]. Entre los diversos organismos que viven en estos ecosistemas se encuentran las microalgas y las cianobacterias, que son componentes del fitoplancton. Éstas, como resultado de su metabolismo, producen diversos metabolitos secundarios con estructuras que no se observan en otros tipos de organismos vivos, y que en ocasiones poseen una actividad tóxica considerable [2]. Además de su capacidad tóxica, a alguna de estas moléculas se les atribuye propiedades aplicables en el campo de la biomedicina, como es la potencial capacidad anti-tumoral, anti-fúngica, anti-microbiana, anti-viral, etc. [3-11]. Estos metabolitos secundarios reciben el nombre de ficotoxinas, y pueden ser liberados al agua o ser acumuladas en el interior de sus organismos productores, se cree que como mecanismo de protección [12]. Dichas moléculas pueden causar daños de diversa magnitud en peces y mamíferos, bien sea entrando en contacto con los tejidos, siendo inhaladas como aerosol de agua cargada con estas microalgas, o siendo ingeridas. Este último supuesto es el más frecuente, y el que supone mayor peligro para la salud pública. En muchos casos, estos metabolitos se acumulan a lo largo de la cadena trófica (por ejemplo la tetrodotoxina en el pez globo, y el ácido domóico en mejillones, almejas y vieiras), y en última instancia pueden ser ingeridos por animales o por el ser humano, hecho que hace que representen un riesgo importante. Las intoxicaciones por consumo de alimentos de origen marino contaminados con toxinas no son algo nuevo, datos que se remontan a 1793 ya hacen referencia a una intoxicación alimentaria a causa del consumo de bivalvos. Cada año

se detectan en todo el mundo numerosos casos de personas intoxicadas, aproximadamente un 15% de éstas con resultado de muerte [13]. Los episodios de intoxicación no solo afectan a humanos, también se han descrito casos de animales afectados, como mamíferos marinos [14], aves y ungulados que se intoxicaron al ingerir el agua de bebida contaminada [15, 16]. Por lo tanto, estas floraciones de microalgas y cianobacterias resultan ser un claro problema ecológico y de salud pública, y además, cabe destacar que estas floraciones también representan un importante problema económico para sectores como la pesca extractiva, la acuicultura y el turismo [13, 17].

En diversas costas del planeta se da cíclicamente un crecimiento exponencial de todas o algunas especies fitoplanctónicas (es el fenómeno conocido como “bloom o floración”) [18]. Las floraciones de cianobacterias o microalgas con frecuencia producen un cambio en la coloración del agua en la que se encuentran, y en ocasiones estas se tornan rojizas, de ahí que originalmente fueran conocidas como “marea roja”, término que sigue siendo empleado. Esto puede dar lugar a equívocos, ya que algunas microalgas tóxicas dan lugar a otras coloraciones o no producen cambio alguno en la apariencia de las aguas. Las citadas floraciones han tenido lugar de forma natural a lo largo de la historia. Sin embargo, en los últimos 20 años se ha observado un claro incremento de frecuencia, intensidad y distribución geográfica de las floraciones de microalgas y cianobacterias. La variación de factores como son: el exceso de nutrientes disponibles, el incremento de la temperatura del agua, los cambios de luminosidad y salinidad, y la mayor o menor ingesta por parte del zooplancton, favorecen el rápido crecimiento exponencial del fitoplancton, llegando a encontrarse en cantidades de hasta millones de células por mililitro [13]. En el caso de los recursos de aguas continentales hay otros condicionantes a tener en cuenta, que cobran especial interés a la hora de adoptar medidas preventivas para procurar reducir la incidencia de estas floraciones de cianobacterias. Estos factores son principalmente:

el tiempo de permanencia de las aguas, la forma de los embalses, y la aridez de orillas y zonas próximas a los cauces. El hecho de que los terrenos adyacentes a los recursos hídricos sean zonas estériles o secas favorece el lavado del suelo, y esto contribuye al incremento de nutrientes y partículas en suspensión en el agua. La presencia de estas partículas le aporta al agua una mayor turbidez, de este modo la luminosidad a cierta profundidad se ve modificada y así el hábitat puede ser más favorable para el crecimiento de ciertas especies del fitoplancton [19].

Algunos de estos parámetros que hacen el ambiente acuático más favorable para el sobrecrecimiento del fitoplancton se asocian cada vez más al cambio climático [20], al incremento de la actividad de transporte marítimo, y sobre todo a la eutrofización creciente de las aguas costeras [13]. La superpoblación, y por tanto el incremento de desechos procedentes de los hogares, así como el incremento de la actividad industrial y de los residuos que estas generan, ha tenido como consecuencia una alteración considerable de estos parámetros, cuestión que se relaciona de forma clara con la frecuencia de las floraciones [21, 22]. Estas floraciones son producidas por aproximadamente un 6% de las 5000 especies de fitoplancton conocidas. Entre las especies del fitoplancton capaces de sintetizar estas sustancias tóxicas están los dinoflagelados (que representan un 75% del total de especies productoras de ficotoxinas marinas), las diatomeas, y las cianobacterias [23, 24]. A día de hoy se sabe que cerca de 40 especies de microalgas marinas (principalmente dinoflagelados) son potencialmente productores de sustancias tóxicas [25], y en lo concerniente a las cianobacterias se calcula que son tóxicas más del 50% de las floraciones, con un amplio rango de especies productoras de estas toxinas [26]. La presencia de éstas especies fitoplanctónicas en las costas se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas, aunque no está claro hasta qué punto esto se debe a un incremento de su presencia, o a un importante aumento de la monitorización y muestreo de las aguas en diferentes áreas del planeta [13].

Las floraciones de microalgas pueden tener consecuencias negativas sobre la salud pública, y sobre la economía de algunas regiones y actividades como son la acuicultura, la pesca extractiva y el turismo. Cuando las floraciones tienen repercusiones negativas de cualquier tipo, se habla de floraciones nocivas o “HAB” (*harmful algal blooms*) [13].

La capacidad dañina de algunas especies de microalgas o cianobacterias puede deberse al efecto directo de su presencia. Debido a su proliferación masiva, se produce el agotamiento del oxígeno del agua, y por tanto la muerte indiscriminada de peces y otros organismos. Por otro lado, en otras ocasiones se produce un sobrecrecimiento de especies capaces de producir ficotoxinas. En este caso, el agua y/o el fitoplancton pueden estar cargados de sustancias tóxicas. Estos metabolitos secundarios son frecuentemente acumulados por organismos filtradores (como los bivalvos) y pueden ser trasladados a niveles superiores de la cadena trófica, resultando contaminados los peces que se alimenten de estos bivalvos o crustáceos. En último término, las ficotoxinas pueden ser ingeridas por el ser humano a través de diversos productos alimentarios como los mejillones, almejas, vieiras y otros bivalvos, o incluso a través del consumo de peces como el mero, la anguila, la barracuda, etc., resultando más tóxicos los peces de mayor tamaño pues acumulan mayores cantidades de toxina. Las toxinas también pueden ingresar en el organismo por otras vías, como la inhalación o la absorción cutánea, cuando las toxinas están en aguas de recreo. Finalmente, algunas especies de microalgas no productoras de moléculas tóxicas para el ser humano, son capaces de bloquear la capacidad de filtración de las branquias o incluso pueden secretar sustancias hemolíticas, lo que resulta fatal para los peces que se encuentran confinados en ambientes reducidos, como es el caso de los peces de producción acuícola, provocando grandes tasas de mortalidad, e importantes pérdidas económicas para este sector económico [13, 19, 26, 27].

Resumiendo, las consecuencias negativas derivadas de estas floraciones nocivas son múltiples: el posible riesgo que supone para la seguridad alimentaria es posiblemente la más trascendente, además, los posibles perjuicios económicos pueden ser muy serios y afectar a numerosos sectores entre los que cabe destacar la actividad acuícola y pesquera, el turismo y otros como son las desalinizadoras. El sector acuícola tiene que afrontar pérdidas debidas al incremento de las tasas de mortalidad, y a peores índices de conversión entre otras. Así mismo, cuando la monitorización de las aguas evidencia un mayor nivel de especies fitoplanctónicas potencialmente peligrosas, suele procederse por parte de las autoridades competentes al “cierre” de las zonas de captura, y por tanto, el sector se ve obligado a detener la actividad extractiva y en ocasiones también la comercialización de especies procedentes de la acuicultura, con los consecuentes perjuicios de distinta índole que esto supone. A mayores, algunas cianobacterias liberan sustancias volátiles que resultan desagradables e incluso irritantes, que sumado al aspecto poco atractivo de las aguas con grandes cantidades de microalgas o cianobacterias, hace que las actividades turísticas y de recreo se vean también damnificadas [13].

Por lo tanto, la presencia de ficotoxinas resulta un claro problema de salud pública, además de un problema económico y ecológico. Como consecuencia de todo esto, en las últimas décadas se ha visto incrementado el interés de la comunidad científica en relación a este tema, así como la preocupación de diversos sectores profesionales implicados, y de la sociedad en general, por las posibles consecuencias que este fenómeno pudiera tener, ya que cada vez existe un mayor consumo y una mayor distribución de productos alimenticios de origen marino [23].

1.1-CLASIFICACIÓN DE LAS FICOTOXINAS

Las intoxicaciones alimentarias causadas por toxinas marinas son diagnosticadas en base a la sintomatología clínica (no existe una prueba clínica para determinar la

etiología de la intoxicación), de ahí que algunos autores clasifiquen las toxinas en base a la sintomatología clínica que el paciente intoxicado manifiesta [23]. En otros supuestos, y debido a la aparición reciente de nuevos metabolitos tóxicos, las toxinas no se pueden encajar en ninguno de estos grupos, por lo que la clasificación ha ido modificándose con el paso del tiempo.

Basándose en la sintomatología clínica, se sabe que existen toxinas neurotóxicas que causan el síndrome conocido como NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning), paralizantes que causan el PSP (Paralytic Shellfish Poisoning), diarreicas responsables del DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning), amnésicas causantes del síndrome ASP (Amnesic Shellfish Poisoning), la intoxicación por azaspirácidos (AZP), y la intoxicación por palitoxinas (PTXs). Por otro lado se conoce la intoxicación causada por el pez Globo, por la ciguatera (CFP o Ciguatera Fish Poisoning), y por último las intoxicaciones producidas por cianobacterias [28]. Las tablas 1 y 2 resumen las principales toxinas conocidas producidas por dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias, así como sus principales organismos productores, los órganos y tejidos diana, y los síntomas más habituales que manifiesta un ser humano u otro mamífero tras resultar intoxicado.

Algunos autores incluyen, aunque como un grupo aparte, la intoxicación por escombroides. Es la intoxicación más frecuente producida por el consumo de productos del mar, y su origen radica en el consumo de pescado con altos niveles de histamina. La causa de que el pescado contenga niveles de histamina potencialmente peligrosos, se debe a la deficiencia en los métodos de conservación del pescado tras su captura [23].

Tabla 1: Clasificación de las toxinas marinas

GRUPOS	TOXINAS	ORGANISMOS PRODUCTORES ¹	DIANA	SÍNTOMAS	REFERENCIAS
Paralizantes (PSP)	Saxitoxinas (STXs), Gonyautoxinas (GTXs), N-sulfocarbamoil-11hidroxisulfatotoxinas (Cs)	<i>Alexandrium sp.</i> <i>Gymnodinium sp.</i> <i>Pyrodinium sp</i>	Sinapsis nerviosa (bloquea canal de calcio)	Parestesia, dolor de cabeza, ataxia y dismetría, vómitos, compromiso respiratorio y muerte.	[23, 28-33]
Diarreicas (DSP)	Ácido okadaico (AO) Dinofisistoxinas (DTXs)	<i>Prorocentrum sp</i> (<i>P. Lima</i> , <i>P. Arenarium...</i>) <i>Dinophysis sp</i> (<i>D Acuta...</i>) <i>Phalacroma rotundatum</i>	Intestino, hígado... (inhiben las PP)	Severos síntomas gastrointestinales: diarrea, náuseas, vómitos, retortijones...	[23, 28, 29, 33-38]
Pectenotoxina	Pectenotoxina (PTX)	<i>Dinophysis sp</i> <i>Prorocentrum sp</i>	Hígado	Signos de fallo hepático en ratón	[23, 28, 29, 33, 34, 37, 39]
Yesotoxina	Yesotoxina (YTX)	<i>Lingulodinium polyedrum</i> , <i>Gonyaulax spinifera</i> , <i>Protoceratium reticulatum</i>	Miocardio...	Descoordinación motora en ratón	[23, 28, 29, 33, 34, 40]
Amnésicas (ASP)	Ácido Domóico (DA)	<i>Chondria armata</i> . <i>Pseudo-nitzschia sp</i>	Cerebro, retina, miocardio (Activa receptores de kainato)	Náuseas y vómitos, dolor de cabeza, diarrea, cambios de estado mental, disfunción del sistema nervioso autónomo, amnesia, convulsiones, coma y muerte	[23, 28, 29, 33, 41]
Neurotóxicas (NSP)	Ciguatotoxinas, Maitotoxina, Brevetoxina, Iminas cíclicas	<i>Gambierdiscus toxicus</i> <i>Gymnodinium breve</i> <i>Karenia selliformis</i> <i>Gambierdiscus toxicus</i>	Sinapsis nerviosa	Parestesias, signos gastrointestinales, espasmos, diplopía, alteraciones de la marcha, alteración de la termo-percepción, dolor músculo-esquelético, y dificultad respiratoria	[23, 28, 29, 33, 42-46]
Palitoxina	Palitoxina (PLTX)	<i>Ostreopsis spp</i>	Tejido musculoesquelético, miocardio	Diarrea, fiebre alta, tos, rabdomiomas, dificultad respiratoria, insuficiencia cardíaca...	[33, 47-50]
Azaspirácidos	Azaspirácidos (AZAs)	<i>Azadinium spinosum</i> (<i>Protoperdinium crassipes</i>)	Hígado páncreas, miocardio...	Nauseas, vómitos, diarrea severa, retortijones. Reacción inflamatoria por contacto y por inhalación. Dificultad respiratoria	[23, 28, 29, 33, 51-53]
Tetrodotoxina	Tetrodotoxina (TTX)	<i>Vibrio sp</i>	Sinapsis nerviosa y tejido musculoesquelético	Entumecimiento de cara y extremidades, decaimiento, apatía, parálisis ascendente, fallo respiratorio y circulatorio y muerte	[23, 28, 29, 33, 54-56]

1: Ejemplos de los principales organismos productores de las toxinas

Tabla 2: Clasificación de las toxinas de agua dulce

	GRUPOS	TOXINAS	ORGANISMOS PRODUCTORES ¹	DIANA	SÍNTOMAS	REFERENCIAS
TOXINAS DE AGUA DULCE	Hepatotoxinas	Microcistinas (LR, LA, YR, RR).	<i>Microcystis sp, Anabaena sp, Nodularia sp, Nostoc sp, Oscillatoria sp</i>	Hígado	Gastroenteritis, diarrea, fallo hepático y muerte. Carcinogénesis	[57-59]
		Nodularina	<i>Nodularia spumigena</i>	Hígado	Síntomas asociados a hepatotoxicidad. Carcinogénesis	[57, 58, 60]
		Cilindropermopsina (CYN) (citotoxina)	<i>Cylindropermopsis raciborskii, Aphanizomenon ovalisporum, Aphanizomenon flos-aquae, Umezakia natans, Rhabdiodopsis curvata</i>	Hígado, riñón, timo, corazón...	Hepatoenteritis, fallo renal. Carcinogénesis.	[57, 58, 61]
	Neurotoxinas	Saxitoxina	<i>Anabaena circinalis, Aphanizomenon sp. Cylindropermopsis raciborskii</i>	Sinapsis nerviosa	Parestesia, dolor de cabeza, ataxia y dismetría, vómitos, compromiso respiratorio y muerte	[23, 57, 58]
		Anatoxina-a Anatoxina-a (s)	<i>Anabaena sp Oscillatoria sp</i>	Sinapsis nerviosa	Pérdida de coordinación, fasciculaciones musculares, convulsiones, disnea, apnea y muerte	[58, 62, 63]
	Dermotoxinas	Aplisiatoxina Ligbiatoxina	<i>L. majuscula (M. producens)</i>	Piel	Irritación severa. Carcinogénesis.	[58, 63, 64]
Irritantes	Lipopolisacáridos		Cualquier tejido expuesto	Eritema en distintos grados, disneas de base alérgica, irritación gástrica...	[58, 65]	

1: Ejemplos de los principales organismos productores de las toxinas

Existen, por tanto, varios criterios posibles a la hora de encuadrar a estas ficotoxinas en una clasificación. Refiriéndose a la ordenación que atiende a los órganos afectados, podemos decir que uno de los grupos más relevantes es el de las hepatotoxinas. Éstas, en lo referente a su presencia en las aguas y a su repercusión para la salud humana son las más frecuentes. Esto se debe, en parte, a la continua mejora de la metodología para su análisis, y a la estandarización y extensión de los controles para la detección de las mismas [19].

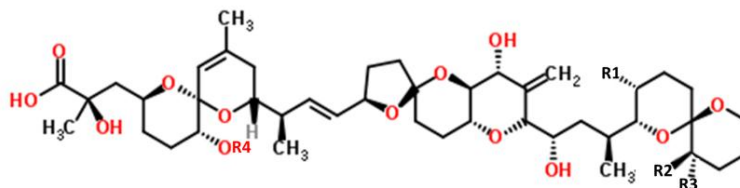
1.2-HEPATOTOXINAS

Las hepatotoxinas son un problema para la salud pública. Algunas, como el ácido okadaico (AO) y las dinofisistoxinas (DTXs) (que aunque siendo toxinas diarreas, posteriormente se demostró que también afectan al hígado), pueden ser ingeridas a través del consumo de alimentos del mar contaminados [13]. Otras ficotoxinas de agua dulce, como las microcistinas (MC), la nodularina o la cilindrospermopsina (CYN), son principalmente ingeridas a través del agua de consumo, aunque además existen otras vías de entrada que son menos frecuentes, como la inhalación o el contacto con las mucosas [66, 67].

1.2.1-HEPATOTOXINAS DE ORIGEN MARINO

El ácido okadaico y las dinofisistoxinas-1, -2, y -3 (DTX-1, DTX-2, DTX-3) son las principales toxinas implicadas en el síndrome conocido como “DSP” (diarrhetic shellfish poisoning) o envenenamiento por toxinas diarreicas [68]. Este síndrome fue descrito por primera vez en Japón a finales de los años 70 del siglo pasado [69], y desde entonces ha mostrado una incidencia creciente [70]. El AO se distribuye ampliamente a lo largo del planeta [13], y es la toxina DSP predominante en España [71] y Europa, si bien se han detectado también grandes cantidades de DTX-2 en las costas españolas, portuguesas e irlandesas [72-76]. Desde principios del siglo 21

parece estar también presente en mejillones de las costas del sur de Noruega, asociada al AO [77]. Este grupo de ficotoxinas marinas se caracterizan por ser todos ellos compuestos policétidos que contienen un anillo furano o pirano, y un grupo funcional alfa-hidroxi carboxílico. Estas moléculas sólo se distinguen por la posición de los grupos metilo [39].



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	P.M.
AO	CH ₃	H	H	H	804.5
DTX-1	CH ₃	CH ₃	H	H	818.5
DTX-2	H	H	CH ₃	H	804.5
DTX-3	CH ₃	CH ₃	H	Acilo	

Figura 1: Estructura del AO y DTX-1, -2, y -3 [78].

El ácido okadaico le debe su nombre a la esponja de la que se aisló por primera vez a principio de los años 80, *Halichondria okadai* [79]. La DTX-2, se aisló por primera vez en Irlanda, en 1992, a partir de extracto de mejillón [80]. A pesar de esto, se sabe que son las microalgas de los géneros *Dinophysis spp.* y *Prorocentrum spp.* las productoras de estos compuestos lipofílicos y termoestables. Son muchas las especies productoras de toxinas DSP, entre las que cabe citar *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis acuta*, *Dinophysis fortii*, *Prorocentrum lima* y *Prorocentrum concavum* [81-83]. La producción de estas toxinas varía en función de la especie y de los morfotipos regionales y estacionales de las microalgas [13].

Las moléculas tóxicas se acumulan en la glándula digestiva y en el tejido graso de algunos bivalvos, (especialmente los mejillones, pero también vieiras, almejas y ostras) que al alimentarse por filtración del fitoplancton contaminado, van acumulando grandes cantidades de estas toxinas. Además, los peces que se alimenten con estos

filtradores contaminados pueden a su vez acumular estas moléculas, siendo el hígado y las gónadas los tejidos del pez que albergan mayor cantidad de toxina [84]. El tiempo que un bivalvo necesita estar en un ambiente contaminado para resultar tóxico es muy variable y depende de diversos factores como son: la toxicidad de la especie de dinoflagelado que esté presente en el agua, la abundancia relativa de otras especies no tóxicas [70] y la ausencia de silicatos en el agua (que favorece el crecimiento de especies de Dinoflagelados) [85]. El tiempo necesario para que los bivalvos eliminen las toxinas acumuladas es también variable, a pesar de esto, algunos estudios apuntan a que en general parecen presentar un patrón bifásico que comprende una fase de eliminación rápida de unos pocos días de duración y otra fase de pérdida más gradual durante las semanas siguientes [86]. Sin embargo, otros estudios no han podido establecer con certeza esta diferenciación de fases [87]. Por tanto, el patrón de acumulación y depuración de toxina es particular para cada tipo de bivalvo, y parece ser independiente de la toxina de que se trate.

Cuando el ser humano ingiere estos alimentos contaminados con toxinas DSPs, se producen síntomas gastrointestinales de distinta intensidad, aunque generalmente severos, y relacionados directamente con la cantidad de toxina ingerida. Los síntomas aparecen poco tiempo después de la ingesta, entre los 30 minutos y las dos horas posteriores, habitualmente son autolimitantes, y en ningún caso letales, observándose una mejoría clínica del paciente intoxicado en 3-4 días [70, 88].

Respecto al mecanismo de acción de estos compuestos, se ha demostrado que las toxinas DSP son inhibidores de las fosfatasas de serina-treonina 1, 2A y 3 (PP1, PP2A y PP3) [13, 89, 90]. Las fosfatasas son un grupo de proteínas estrechamente relacionadas con diversos procesos metabólicos de la célula. Esta inhibición puede explicar la temprana inflamación en la mucosa intestinal y la aparición repentina de la diarrea como síntoma predominante de estas intoxicaciones, pues la inhibición de las fosfatasas por parte del AO provoca una hiperfosforilación de las proteínas que

controlan la liberación de sodio y de las proteínas citoesqueléticas o de unión, produciendo una liberación descontrolada de solutos y consecuentemente una pérdida pasiva de fluidos hacia el lumen intestinal [13, 83, 84].

Estudios *in vivo* realizados en ratón, revelan que tras la administración vía oral de AO se producen daños en hígado, intestino delgado y en el estómago no glandular [91-93]. Además, como muestran los resultados expuestos durante el encuentro del año 2001 de los laboratorios de referencia de la UE de Biotoxinas marinas (UE-NLRs), el AO se absorbe con facilidad a través del epitelio gastrointestinal, pues transcurridos 5 minutos desde la administración vía oral, la toxina estaba presente en pulmón, hígado, corazón, riñón e intestino delgado y grueso. Transcurridas dos semanas el AO seguía presente en vasos sanguíneos e hígado, y hasta cuatro semanas más tarde en intestino [94, 95]. También se ha publicado que el AO atraviesa la barrera hematoplacentaria de ratonas preñadas [96]. Ensayos realizados con ratones mostraron que la dosis empleada de AO y otras toxinas, y posiblemente la vía de administración de las mismas, determina los órganos que se ven afectados y la severidad de las lesiones observadas [93]. Yasumoto *et al* en 1978, observaron como las DSPs eran mucho más letales cuando se administraban vía oral que vía intraperitoneal [69], sin embargo publicaciones posteriores han demostrado que la dosis letal de estas toxinas administradas por vía oral es de 3 a 6 veces superior a la dosis letal cuando se administra vía parenteral, y así lo recoge un informe del encuentro FAO/WHO/IOC del 2006 [97]. Esta discrepancia puede tener explicación en el hecho de que Yasumoto *et al* en 1978 emplearon extractos de mejillón contaminado, y estos podrían contener otras moléculas tóxicas no contempladas en el artículo.

Aunque al AO se le considera generalmente una enterotoxina [98, 99], tras una administración intravenosa en la rata, el AO resulta ser una potente hepatotoxina pero con signos gastrointestinales indetectables [100]. En 1996, Matías *et al.* realizaron un estudio en el que inyectaron una dosis única de AO marcado radioactivamente vía

intramuscular a ratones, este trabajo indica que en el patrón de excreción del AO están implicadas la secreción biliar y la circulación entero-hepática [101].

Además de los mencionados signos gastroentéricos asociados a la intoxicación por toxinas DSP, también son conocidos otros efectos nocivos. Franchinia *et al.* publicaron un trabajo en el que observaban como bajas dosis de esta toxina administrada a ratones vía oral ejercen inmunosupresión [102]. En otros estudios también se constató una marcada inmunosupresión reversible en monocitos humanos de sangre periférica cuando se trataron estas células en condiciones *in vitro* con dosis bajas de AO [70]. Aunque el AO (activado metabólicamente o no) sobre células de *Salmonella typhimurium* no parece tener capacidad mutagénica [103], en células eucariotas se ha demostrado que el AO tiene una potente capacidad mutagénica. Sobre células de pulmón de hámster se evaluó la mutagénesis del AO no activado metabólicamente, y los autores del estudio sugirieron que esta propiedad no se debe a la formación de aductos, sino a que probablemente el estado de fosforilación de las proteínas reparadoras de ADN se altera, y esto es lo que favorece la mutagénesis [70]. Otros autores afirman que la formación de aductos es posible, y está condicionada por las dosis de AO empleadas para el tratamiento de diversas líneas celulares (BHK21, C13 y HESV) [104]. Por otro lado son varios los estudios que han demostrado que algunas DTXs como el AO y la DTX-1 promueven tumores en diversos órganos como la piel, el hígado y el estómago de ratas y ratones [105-107]. Según los primeros estudios realizados por Fujiki, H. *et al.*, al aumentar la cantidad de proteínas fosforiladas en los sistemas celulares, se promueven los tumores, lo que resalta la capacidad de las proteínas fosfatasa como supresores tumorales [107, 108]. Sin embargo, posteriores artículos de este mismo grupo han demostrado que la inhibición de las proteínas fosfatasa no es suficiente para que se presente un mayor desarrollo de tumores [109]. En este sentido, una reciente revisión afirma que posiblemente la irritación producida por estas toxinas sea esencial en el desarrollo de tumores asociado al AO,

no así la inhibición de las proteínas fosfatasa, y se llega a la conclusión de que es necesaria una re-evaluación del mecanismo de toxicidad de estas toxinas, al menos en lo concerniente a su capacidad mutagénica [110]. En referencia a la genotoxicidad y la capacidad de promover tumores de la DTX-2, no hay datos publicados. En el ser humano el efecto genotóxico a largo plazo del AO y las DTXs se desconocen [25].

Tanto *in vitro* como *in vivo*, la DTX-2 ha mostrado ser una toxina menos potente que el AO. Por vía intraperitoneal en ratón la DL_{50} (cantidad de una sustancia necesaria para matar a la mitad de la población sometida a estudio [111]) de la DTX-2 fue de $\approx 337,5 \mu\text{g}/\text{kg}$, y para el AO de $\approx 212,5 \mu\text{g}/\text{kg}$, por tanto, el AO resulta ser un 40% más tóxico que la DTX-2. Así mismo, en la capacidad de inhibición de las fosfatasa se ha constatado que el AO es casi dos veces más potente que la DTX-2, lo que concuerda perfectamente con la idea de que es este el principal mecanismo citotóxico de estas moléculas [77]. La diferencia de potencia entre el AO y la DTX-2 es mayor en cultivos primarios de neuronas cerebelares, observándose que el AO es unas 4 veces más tóxico que la DTX-2. Tras incubarse estas células durante 24 horas con la toxina, se determinó que la IC_{50} (concentración de una molécula necesaria para inhibir el 50% de una actividad biológica [111]) de DTX-2 es $\approx 8 \text{ nM}$, mientras que para el AO es de $\approx 2 \text{ nM}$ [112]. Sería interesante contar con resultados de ensayos *in vivo* que permitiesen determinar una DL_{50} comparada entre AO y DTX-2 administradas por vía oral, ya que esta es la vía de contaminación más probable para el ser humano. Esto no se ha realizado hasta el momento, posiblemente debido a la escasez de DTX-2 disponible, lo que hace que sólo se hayan publicado datos a este respecto para el AO [77]. La literatura referente a la toxicidad aguda del AO administrado vía oral aporta datos variables en cuanto a la dosis letal para ratones, que va desde los 400 a los 2000 mg/kg [91, 93, 99]. Sustentado por estos datos, la FAO estableció en 2006 como dosis aguda de referencia $0,33 \mu\text{g OA eq}/\text{kg}$ [113]. En este sentido la legislación

Europea, ya desde el 2004, establece como límite máximo de AO y DTXs 160 µg AO eq/kg de carne (en el Reglamento 853/2004).

1.2.2-HEPATOTOXINAS DE AGUA DULCE

En lo que respecta a la intoxicación hepática asociada al agua de bebida, la más extendida y de la que se tiene más conocimiento es la intoxicación con microcistina y sus variantes: LR, RR, e YR (los aminoácidos en la posición 2 de la molécula proveen la base para la nomenclatura de estas moléculas. Ej.: la microcistina-LR tiene leucina en la posición 2). El primer caso de seres humanos intoxicados a causa de microcistinas del que se tiene conocimiento se remonta a 1930, y fue en Estados Unidos de América [114]. Las microcistinas son péptidos cíclicos, producidos por numerosas especies de cianobacterias de los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia* y *Nostoc* entre otros [59]. Entre las cepas más virulentas de estas cianobacterias se encuentran *Microcystis aeruginosa* [115]. Estas moléculas inhiben fuertemente las fosfatasas de serina-treonina PP1 y PP2A [19]. La microcistina-LR inhibe con mayor potencia la PP2A que la PP1, y a su vez esta inhibición es cerca de 10 veces más potente que la producida por el AO [116]. Una intoxicación aguda puede causar hemorragia en hígado o fallo hepático, y de hecho ha causado la muerte de muchos animales [19, 117]. Sin embargo, este tipo de intoxicación aguda, consecuencia de la ingesta de agua contaminada, no parece probable en el hombre, por el desagradable aspecto y condiciones organolépticas que el agua presenta cuando alberga gran cantidad de cianobacterias.

La consecuencia más grave para la salud pública se debe a su efecto a largo plazo, pues un consumo de aguas contaminadas con cantidades relativamente pequeñas, y continuado en el tiempo, tiene una clara relación con una mayor incidencia de tumores hepáticos en zonas del planeta donde se bebe agua procedente de zonas superficiales cargadas de cianobacterias [118]. Esta relación se ha demostrado en modelos

animales [19]. A pesar de ser estas las consecuencias más probables, cabe citar que se han documentado una serie de muertes atribuibles a las cianotoxinas, si bien, no fueron consecuencia de la ingesta de aguas contaminadas. En 1996 murieron más de 20 pacientes que estaban recibiendo tratamiento en una unidad de hemodiálisis de un hospital de Brasil. La microcistina (en combinación con cilindrospermopsina) produjo un fallo renal fatal a los afectados [119].

Debido probablemente a que la microcistina-LR es la más frecuente y extendida de las toxinas de agua dulce, es la única cuya presencia en los recursos de agua dedicados al consumo humano está regulada. La OMS recomienda que la microcistina-LR no supere 1 µg/litro de agua, y así, el Real Decreto 140/2003 exige que la presencia de microcistinas (sin especificar variantes) en los recursos de agua destinados al consumo humano no superen el microgramo por litro de agua. Sin embargo, además de la citadas microcistinas, cada vez están más presentes en embalses, ríos, etc. otras toxinas de agua dulce que en un tiempo se consideraron menos importantes, pero que en estos últimos años han ganado interés para la comunidad científica. Este es el caso de la cilindrospermopsina.

La CYN es un alcaloide tricíclico, de 415 Da. Se mantiene estable en diversas condiciones de pH, temperatura y luminosidad, y al ser un zwitterión (molécula neutra con una carga positiva y otra negativa en distinta localización dentro de la misma molécula) presenta una alta solubilidad en agua [120, 121].

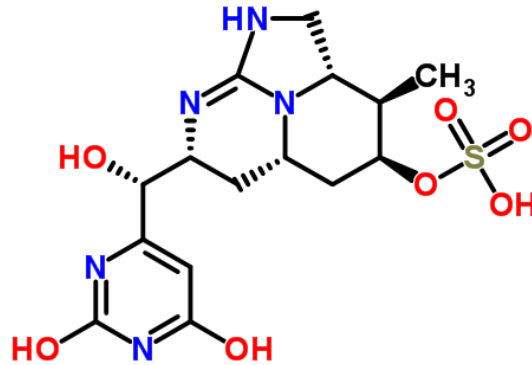


Figura 2: Estructura química de la CYN [122]

La CYN fue aislada e identificada por primera vez en 1992 a partir de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* [123]. Actualmente, esta cianobacteria de distribución mundial se sigue considerando la principal productora de CYN [124]. Aunque algunas cianobacterias tóxicas son capaces de sobrevivir en aguas gélidas, como es el caso del género *Planothrix* [19], *Cylindrospermopsis raciborskii* y otras cianobacterias productoras de CYN y de Microcistinas ocupan un hábitat tropical, de aguas cálidas. Sin embargo, en las últimas décadas se ha venido extendiendo su presencia a diversas latitudes templadas [125]. Los ecosistemas acuáticos mundiales muestran una tendencia de contaminación creciente (por tanto aguas más ricas en nitrógeno y fósforo), lo que sumado al proceso de calentamiento del planeta, crea hábitats más favorables para el crecimiento de estas cianobacterias [126], debido a esto se espera que con el tiempo estos microorganismos tengan mayor predominancia.

Además de *Cylindrospermopsis raciborskii*, se han identificado otros géneros de cianobacterias que también producen CYN, o alguno de sus análogos (7-deoxi-CYN y 7-epi-CYN), como por ejemplo *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Umezakia*, *Raphidiopsis*, *Lyngbya* [115], y *Aphanizomenon gracile* que recientemente se ha incluido en el grupo de productoras de estas cianotoxinas [127]. Se cree que estas especies productoras de CYN podrían estar muy relacionadas genéticamente, lo que refuerza la hipótesis de que la elevación en la temperatura del planeta permitió a estos organismos colonizar áreas cada vez más septentrionales [128].

En humanos la principal vía de entrada de esta toxina al organismo es la ingesta de agua de bebida, aunque también puede producirse el contacto a través de aguas de recreo, y en algunos casos a causa de la ingesta de invertebrados y vertebrados como bivalvos, crustáceos o peces. En este sentido, varios estudios han demostrado que la bioacumulación de esta toxina es frecuente [129-131], por ejemplo, se sabe que los cangrejos de río, estando en aguas contaminadas durante 14 días acumulan cantidades de CYN considerables (mayores en hepatopáncreas) [130]. La primera intoxicación conocida a causa de esta toxina se remonta a 1979 y ocurrió en Palm Island (Australia). En ella se vieron afectadas 148 personas. Los primeros síntomas se relacionaron con un síndrome gastroentérico, e incluían dolor abdominal y vómitos (un cuadro clínico compatible con una hepatitis). En horas posteriores los pacientes manifestaron fallo renal y diarrea sanguinolenta. Los pacientes intoxicados se recuperaron entre los 4 y 26 días post-ingesta [132]. En aquel momento se postularon varias causas probables, como por ejemplo el consumo de mangos inmaduros [132], pero un estudio posterior, en 1983 confirmó la relación de esta intoxicación con el suministro de agua de la zona, y algunos años más tarde se relacionó con las cianobacterias *Anabaena circinalis* y la posteriormente identificada *Cylindrospermopsis raciborskii* [133].

Diversos estudios desarrollados con modelos *in vivo*, además de los signos clínicos de los seres humanos que se han visto afectados, muestran que la CYN es principalmente hepatotóxica, independientemente de la vía de administración [121]. Un estudio realizado mediante bioensayo en ratón concluyó que los primeros síntomas de los animales tras la administración de la toxina por vía oral, fueron anorexia, diarrea y disnea. Tras realizar las necropsias, como principal lesión macroscópica se encontró tejido hemorrágico en hígado, aunque también en pulmón, riñón, intestino delgado y glándulas adrenales. Microscópicamente las principales lesiones encontradas fueron necrosis en hepatocitos, lipidosis y la formación de trombos de fibrina en el hígado y

pulmones, así como algún foco necrótico en nefronas [134, 135]. En consonancia con los resultados del estudio anterior, algunos autores, le otorgan a la CYN la categoría de citotoxina, por la variedad de órganos a los que afecta además del hígado, principalmente riñón, pulmón, corazón, timo, glándulas adrenales, tracto intestinal, médula ósea y colon [136-139]. Así mismo cabe destacar la toxicidad fetal que se induce en ratonas gestantes cuando son tratadas con CYN [140], lo que podría estar relacionado con el efecto que tiene esta molécula sobre el estatus hormonal y la relación progesterona/estrógenos [141]. La toxicidad que presenta la CYN es muy variable en función del modelo animal que se emplee en el estudio, incluso parece haber una variabilidad considerable entre individuos de la misma especie [124].

En este sentido, la DL_{50} oral en animales es también variable [142, 143]. Por vía oral en ratones, la dosis letal más baja observada por Seawright *et al.* es de 4,4 mg/kg, mientras que la dosis no letal más alta observada es de 6,9 mg/kg de equivalentes de alcaloide (en estos experimentos se emplearon extractos celulares) [143]. Otros autores han informado de que aproximadamente la mitad de los ratones alimentados con 6 mg/kg mueren tras 5 días [143]. En este estudio, más de la mitad de los ratones a los que se les administró lisado con CYN en concentraciones de entre 6 y 8 mg/kg, murieron entre 2 y 6 días después [143]. Se administraron dosis únicas lo que no les permitió a los autores determinar la DL_{50} para las concentraciones estudiadas. Por otra parte otros estudios aportan datos de DL_{50} trascurridas 24 h desde la administración vía intraperitoneal de la toxina. En estas publicaciones se aprecia una gran variación entre los valores, y esta variación no se relaciona en modo alguno con la cantidad de CYN presente en los extractos inyectados. Falconer *et al.* publicaron un artículo en 1999 en el cual afirman que la toxicidad de esta cianotoxina administrada vía oral es 25 veces menor que cuando la vía de administración es intraperitoneal. Debe tenerse en cuenta que estos experimentos, así como los realizados por Seawright *et al.*, se realizaron utilizando extractos celulares que contenían CYN, por lo que no puede

descartarse el efecto de otros componentes del extracto en la toxicidad observada. Ohtani *et al.*, utilizando CYN purificada, determinaron la DL₅₀ por vía intraperitoneal en ratones que resultó ser de 2 mg/kg, a las 24 h y 0,2 mg/kg, si se administra de 4 a 6 días, lo que indica que administrar dosis bajas repetidas durante varios días produce una mayor toxicidad que una única dosis puntual, aunque la cantidad de toxina de ésta dosis única sea mayor que el conjunto de todas [121, 123].

Estudios realizados sobre modelos *in vitro* apuntan a que la CYN es más citotóxica sobre hepatocitos primarios que sobre otras líneas celulares [121], en este sentido, Chong *et al* vieron que para hepatocitos primarios (H.P.) de rata la DL₅₀ a 72 h era de 96,15 nM = 40 ng/ml, mientras que para la línea celular KB (adenocarcinoma cervical) la DL₅₀ a las 72 h es mayor de 200 ng/ml [144]. En lo referente a la toxicidad aguda de la CYN, se sabe que ésta se relaciona con los metabolitos de la toxina que son generados por mediación del citocromo P450 [145-148], por tanto, la metabolización hepática hace que esta toxina resulte más potente. Sin embargo, a largo plazo, la toxicidad de la CYN parece tener más relación con la inhibición de la síntesis proteica [61, 139] y la inhibición de la síntesis de glutatión [145, 146]. Por otro lado también está demostrado *in vitro* que la exposición a dosis no citotóxicas de CYN puede tener efecto carcinogénico si la exposición se dilata en el tiempo [115, 136, 145, 149-151].

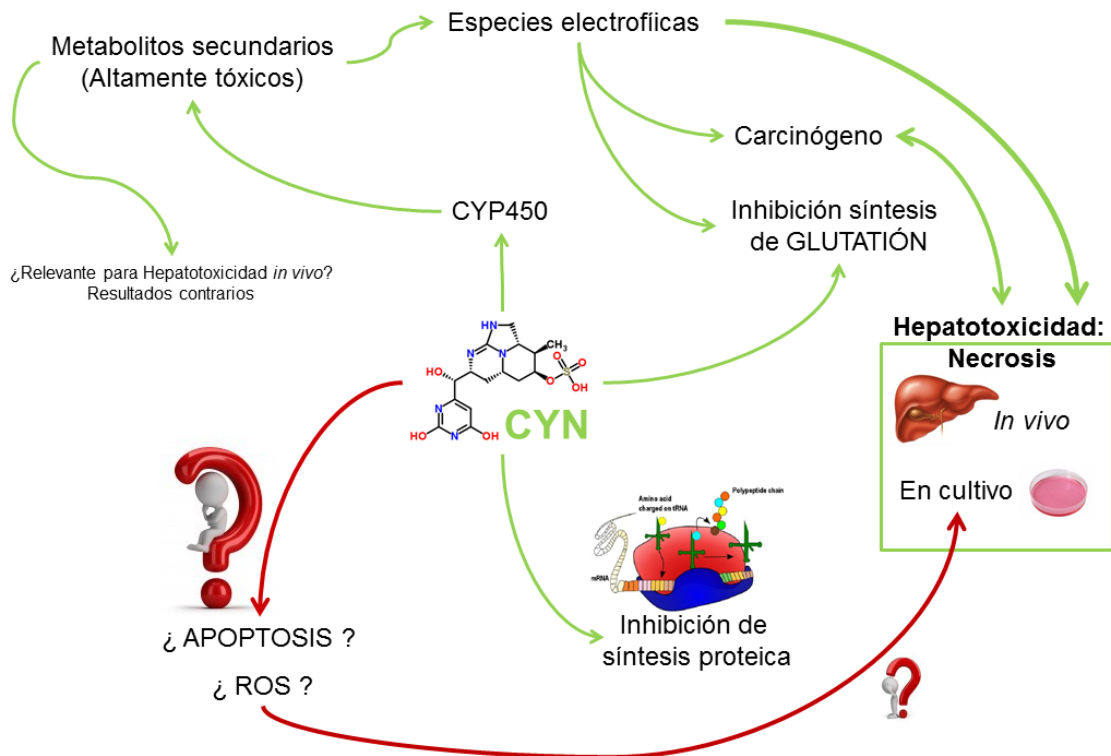


Figura 3: Resumen gráfico de los efectos conocidos de la CYN.

1.3-HÍGADO COMO MODELO DE ESTUDIO

En los mamíferos, el hígado, es un órgano muy irrigado (a él le llega el 24% del gasto cardíaco) que tiene diversas funciones como la síntesis de ácidos biliares que participan en la digestión de los alimentos, el metabolismo de glúcidos y lípidos, la reserva de ciertos elementos, vitaminas (como la B₁₂) y glucógeno, y la síntesis de factores de coagulación (como el fibrinógeno y la protrombina). Pero una de sus funciones más destacadas es la detoxificación de la sangre que entra en el parénquima hepático a través de la vena porta. Esta sangre que se recoge del tracto intestinal y el bazo, confluye en el hígado y pasa a través del mismo para que los nutrientes y otras moléculas, como los principios activos de los fármacos y las toxinas, sean metabolizadas [152]. Del proceso de metabolización de las toxinas pueden resultar moléculas inocuas, o moléculas con una mayor capacidad nociva que la que

tenían antes de ser metabolizadas [153]. Sabiendo que al hígado llega gran parte del volumen sanguíneo circulante, y que en él se metaboliza casi toda sustancia que vaya a ser excretada del organismo, no debe extrañar que muchas toxinas tengan un efecto nocivo sobre este órgano, aún en el supuesto de que éste no fuese su diana principal. Por eso el hígado es un órgano a tener en cuenta en el estudio de las toxinas.

Para el estudio del efecto de sustancias sobre la función hepática, el empleo de modelos de experimentación *in vitro* ofrece ciertas ventajas frente al empleo de modelos animales. Las necesarias consideraciones éticas en el ámbito de la investigación empujan a reducir al máximo el número de animales empleados con fines científicos y experimentales. En este sentido, con el empleo de cultivos celulares, como método alternativo, se satisface la regla de las tres erres (reemplazo, reducción y refinamiento). Ésta “regla” se contempla ya desde los años 50 por la comunidad científica, y la normativa europea y nacional (relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos) exige su cumplimiento. En este contexto, se escogió como modelo de estudio dos líneas celulares de origen hepático: una línea de hepatocarcinoma humano (HEPG2) y otra de hepatocitos inmortalizados de rata (Clone 9). Tras comprobar en los primeros estudios, la variabilidad en los efectos que el AO y la DTX-2 tienen en función de la línea celular, y considerando lo que otros autores habían visto previamente respecto a la mayor sensibilidad de los hepatocitos primarios frente a algunas toxinas, nos decantamos por el empleo de H.P. de rata en los experimentos consiguientes. Estos cultivos primarios mantienen unas características más próximas a los hepatocitos en su ambiente natural que las líneas celulares, por lo tanto los estudios llevados a cabo con cultivos primarios, son más relevantes, aunque también más complejos. Aportan datos acerca del efecto que pueden tener las toxinas, que generalmente son más reproducibles en el animal vivo, y por tanto son más útiles a la hora de determinar el potencial daño que estas puedan inducir.

OBJETIVOS

2-OBJETIVOS

La creciente presencia de diversas ficotoxinas, tanto en aguas marinas como en los recursos hídricos, ha despertado gran interés en la comunidad científica por conocer cómo estas moléculas ejercen su toxicidad sobre los seres vivos.

El objetivo de la presente tesis doctoral es esclarecer, en la medida de lo posible, la citotoxicidad y los mecanismos de acción de las ficotoxinas de agua marina AO y DTX-2, y de agua dulce CYN, sobre dos líneas celulares hepáticas (HepG2 y Clone 9), y sobre H.P. de rata. En este sentido, podemos clasificar nuestros objetivos en dos partes:

- Analizar el efecto comparado del ácido okadaico y de la dinofisistoxina-2 en las líneas hepáticas Clone 9 y HepG2, y en H.P. de rata determinando:
 - **La toxicidad relativa en los distintos tipos celulares.**
 - **La diferencia entre los valores de toxicidad *in vitro*, con los que se conocen *in vivo*.**
 - **Tipo de muerte inducida por ambas toxinas en los distintos tipos celulares.**
 - **Alteraciones en la proliferación celular de las líneas hepáticas en estudio, y de hepatocitos primarios expuestos a mitógenos.**

- Analizar el efecto de la CYN, a concentraciones sub-micromolares, en cultivos de H.P. de rata determinando:
 - **La toxicidad y el tipo de muerte celular inducida por la toxina .**
 - **La posible participación del estrés oxidativo en la inducción de muerte celular.**

- **El efecto en el metabolismo antioxidante celular.**
- **El efecto sobre la síntesis de proteínas.**
- **La relación entre la inhibición de la síntesis de proteínas y la inducción de muerte celular.**

3-PUBLICACIONES

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante el transcurso de esta tesis doctoral. Estos resultados se incluyen en los tres artículos adjuntos, publicados en revistas internacionales. En los dos primeros artículos se muestran los datos obtenidos tras la evaluación comparada de AO y DTX-2 sobre células hepáticas (HepG2, Clone 9 y H.P. de rata), y el tercer artículo recoge los resultados derivados de los ensayos realizados con CYN sobre H.P. de rata. En cada uno de los artículos los resultados se acompañan de la metodología científica empleada y de las conclusiones obtenidas en cada caso.

3.1-Estudio comparado de AO y DTX-2 sobre células hepáticas.

3.1.1-Okadaic acid and dinophysis toxin 2 have differential toxicological effects in hepatic cell lines inducing cell cycle arrest, at G0/G1 or G2/M with aberrant mitosis depending on the cell line.

RESUMEN:

El ácido okadaico es una de las toxinas implicadas en la Intoxicación diarreica por mariscos que afecta al ser humano, y cuya aparición se asocia al consumo de bivalvos contaminados. Las principales toxinas responsables de esta Intoxicación son el ácido okadaico (AO), la dinofisistoxina-1, -2, y -3 (DTX-1, -2 y -3). Por un lado, tras inyección intraperitoneal en ratón, la DTX-2 es aproximadamente un 40% menos tóxica que el AO. Por otro lado, la citotoxicidad y la genotoxicidad del AO es muy variable en función de las líneas celulares en las que se evalúe, por lo que resultados similares podrían esperarse de la DTX-2. Para determinar si efectivamente este supuesto es cierto, nosotros estudiamos el efecto del AO y la DTX-2 en dos líneas celulares de origen hepático: HepG2 y Clone 9. En este estudio se evaluó la citotoxicidad, y el efecto sobre el ciclo celular y su regulación. Los resultados obtenidos indican que en cultivos de Clone 9 tanto el AO como la DTX-2 son equipotentes, mientras que sobre células

de HepG2 el AO es más potente que la DTX-2. Ambas toxinas tienen efectos contrarios en lo que respecta al ciclo celular, ya que detienen el ciclo celular de Clone 9 en G2/M e inducen mitosis aberrantes, mientras que en HepG2 el ciclo celular se detiene en G0/G1. El estudio del efecto de estas toxinas sobre la distribución subcelular de p53 reveló su presencia en el núcleo de ambos tipos celulares. La expresión génica de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas fue diferente para las dos líneas celulares. Las toxinas inducen un incremento en la expresión de ciclinas A, B, y D en las células Clone 9 mientras que en HepG2 las ciclinas A y B decrecen, así como también decrece la expresión de la quinasa 1 dependiente de ciclina.

Okadaic acid and dinophysis toxin 2 have differential toxicological effects in hepatic cell lines inducing cell cycle arrest, at G0/G1 or G2/M with aberrant mitosis depending on the cell line

J. A. Rubiolo · H. López-Alonso · F. V. Vega ·
M. R. Vieytes · L. M. Botana

Received: 12 November 2010 / Accepted: 31 March 2011 / Published online: 22 April 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Okadaic acid is one of the toxins responsible for the human intoxication known as diarrhetic shellfish poisoning, which appears after the consumption of contaminated shellfish. The main diarrhetic shellfish poisoning toxins are okadaic acid, dinophysistoxin-1, -2, and -3. In vivo, after intraperitoneal injection, dinophysistoxin-2 is approximately 40% less toxic than okadaic acid in mice. The cytotoxic and genotoxic effect of okadaic acid varies very significantly in different cell lines, so similar responses could be expected for dinophysistoxin-2. In order to determine whether this was the case, we studied the effect of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in two hepatic cell lines (HepG2 and Clone 9). The cytotoxicity of these toxins, as well as their effects on the cell cycle and its regulation on both cell lines, were determined. Okadaic acid and dinophysistoxin-2 resulted to be equipotent in clone 9 cultures, while okadaic acid was more potent than dinophysistoxin-2 in HepG2 cell cultures. Both toxins had opposite effects on the cell cycle; they arrested the cell cycle of clone 9 cells in G2/M inducing aberrant mitosis while arresting the cell cycle of HepG2 in G0/G1. When the effect of the toxins on p53 subcellular distribution was studied, p53 was detected in the nuclei of both cell types. The effect of the toxins on the gene expression of cyclins and cyclin-dependent kinases was different for both cell lines. The toxins induced an increase in gene expression of cyclins A, B, and D in clone 9 cells while they induced a

decrease in cyclins A and B in HepG2 cells. They also induced a decrease in cyclin-dependent kinase 1 in HepG2 cells.

Keywords Okadaic acid · Dinophysis toxin-2 · Differential toxicity · Cell cycle

Introduction

Okadaic acid (OA) is one of the toxins responsible for the human intoxication known as diarrhetic shellfish poisoning (DSP), which appears after the consumption of contaminated shellfish. The main DSP toxins are OA and dinophysistoxin-1, -2, and -3 (Yasumoto et al. 1985). While OA is the predominant toxin in Europe, high amounts of dinophysis toxin 2 (DTX-2) have been detected in Spain and Portugal (Blanco et al. 1995; Vale and Sampayo 2000). It is also the predominant DSP toxin in Irish mussel (Carmody et al. 1996). OA and the DTXs are polyketide compounds containing furane and pyrane-type ether rings and an alpha-hydroxycarboxyl function. The difference between them is only the number or position of the methyl groups (Dominguez et al. 2010). DTX-2 is an isomer of OA where the methyl group at the 31-position in OA is absent, and an axial methyl group is located at the 35-position (Huhn et al. 2009).

OA is a potent inhibitor of 1, 2a, and 3 serine/threonine protein phosphatases (Fujiki and Suganuma 1999). This phosphatase inhibition is now recognized as a general biochemical process of tumor promotion in several organs, including skin, liver, and stomach (Fujiki et al. 1997). The cytotoxicity and genotoxicity of OA have been shown to be cell line dependent; while being genotoxic in hepatocarcinoma HepG2 cells, no such effect was observed in other carcinoma-derived cell lines (Souid-Mensi et al. 2008).

J. A. Rubiolo · H. López-Alonso · L. M. Botana (✉)
Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria,
Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain
e-mail: Luis.Botana@usc.es

J. A. Rubiolo · F. V. Vega · M. R. Vieytes
Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria,
Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

This toxin induces cell cycle arrest at G2/M in wild-type p53 cells. No such arrest is observed in cells with mutant p53, which continue to grow with high rates of aberrant mitoses and apoptosis (Milczarek et al. 1999).

In vivo, after oral administration, OA produced lesions in the liver, small intestine, and forestomach (Le Hegarat et al. 2006; Tubaro et al. 2004, 2003). While no data are available on the oral toxicity of DTX-2, after intraperitoneal injection, DTX-2 is approximately 40% less toxic than OA in mice (Aune et al. 2007), and it is also less toxic in primary cultures of cerebellar neurons (Perez-Gomez et al. 2004). Given that the cytotoxic and genotoxic effects of OA vary significantly in different cell lines, similar responses for DTX-2 could be expected. Because no comparative information for cytotoxicity and genotoxicity is available for OA and DTX-2 in cell line cultures, we decided to determine whether the difference in potency and the effect on cell proliferation observed in vivo and in primary cell cultures for these toxins was the same for cell lines. For this, we used two hepatic cell lines, one derived from human hepatocarcinoma (HepG2) and another in vitro immortalized hepatic rat cell line (Clone 9). Given that OA, by blocking serine/threonine dephosphorylation, induces cell cycle arrest in wild-type p53 cells (Lohrum and Scheidtmann 1996; Messner et al. 2001; Milczarek et al. 1999; Mordan et al. 1990; Yan et al. 1997; Zhang et al. 1994), we also studied the effect of both toxins on the cell cycle, their effect on tubulin cytoskeleton, and p53 subcellular distribution in both cell lines. Finally, because the cell cycle is a tightly controlled process, which involves the progressive accumulation of cyclins that are involved in the regulation of different parts of the cycle through their interaction with cyclin-dependent kinases (CDKs) (Yam et al. 2002), we determined the effect of OA and DTX-2 on the mRNA expression of these molecules in C9 and HepG2 cells treated with OA or DTX-2.

Materials and methods

Cells culture and maintenance

Clone 9 and HepG2 cells (ATCC) were cultured in different cell culture treated supports with Ham F12 K medium (Sigma) for C9 cells or E-MEM medium (Sigma) for HepG2 cells supplemented with 10% fetal bovine serum (BioWittakerTM), 100 UI/ml penicillin (Calbiochem), and 1.2 μ M streptomycin (Sigma) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

MTT assay

Cells were seeded in 96-well plates at a concentration of 5,000 cells per well in 100 μ l of medium; 24 h after

plating, cells were treated with OA or DTX-2 (CIFGA laboratories, Spain) and incubated for different periods of time as described in results. MTT (Sigma), 5 mg/ml, was added 4 h before the incubation period ended after which the samples' absorbances were read in a Bio-Tek Synergy 4 plate reader at wavelengths of 570 and 670 nm (reference). Each treatment was measured with an $n = 6$, and the assay was repeated three times for each cell line and time tested.

Flow imaging cytometry

Cells treated for 24 h with vehicle, OA, or DTX-2 were detached from the plates with Accutase (PAA) and washed twice with PBS. Cells were fixed with 70% ethanol for 30 min at 4°C. Fixed cells were washed with PBS and resuspended in a solution of PBS with 100 μ g/ml propidium iodide (Sigma) and 0.5 mg/ml RNase (Sigma). After 30 min of incubation in this solution, 10,000 events were acquired with an AMNIS ImageStream imaging flow cytometer, and the analysis was performed with the IDEAS[®] 3.0 Cell Image Analysis Software. Each condition was analyzed by triplicate, and two experiments for each cell type were performed.

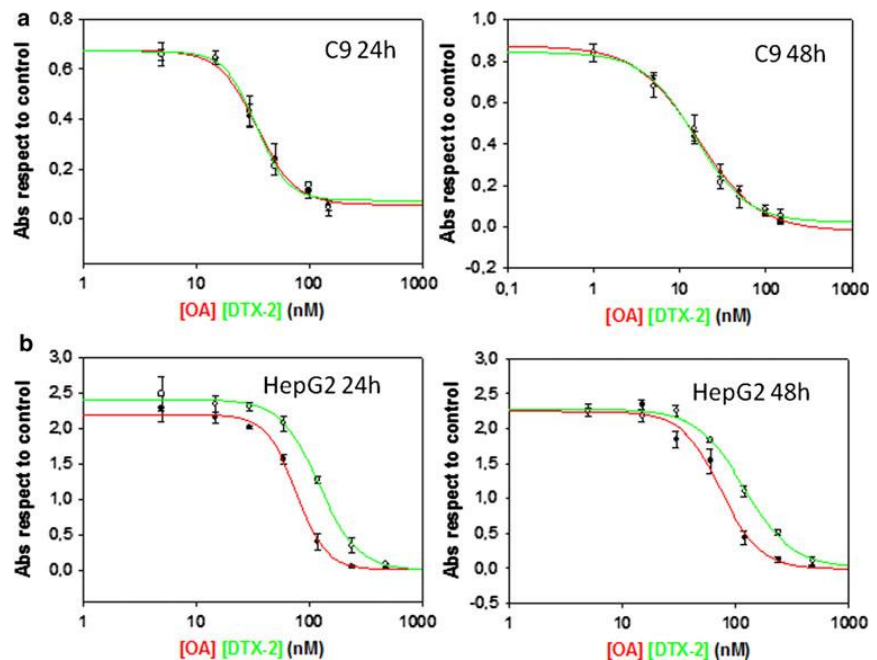
Confocal microscopy

To detect p53, C9 or HepG2 cells grown on coverslips were treated with 30 nM OA or DTX-2 for 24 h. The treated and control cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at 4°C. Fixed cells were washed with PBS and blocked with PBS, 1% BSA, and 0.1% Triton $\times 100$ for 1 h. The slides were then incubated with an anti-p53 (PromoKine) 1:300 for 3 h. After washing with PBS, the secondary antibody (Molecular Probes[®]) was added at a 1:500 concentration. Finally, cells were washed 3 times with PBS adding 1 μ M Hoechst 33258 in the last wash for nuclei counterstaining.

For tubulin detection, cells grown on coverslips were treated with 30 nM OA or DTX-2 for 24 h. After these treatments, cells were fixed in methanol during 5 min at -20° C. Fixed cells were washed in PBS and blocked with PBS, 1% BSA, and 0.1% Triton $\times 100$ for 1 h. After blocking, cells were incubated with anti- β -tubulin (Sigma) 1:500 for 2 h. The coverslips were washed 3 times with PBS and incubated with the secondary fluorescent antibody (ZyMax), 1:1,000, for 1 h. After this incubation, cells were washed 3 times with PBS, including Hoechst 33258 at a 1 μ M concentration in the last wash to stain the nuclei.

The stained cells were analyzed with a Nikon TE2000-3 confocal microscope. Representative photographs for each treatment and for controls are included.

Fig. 1 Toxicity of OA and DTX-2 on C9 and HepG2 cells. Cultures were treated with the toxins for 24 and 48 h. Toxicity was determined by the MTT reduction assay. **a** OA and DTX-2 showed the same toxicity in C9 cells at 24 and 48 h of incubation. **b** OA showed a higher toxicity than DTX-2 in HepG2 cells after 24 and 48 h of incubation with no difference in the IC₅₀s at both times tested



Real-time PCR

Cells were treated with 15 or 30 nM OA or DTX-2 for 24 h. Total RNA was extracted with PureZOL™ (BIO-RAD) following manufacturer instructions. After DNase treatment, reverse transcription was performed with RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas). The cDNA was analyzed for differential expression of cyclins and cyclin dependent kinases A1, B2, D, CDK1, and CDK2 using cyclophilin as housekeeper for normalization in an Applied Biosystems StepOne real-time PCR system with a FastStart™ Universal SYBR Green Master kit (Roche). Calibrator ΔC_T values were calculated as the difference between the C_T value of the endogenous control and target. This ΔC_T for the calibrator was compared with the ΔC_T value of each of the unknown cDNA samples. The differences between these values resulted in the $\Delta\Delta C_T$ value for each gene. The relative fold expression (RQ) was determined by $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Base 2 logarithms of the RQ were plotted and are presented in this work. Each treatment was analyzed in triplicate, and three experiments were done.

Statistical analysis

The results were analyzed using the software SIGMAPLOT®. One-way ANOVA was employed for comparison of significant differences among groups. Comparisons between groups were made by the Holm–Sidak multiple

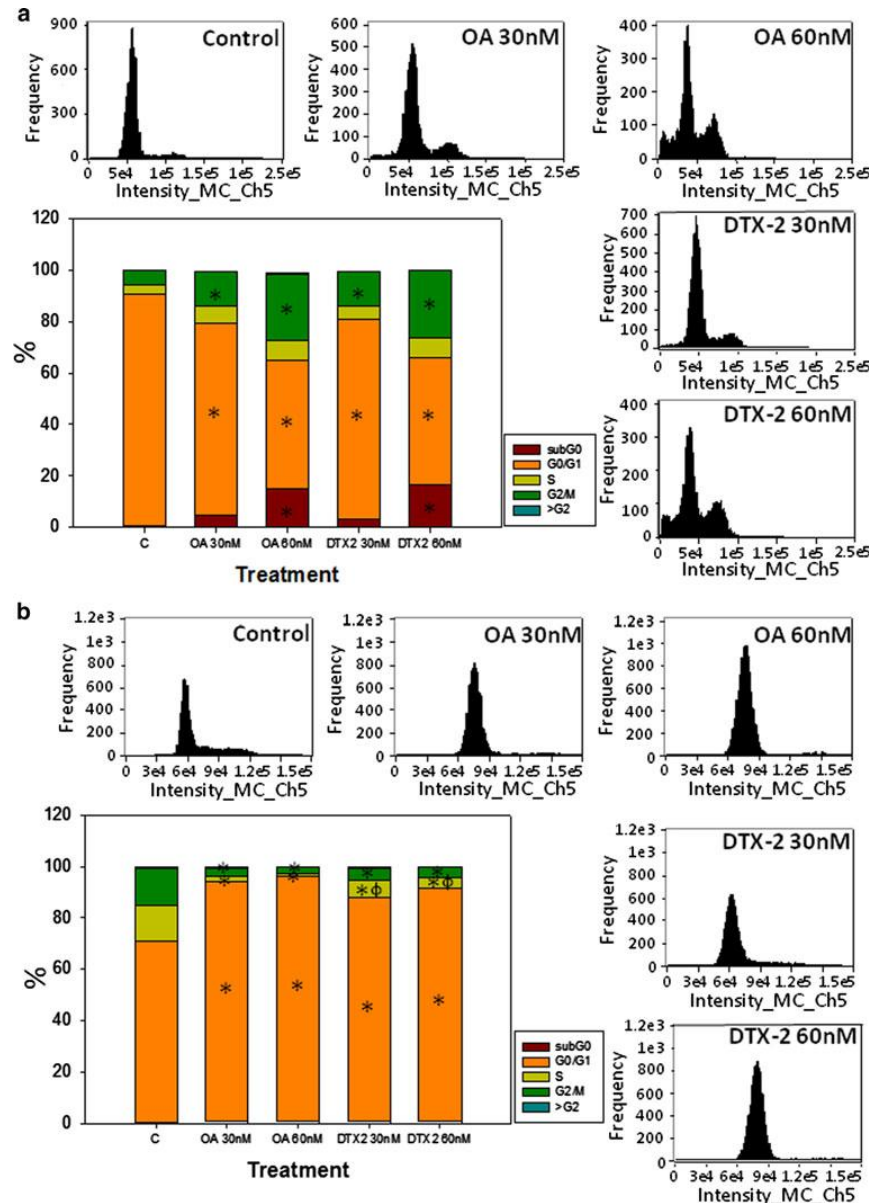
range test. A $P < 0.05$ ($n \geq 3$) value was considered significant.

Results

When C9 cells were treated with OA or DTX-2 for 24 or 48 h, no difference in potency between the toxins was observed at either time studied. The IC₅₀s calculated for both toxins were 35 and 16 nM after 24 and 48 h of incubation, respectively (Fig. 1a). On the other hand, DTX-2 showed a lower toxicity than OA in HepG2 cells after 24 and 48 h of incubation with no significant difference between both IC₅₀s at 24 and 48 h. The toxicity of DTX-2 was 0.6 that of OA. The IC₅₀s calculated for OA and DTX-2 were 77 and 124 nM after 24 h of incubation, respectively, and 75 and 119 nM after 48 h of incubation, respectively (Fig. 1b).

The effect of both toxins on the cell cycle of C9 and HepG2 cells was different. In C9 cells, OA and DTX-2 inhibited the cell cycle in G2 with no difference in the arrested cell population generated by each toxin (Fig. 2a; Table 1). A large population of the cells was unable to complete mitosis, and when this occurred, aberrant mitosis was observed (Fig. 3). The cell population with multiple nuclei with different DNA content was 21 and 17.8% for 30 and 60 nM OA, respectively, and 20.6 and 17.8 for 30 and 60 nM DTX-2, respectively (Fig. 3). On the other

Fig. 2 Flow cytometric analysis of 30 and 60 nM OA- or DTX-2-treated C9 and HepG2 cells. Cells were treated for 24 h in the presence of each toxin. **a** Examples of the histograms obtained with C9 cells treated with vehicle, OA and DTX-2, and quantification of cells in each population. * Significant differences with respective control ($P < 0.01$, $n = 3$). **b** Examples of the histograms obtained with HepG2 cells treated with OA and DTX-2 and quantification of cells in each population. * Significant differences with respective control ($P < 0.01$, $n = 3$). ϕ Significant differences with OA-treated cells ($P < 0.05$, $n = 3$)



hand, OA and DTX-2 inhibited the cell cycle of HepG2 cells at G1 with a different potency. OA-treated cells showed a higher number of cells arrested in G0/G1 than DTX-2-treated cells (Fig. 2b; Table 1).

Tubulin cytoskeleton was studied by confocal microscopy. In C9 cells, both toxins induced aberrant mitoses. While normal mitosis was observed in control cells, abnormal mitotic spindles, including tri-polar mitotic spindles, were observed with defects in metaphase, anaphase, and telophase. Also, lower fluorescence intensity

was observed for tubulin in toxin-treated cells pointing to tubulin depolymerization induced by both toxins. DNA staining showed multiple abnormal nuclei consequence of aberrant mitosis (Fig. 4). This effect on mitosis or DNA was not observed in HepG2 cells exposed to OA or DTX-2. In this case, toxin-treated cells showed a granulated pattern indicating a depolymerizing effect of both toxins on these cells. While mitotic spindles were observed in control cells, no such structures could be detected in toxin-treated cells (Fig. 5).

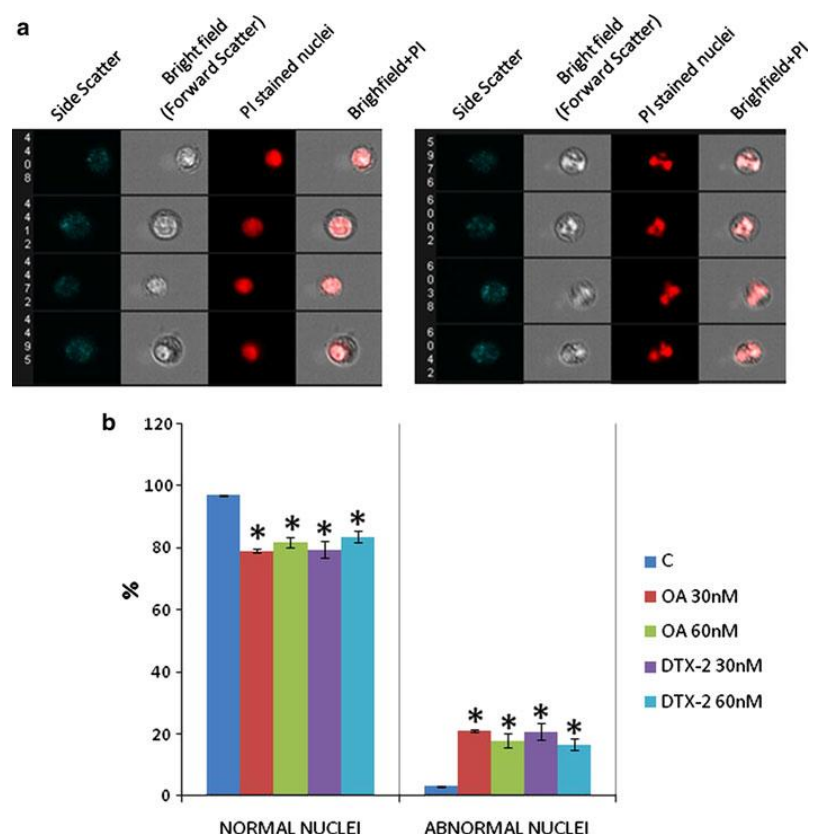
Table 1 Percentage cell population for the cell cycle analysis by flow cytometry of C9 and HepG2 cells treated with OA and DTX-2

	Clone9					HepG2				
	sub-G0	G0/G1	S	G2/M	>G2	sub-G0	G0/G1	S	G2/M	>G2
C	0.855	89.9	3.385	5.535	0.225	0.165	70.55	14.05	14.7	0.275
OA30 nM	4.615	74.75*	6.37	13.55*	0.25	0.92	93*	2.195*	3.255*	0.39
OA60 nM	15*	50.15*	7.46	25.7*	0.52	0.63	95.4*	1*	2.545*	0.27
DTX30 nM	3.385	77.6*	4.925	13.25*	0.23	0.755	87.05* ^ϕ	6.635*	5.06*	0.105
DTX60 nM	16.35*	49.7*	7.75	26*	0.2	0.63	91.1* ^ϕ	3.9*	4.095*	0.275

* Significant differences with respective control for each treatment and cell cycle phase. $P < 0.01$, $n = 3$

^ϕ Significant differences with OA-treated cells. $P < 0.05$, $n = 3$

Fig. 3 Analysis of the G2/M cell population in OA- and DTX-2-treated cells by imaging flow cytometry. Cells in G2/M were gated to quantify aberrant mitotic nuclei. **a** Images corresponding to the populations gated. **b** Quantification of cells in both populations. *Significant differences with respective control ($P < 0.05$, $n = 3$)

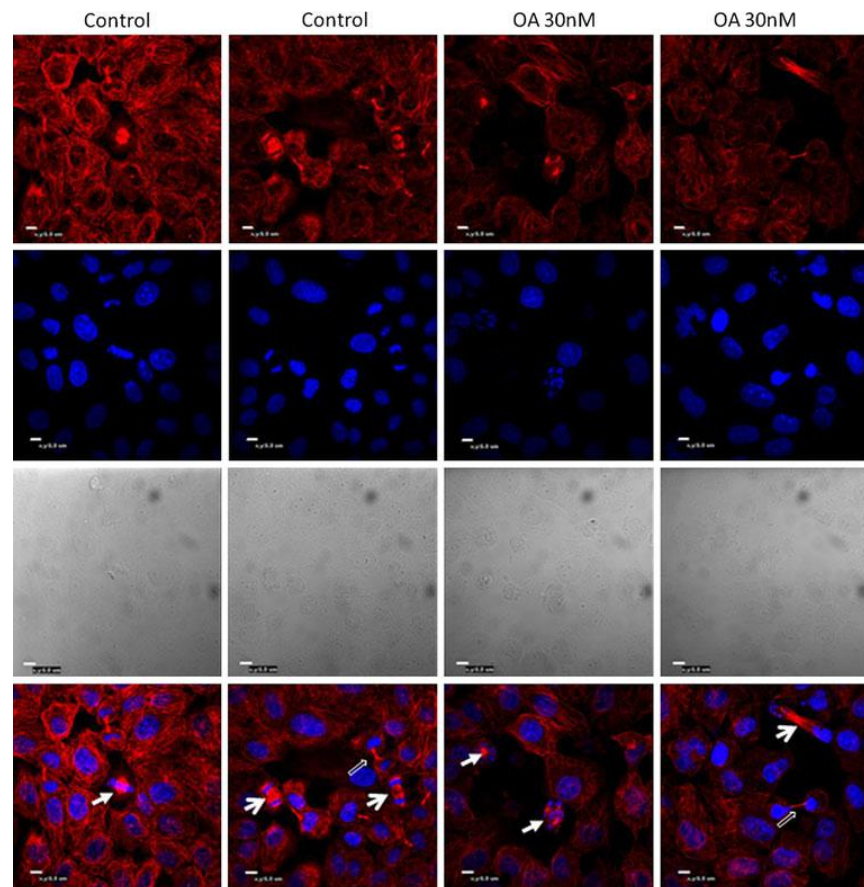


Both toxins induced nuclear accumulation of p53 in C9 and HepG2 cells. While p53 was detected in the cytoplasm and nuclei of C9 cells, p53 was increased in nuclei of toxin-treated cells. After 24 h of exposure to 30 nM OA or DTX-2, this transcription factor was detected in abnormal nuclei as well as in cells with normal nuclei (Fig. 6a). In HepG2 cells, p53 appeared in the cytoplasm with higher concentration in the perinuclear area. When these cells

were treated with 30 nM OA or DTX-2, p53 migrated to the cell nucleus in both cases, indicating activation of the transcription factor by the toxin (Fig. 6b).

Given the different effects on the cell cycle observed for both toxins in C9 with respect to HepG2, the effects of OA and DTX-2 on the mRNA expression levels of cyclins A, B, and D as well as the expression of cyclin-dependent kinases CDK1 and CDK2 were determined in C9 and

Fig. 4 Tubulin and DNA were stained in OA- and DTX-2-treated C9 cells and analyzed by confocal microscopy. Representative fields for tubulin and DNA staining as well as the bright field and combined tubulin plus DNA are shown. *Dashed arrow* metaphase; *solid arrow* anaphase; *empty arrow* telophase

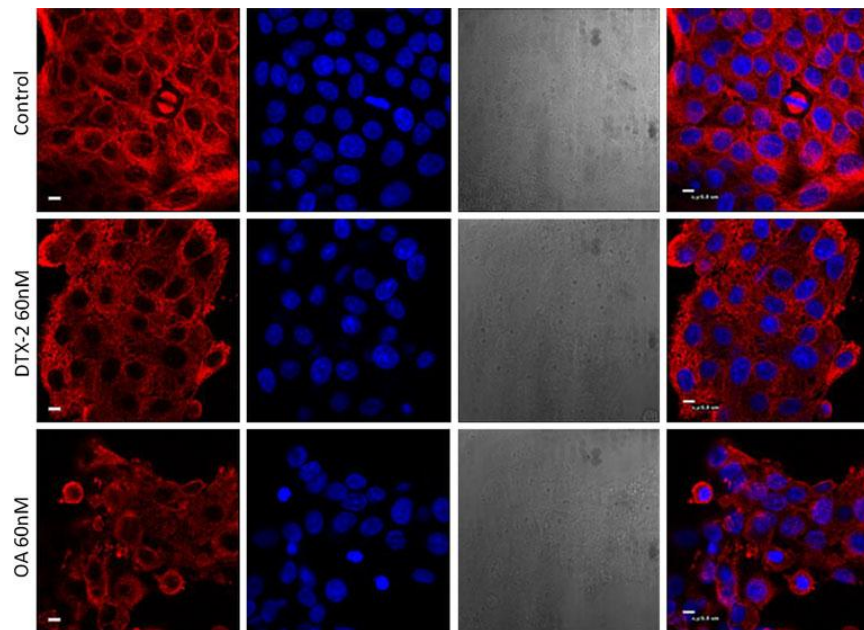


HepG2 treated with 30 nM OA or DTX-2 for 24 h. Cyclins A1, B2, and D were increased in C9 cells treated with OA or DTX-2 when compared to control cells with no significant difference between OA- and DTX-2-treated cells. In these cultures, both toxins had no effect on the expression of CDK1 and CDK2 mRNA. In the case of HepG2, cells treated with OA and DTX-2 showed a decrease in cyclins A1 and B2 mRNA, with a small increase in cyclin D mRNA. There was a significant difference between the decrease in cyclins A1 and B2 induced by OA when compared to that induced by DTX-2. CDK1 expression was also downregulated by OA-treated cells with no change observed in DTX-2-treated cells. The decrease in CDK2 observed in OA- and DTX-2-treated cells, even though significant, was of a very small magnitude (Fig. 7). Given that the cell cycle arrest in HepG2 cells occurred at G0/G1, cyclin E expression was also measured in OA- and DTX-2-treated cells and compared to control cells, no change in this mRNA was observed (results not shown).

Discussion

In this work, we show that OA and DTX-2 are equipotent in a rat-derived hepatic cell line (Clone 9) and that DTX-2 is less toxic than OA in HepG2 cells, a cell line derived from a human tumor. When these results are compared with existing data, it becomes evident that determining the relative potencies of diarrhetic toxins with studies in cell lines is not the right approach. Our results with hepatic cell lines show that they can respond in different ways to the toxicity of diarrhetic toxins. In one case, no difference in toxicity between OA and DTX-2 was observed, while in the other case, DTX-2 was less toxic than OA with a potency difference similar to that observed in vivo (Aune et al. 2007). Okadaic acid toxicity in this study is similar to that observed in other works that define IC50s between 5 and 100 nM (Diogene et al. 1995; Huynh-Delerme et al. 2003; Leira et al. 2001; Tubaro et al. 1996). DTX-2 has been reported to be less toxic than OA in primary cultures

Fig. 5 Tubulin and DNA were stained in OA- and DTX-2-treated HepG2 cells and analyzed by confocal microscopy. Representative images for tubulin and DNA staining as well as the bright field and combined tubulin plus DNA are shown



of cerebellar neurons (Perez-Gomez et al. 2004). When compared with the results presented in this work for HepG2 cells, the difference between the toxicity of DTX-2 and OA is much higher in cerebellar neurons.

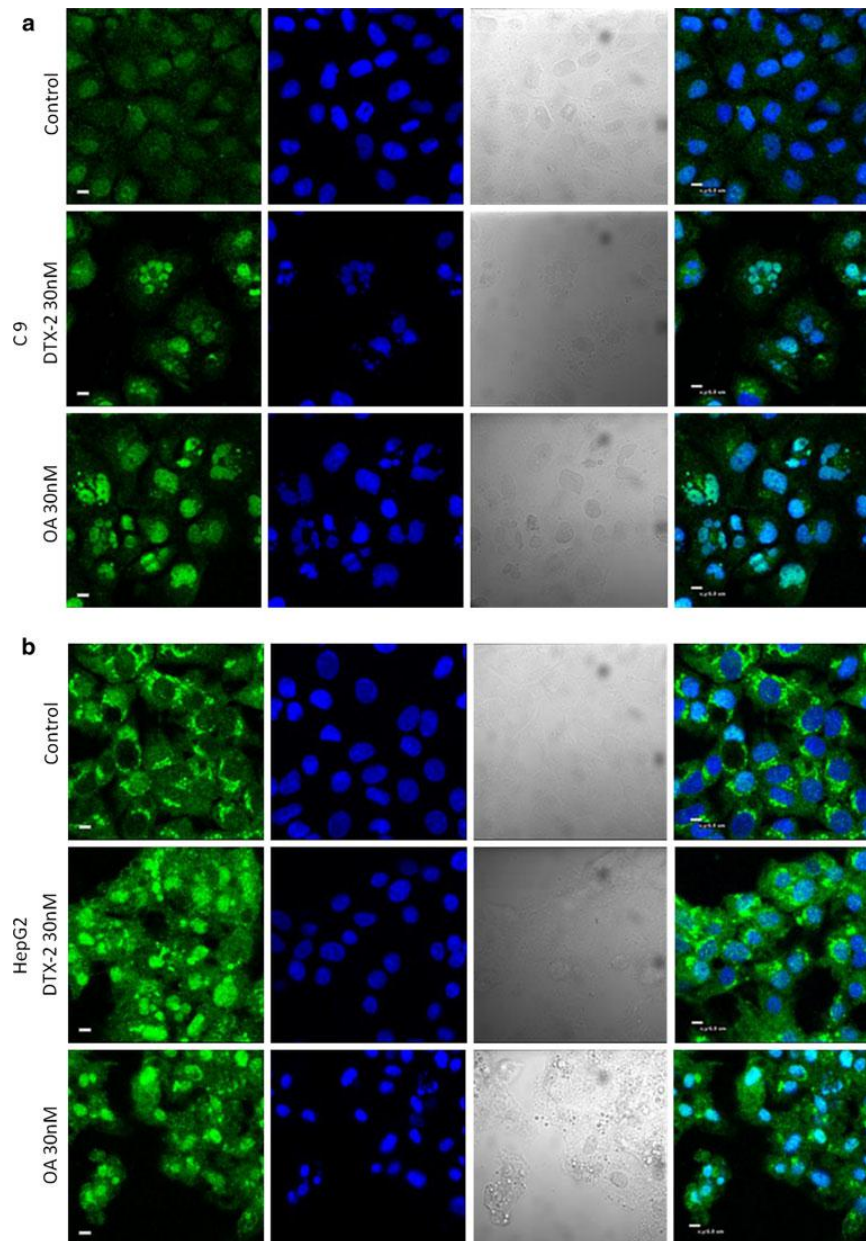
Another difference observed between the cell lines studied was that both toxins inhibited the cell cycle at different stages. They inhibited the cell cycle at G2/M in C9 cells in a similar manner. This was not the case of HepG2 cells, where inhibition of the cell cycle was at G0/G1, with a higher inhibition by OA when compared to DTX-2. In both cases, no increment in the cell population with higher ploidy than G2 was observed, indicating that the toxins are incapable of inducing endoreduplication in these cell lines. This observation indicates that the aberrant mitosis observed in C9 occurs with no increment or loss of DNA during this process. Since cells with this type of damage, consequence of aberrant mitosis, would not be able to multiply, the abnormal mitosis could be the reason of cell death, given that cells with this type of damage would get arrested at G2/M and become unable to proceed with the cell cycle. This is supported by the data obtained for the aberrant mitotic cell population in G2/M, where there is a lower number of this type of cells in 60 nM OA- or DTX-2-treated cultures when compared to 30 nM OA- or DTX-2-treated ones, with a higher sub-G0 population in the first case, indicating a higher degree of apoptosis.

The effect of both toxins on the tubulin cytoskeleton of C9 and HepG2 cells differed. In the first cell line, important defects on the mitotic spindle formation were observed.

This was not evident in HepG2 cells. The abnormal mitotic spindles observed in C9 cells treated with OA or DTX-2 lead to aberrant mitosis given that cells escaped the mitotic restriction observed with this type of damage.

The effects of the toxins on the cell cycle of C9 and HepG2 cells were reflected on the cyclin expression profile in treated cells when compared to control. In C9, there is an increment of cyclins A, B, and D. It has been demonstrated that in cells with failures in the mitotic checkpoint, which result in improper chromosome alienation during mitosis, cells exiting mitosis without segregating their chromosomes properly suffer apoptosis signaling (Warrener et al. 2003). Also in vivo, OA induces the expression of cyclin B1 and mitotic catastrophe, which is a combination of deficient cell cycle checkpoints and cellular damage (Castedo et al. 2004), in rat cortex (Chen et al. 2006). The increment of cyclins A and B1 in C9 cells treated with OA or DTX-2 is in agreement with cell death induced by apoptosis triggered by aberrant chromosomes segregation. On the other hand, even though cyclin D was augmented in toxin-treated HepG2 cells, cyclins A2 and B1 were downregulated in these cells. This effect of OA and DTX-2 on cyclin expression is in agreement with the observed cell cycle arrest at G0/G1 with no aberrant mitosis. Cyclin A is synthesized at the onset of S phase and localizes at the sites of DNA replication (Cardoso et al. 1993; Sobczak-Thepot et al. 1993). In the histograms presented in Fig. 2b, a small displacement to the right can be observed in OA- and DTX-2-treated cells when

Fig. 6 p53 detection by confocal microscopy in C9 and HepG2 cells treated with 30 nM OA or DTX-2 for 24 h. DNA was counterstained with HOECHST 33258

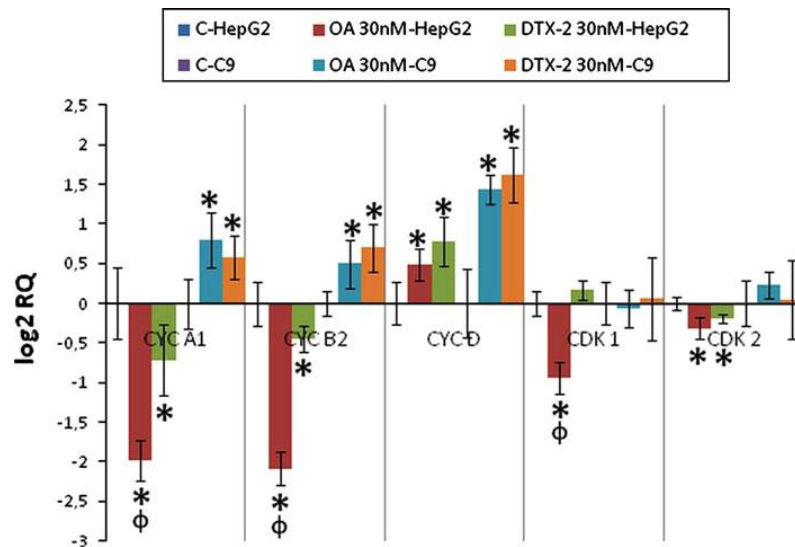


compared to control cells indicating that these cells are between the G1 and S phases or are all ready in S but arrested by the lack of cyclin A1. Accumulation of cells in S phase has been observed in the intestinal-derived Caco-2 cells treated with OA at similar concentrations as used in this work (Traore et al. 2001), supporting the last possibility for HepG2 cells. Still, we consider that further research is necessary to establish which is the case in

HepG2 cells. Also, because cyclins and CDKs are regulated by phosphorylation, we are conducting experiments to determine if this process is affected by the inhibition of ser/thr phosphatases by OA or DTX-2.

When the effect of OA and DTX-2 on p53 was studied, we observed that in both cell lines the toxins induced the migration of p53 to the cell nuclei. In HepG2, this effect could account for the cell cycle inhibition in G0/G1. Even

Fig. 7 C9 and HepG2 cells were treated with 30 nM OA or DTX-2 for 24 h, and cyclin A1, B2, D, CDK1, and CDK2 mRNA were quantified by real-time PCR. * Significant differences with respective control ($P < 0.01$, $n = 3$). ϕ Significant differences between OA- and DTX-2-treated cells ($P < 0.01$, $n = 3$)



though C9 cells can escape G2/M inhibition generating mitotically aberrant cells, p53 has been shown to be active in this type of event. When cells with damage in the mitotic spindle escape the p53-independent checkpoint, which functions at the metaphase–anaphase transition and prevents cells from progressing through mitosis until completion of spindle formation, sister chromatids fail to segregate properly. When this happens, p53 responds to the mitotic failure instituting a G1-like growth arrest and inhibiting cell division (Meek 2000; Vogel et al. 2004). Also, p53-null cells fail to undergo cell division, but they are not prevented from re-entering the cell cycle and can reduplicate their DNA leading to polyploidy (Meek 2000; Vogel et al. 2004). For these reasons, p53 prevents C9 cells to re-enter the cell cycle and induce apoptosis in cells after suffering aberrant mitosis. This work allows a better understanding of the mechanism of toxicity of phosphatase inhibitors and provides evidence to conclude that the potency of OA and DTX-2 are equivalent both in vitro (for HepG2 cells) and in vivo and also shows that hepatocytes and clone 9 cells are biochemically different with regard to these toxins.

Acknowledgments This work was funded with the following grants: From Xunta de Galicia, Spain: 2008/CP389 (EPITOX, Consell. Innovación e Industria, programa IN.CI.TE.), GRC 30/2006, and PGIDT07CSA012261PR, PGDIT 07MMA006261PR, 2009/XA044 (Consell. Educación). From Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain: AGL2007-60946/ALI, SAF2009-12581 (subprograma NEF), AGL2009-13581-CO2-01. From EU VIth Frame Program: IP FOOD-CT-2004-06988 (BIOCOP). From EU VIIth Frame Program: 211326—CP (CONFIDENCE); STC-CP2008-1-555612 (Atlantox), 2009-1/117 Pharamatlantic.

References

- Aune T, Larsen S, Aasen JA, Rehmann N, Satake M, Hess P (2007) Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice. *Toxicol* 49(1):1–7. doi:10.1016/j.toxicol.2006.07.033
- Blanco J, Fernández M, Marino J, Reguera B, Míguez A, Maneiro J, Cacho E, Martínez A (1995) From Dinophysis spp. toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: Lassus PA, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (eds) Harmful marine algal blooms. Lavoisier Science Publishers, Paris, pp 777–782
- Cardoso MC, Leonhardt H, Nadal-Ginard B (1993) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* 74(6):979–992. doi:0092-8674(93)90721-2
- Carmody EP, James KJ, Kelly SS (1996) Dinophysistoxin-2: the predominant diarrhoeic shellfish toxin in Ireland. *Toxicol* 34(3):351–359. doi:0041010195001417
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23(16):2825–2837. doi:10.1038/sj.onc.1207528
- Chen B, Cheng M, Hong DJ, Sun FY, Zhu CQ (2006) Okadaic acid induced cyclin B1 expression and mitotic catastrophe in rat cortex. *Neurosci Lett* 406(3):178–182. doi:10.1016/j.neulet.2006.06.074
- Diogene G, Fessard V, Dubreuil A, Puisieux-Dao S (1995) Comparative studies of the actin cytoskeleton response to maitotoxin and okadaic acid. *Toxicol In Vitro* 9(1):1–10. doi:0887-2333(94)00186-X
- Dominguez HJ, Paz B, Daranas AH, Norte M, Franco JM, Fernandez JJ (2010) Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicol* 56(2):191–217. doi:10.1016/j.toxicol.2009.11.005
- Fujiki H, Suganuma M (1999) Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *J Cancer Res Clin Oncol* 125(3–4):150–155

- Fujiki H, Sueoka E, Komori A, Suganuma M (1997) Tumor promotion and TNF- α gene expression by the okadaic acid class tumor promoters. *Environ Carcinog Ecotoxicol Rev C* 15:1–40
- Huhn J, Jeffrey PD, Larsen K, Rundberget T, Rise F, Cox NR, Arcus V, Shi Y, Miles CO (2009) A structural basis for the reduced toxicity of dinophysistoxin-2. *Chem Res Toxicol* 22(11):1782–1786. doi:10.1021/tx900162z
- Huynh-Delerme C, Fessard V, Kiefer-Biasizzo H, Puiseux-Dao S (2003) Characteristics of okadaic acid-induced cytotoxic effects in CHO K1 cells. *Environ Toxicol* 18(6):383–394. doi:10.1002/tox.10140
- Le Hegarat L, Jacquin AG, Bazin E, Fessard V (2006) Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid, in human Caco-2 cells and in mice gut cells. *Environ Toxicol* 21(1):55–64. doi:10.1002/tox.20154
- Leira F, Alvarez C, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM (2001) Study of cytoskeletal changes induced by okadaic acid in BE(2)-M17 cells by means of a quantitative fluorimetric microplate assay. *Toxicol In Vitro* 15(4–5):277–282. doi:S0887-2333(01)00021-2
- Lohrum M, Scheidtmann KH (1996) Differential effects of phosphorylation of rat p53 on transactivation of promoters derived from different p53 responsive genes. *Oncogene* 13(12):2527–2539
- Meek DW (2000) The role of p53 in the response to mitotic spindle damage. *Pathol Biol* 48(3):246–254
- Messner DJ, Ao P, Jagdale AB, Boynton AL (2001) Abbreviated cell cycle progression induced by the serine/threonine protein phosphatase inhibitor okadaic acid at concentrations that promote neoplastic transformation. *Carcinogenesis* 22(8):1163–1172
- Milczarek GJ, Chen W, Gupta A, Martinez JD, Bowden GT (1999) Okadaic acid mediates p53 hyperphosphorylation and growth arrest in cells with wild-type p53 but increases aberrant mitoses in cells with non-functional p53. *Carcinogenesis* 20(6):1043–1048
- Mordan LJ, Dean NM, Honkanen RE, Boynton AL (1990) Okadaic acid: a reversible inhibitor of neoplastic transformation of mouse fibroblasts. *Cancer Commun* 2(7):237–241
- Perez-Gomez A, Garcia-Rodriguez A, James KJ, Ferrero-Gutierrez A, Novelli A, Fernandez-Sanchez MT (2004) The marine toxin dinophysistoxin-2 induces differential apoptotic death of rat cerebellar neurons and astrocytes. *Toxicol Sci* 80(1):74–82. doi:10.1093/toxsci/kfh139
- Sobczak-Thopot J, Harper F, Florentin Y, Zindy F, Brechot C, Puvion E (1993) Localization of cyclin A at the sites of cellular DNA replication. *Exp Cell Res* 206(1):43–48. doi:10.1006/excr.1993.1118
- Soud-Mensi G, Moukha S, Mobio TA, Maaroufi K, Creppy EE (2008) The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicol* 51(8):1338–1344. doi:10.1016/j.toxicol.2008.03.002
- Traore A, Baudrimont I, Ambaliou S, Dano SD, Creppy EE (2001) DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco-2 cells, a human colonic epithelial cell line. *Arch Toxicol* 75(2):110–117
- Tubaro A, Florio C, Luxich E, Sosa S, Della Loggia R, Yasumoto T (1996) A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicol* 34(7):743–752. doi:S004101019600027X
- Tubaro A, Sosa S, Carbonatto M, Altinier G, Vita F, Melato M, Satake M, Yasumoto T (2003) Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicol* 41(7):783–792. doi:10.1016/j.toxicol.2004.02.015
- Tubaro A, Sosa S, Altinier G, Soranzo MR, Satake M, Della Loggia R, Yasumoto T (2004) Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice. *Toxicol* 43(4):439–445. doi:10.1016/j.toxicol.2004.02.015
- Vale P, Sampayo MA (2000) Dinophysistoxin-2: a rare diarrhoeic toxin associated with Dinophysis acuta. *Toxicol* 38(11):1599–1606. doi:S0041-0101(00)00079-9
- Vogel C, Kienitz A, Hofmann I, Muller R, Bastians H (2004) Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. *Oncogene* 23(41):6845–6853. doi:10.1038/sj.onc.1207860
- Warrener R, Beamish H, Burgess A, Waterhouse NJ, Giles N, Fairlie D, Gabrielli B (2003) Tumor cell-selective cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints. *FASEB J* 17(11):1550–1552. doi:10.1096/fj.02-1003fje
- Yam CH, Fung TK, Poon RY (2002) Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 59(8):1317–1326
- Yan Y, Shay JW, Wright WE, Mumby MC (1997) Inhibition of protein phosphatase activity induces p53-dependent apoptosis in the absence of p53 transactivation. *J Biol Chem* 272(24):15220–15226
- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto G, Clardy J (1985) Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41:1019–1025
- Zhang W, McClain C, Gau JP, Guo XY, Deisseroth AB (1994) Hyperphosphorylation of p53 induced by okadaic acid attenuates its transcriptional activation function. *Cancer Res* 54(16):4448–4453

3.1.2- Comparative study of toxicological and cell cycle effects of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in primary rat hepatocytes.

RESUMEN:

En este trabajo nos planteamos como objetivo de este estudio determinar la toxicidad relativa y los efectos que tienen sobre el ciclo celular de hepatocitos primarios de rata en cultivo el ácido okadaico y dinofisistoxina-2. Para evaluar la citotoxicidad se empleó el ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del MTT (metiltiazoltetrazolio), el análisis de la actividad de la caspasa-3, y la liberación de LDH (lactato deshidrogenasa) al medio de cultivo. El ciclo celular se analizó empleando citometría de flujo con análisis de imagen, y el efecto de las toxinas sobre la proliferación celular se evaluó a través de PCR cuantitativa y microscopía confocal.

A partir de los ensayos realizados observamos que para los H.P. en cultivo la DTX-2 es menos tóxica que el AO con una diferencia de potencia similar a la observada *in vivo* en ratones tras inyección intraperitoneal. A su vez, ambas toxinas inducen apoptosis con un incremento significativo de la actividad de la caspasa-3 en los cultivos tratados. Estas toxinas inhibieron el ciclo celular de los hepatocitos en G1, modificando las células diploides y las diploides binucleadas. En hepatocitos proliferantes expuestos a las toxinas se detectó como la expresión del gen y los niveles de proteína p53 decrecieron. Por otro lado, el estudio del citoesqueleto de tubulina de los H.P. expuestos a DTX-2 y AO puso de manifiesto que esta proteína se localizaba en el núcleo, mientras que en el citoplasma mantenía un patrón granulado.

Los datos obtenidos de este trabajo demuestran la diferencia de potencia que tienen el AO y la DTX-2 sobre los H.P. de rata en cultivo, y la diferencia de potencia que tienen es igual a la observada *in vivo* tras inyección intraperitoneal en ratones. Ambas toxinas detuvieron el ciclo celular de los H.P. en G1, incluso de células binucleadas diploides. En esta inhibición del ciclo celular podría estar involucrado p53 así como la tubulina.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Comparative study of toxicological and cell cycle effects of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in primary rat hepatocytes

J.A. Rubiolo ^{a,b}, H. López-Alonso ^a, F.V. Vega ^b, M.R. Vieytes ^b, L.M. Botana ^{a,*}

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

^b Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 April 2011

Accepted 22 December 2011

Keywords:

Primary hepatocytes

Okadaic acid

Dinophysistoxin-2

Cytotoxicity

Cell cycle arrest

ABSTRACT

Aims: To determine the relative toxicity and effects on the cell cycle of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in primary hepatocyte cultures.

Main methods: Cytotoxicity was determined by the MTT method, caspase-3 activity and lactate dehydrogenase release to the medium. The cell cycle analysis was performed by imaging flow cytometry and the effect of the toxins on cell proliferation was studied by quantitative PCR and confocal microscopy.

Key findings: We show that dinophysistoxin-2 is less toxic than okadaic acid for primary hepatocytes with a similar difference in potency as that observed in vivo in mice after intraperitoneal injection. Both toxins induced apoptosis with caspase-3 increase. They also inhibited the hepatocytes cell cycle in G1 affecting diploid cells and diploid bi-nucleated cells. In proliferating hepatocytes exposed to the toxins, a decrease of p53 gene expression as well as a lower protein level was detected. Studies of the tubulin cytoskeleton in toxin treated cells, showed nuclear localization of this molecule and a granulated tubulin pattern in the cytoplasm.

Significance: The results presented in this work show that the difference in toxicity between dinophysistoxin-2 and okadaic acid in cultured primary hepatocytes is the same as that observed in vivo after intraperitoneal injection. Okadaic acid and dinophysistoxin-2 arrest the cell cycle of hepatocytes at G1 even in diploid bi-nucleated cells. p53 and tubulin could be involved in the cell cycle inhibitory effect.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Diarrhetic shellfish poisoning (DSP), first recognized in Japan 30 years ago, is a human gastrointestinal illness caused by the consumption of shellfish contaminated with polyether toxins produced by dinoflagellates belonging to the *Dinophysis* or *Prorocentrum* genera (Vale and Sampayo, 2000; Yasumoto et al., 1979, 1984). The main DSP toxins responsible for the DSP syndrome are okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1, -2 and -3 (DTX-1, -2 and -3) (Yasumoto, et al., 1985). OA and DTXs are polyketide compounds containing furan- and pyran-type ether rings and an alpha-hydroxycarboxylic function, the only difference between them is the number or position of the methyl groups (Dominguez, et al., 2010). DTX-1 is the dominant toxin in Japan, Canada, and Norway (Lee, et al., 1989; Quilliam, et al., 1993; Yasumoto, et al., 1979). While OA is the predominant toxin in Europe, high amounts of DTX-2 have been detected in Spain and Portugal (Blanco, et al., 1995; Vale and Sampayo, 2000), and it is also the predominant species in Irish mussel (Carmody, et al., 1996).

OA, a potent inhibitor of type 1, 2a and 3 serine/threonine protein phosphatases, has been shown to induce apoptosis in liver after oral administration to mice highlighting this organ as one of the potential targets of this toxin (Le Hegarat, et al., 2006). Also, primary rat hepatocyte cytotoxicity has been informed for OA (Espina, et al., 2010). Aune et al. determined that DTX-2 is approximately 40% less toxic than OA by intraperitoneal injection in mice (Aune, et al., 2007) and it is also less toxic in primary cultures of cerebellar neurons (Perez-Gomez, et al., 2004).

In rats and mice, polyploidization affects most of the hepatocytes and is a progressive phenomenon that continues throughout the animal's life. In rats, after 10 weeks of life, the liver consists mainly of tetraploid cells ($2 \times 2n$ and $4n$) and some octoploids ($2 \times 4n$ and $8n$) (Alfert and Geschwind, 1958; Bohm and Noltemeyer, 1981; Brodsky and Uryvaeva, 1977; Severin, et al., 1984). In primary rat hepatocyte cultures most cells are tetraploid, with a small fraction of diploid and octoploid cells. Approximately 30% of the cells are bi-nucleated with two tetraploid or two diploid nuclei (Eckl, 1993). These cells are a consequence of DNA synthesis and mitosis with failure in cell division (Epstein, 1967; Wheatley, 1972). Taking this into consideration, and given the fact that the biochemical pathway elicited by OA (i.e. protein phosphatase inhibition) is recognized as a general biochemical process of tumor promotion in several different organs including skin, liver and glandular stomach (Suganuma, et al., 1988;

* Corresponding author. Tel./fax: +34 982 252 242.

E-mail address: Luis.Botana@usc.es (L.M. Botana).

Suganuma, et al., 1992), we decided to determine the toxicity of OA with respect to DTX-2, and their effect on the cell cycle of primary rat hepatocytes.

Even though p53 is considered to be a growth suppressor capable of preventing cell proliferation in regenerating rat liver, after 70% partial hepatectomy, hepatic p53 gene expression has been shown to increase (Thompson, et al., 1986). It has also been shown that p53 expression is enhanced by HGF in rat hepatocytes in primary culture, contributing to cell proliferation. Furthermore, it has been suggested that p53 positively regulates cell proliferation through the specific induction of promoters for growth-associated factors and growth factor receptors (Inoue, et al., 2002; Thompson, et al., 1986). Because OA inhibits primary hepatocyte proliferation, we determined the variation of the p53 gene expression, protein level, and sub-cellular localization in cultured hepatocytes induced to proliferate with HGF and exposed to OA or DTX-2 in order to determine if this gene could be involved in the growth inhibition elicited by OA.

Materials and methods

Primary rat hepatocytes isolation and culture

Primary rat hepatocytes were obtained from 200 to 300 g Sprague-Dawley male rats fed ad libitum. The Seglen perfusion method was followed with modifications (Seglen, 1976). Rats were anesthetized with a ketamine:xylazine mix (42.5%:20%, Ketolar® 50 mg, Parke Davis; Rompun® 2%, Bayer) in physiological solution. After perfusion, the liver was excised and the cells were dispersed in Leibovitz medium. The cells were filtered and allowed to decant for 15 min. The cell pellet was washed twice with the same medium and cell viability was estimated by the trypan blue exclusion method. Preparations with less than 90% viability were discarded. The cells were resuspended in attachment medium [199:E-MEM 1:4 (Sigma), 1 g/l BSA, 5 mg/l insulin (Sigma), 26.2 mM HCO₃Na, 100 µg/ml streptomycin (Sigma), 100 UI/ml penicillin (Calbiochem), 1.2 µM dexamethasone (Sigma) and 10% fetal bovine serum (Gibco)], plated at a density of $7.2 \cdot 10^4$ cells/cm² on appropriate supports and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 5 h. After this period the medium was changed to post-attachment medium [199:E-MEM 1:4 (Sigma), 1 g/l BSA, 5 mg/l insulin (Sigma), 26.2 mM HCO₃Na, 100 µg/ml streptomycin (Sigma), 100 UI/ml penicillin (Calbiochem), 0.6 mM hydrocortisone (Sigma) and 10% fetal bovine serum (Gibco)]. Cells were maintained in this medium at 37 °C and 5% CO₂ for different periods of time depending on the experiment.

MTT assay

Hepatocytes were seeded in 96 well plates at a concentration of 20,000 cells per well in 100 µl of medium. Twenty four hours after plating, cells were treated with OA (99% pure, CIFGA Laboratories, Spain) or DTX-2 (97% pure, CIFGA Laboratories, Spain), and incubated for different periods of time as described in the Results section. MTT (Sigma) 5 mg/ml was added 4 h before the end of the incubation period, after which the plates were read in a Bio-Tek Synergy 4 plate reader, at wave lengths of 570 and 670 nm (reference).

Lactate dehydrogenase (LDH) release

Enzyme activity was determined spectrophotometrically in the culture medium of 15 and 30 nM OA or DTX-2 treated and control cells by measuring NADH oxidation. To 900 µl of reaction mix (50 mM phosphate buffer, 0.25 mM NADH and 0.75 mM pyruvate) at 30 °C, 100 µl of medium were added and absorbance variation was measured at 340 nm for 3 min.

Apoptosis detection

Apoptosis was determined measuring caspase-3 activity. For this, a commercial kit was used (EnzCheck casp-3 Assay Kit 1, Molecular Probes). In brief, after treatment, the cells were harvested and lysed following the kit instructions. Fifty µl of the cleared lysates for each sample was seeded in a 96 well plate. Then, the caspase-3 specific substrate in reaction buffer was added. After 10 min of incubation the caspase-3 activity was determined measuring fluorescence at an excitation wave length of 360 nm and an emission one of 460 nm with a microplate reader (Bio-Tek, FL600 microplate fluorescence reader).

Flow imaging cytometry

Primary hepatocytes treated for 24 h with vehicle, OA, DTX-2 and HGF were detached from the plates with Accutase (PAA) and washed twice with PBS. Cells were fixed with 70% ethanol for 30 min at 4 °C. Fixed cells were washed with PBS and resuspended in a solution of PBS with 100 µg/ml propidium iodide (Sigma) and 0.5 mg/ml RNase (Sigma). After 30 min of incubation in this solution, 5000 events were captured with an AMNIS ImageStream imaging flow cytometer and the analysis was performed with the IDEAS® 3.0 Cell Image Analysis Software.

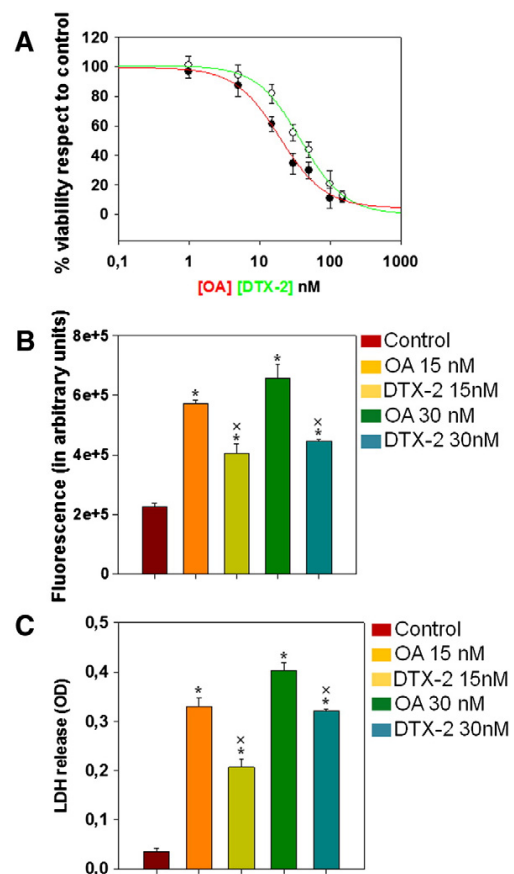


Fig. 1. Toxicity of OA and DTX-2 on primary rat hepatocyte cultures. Cells were treated with the toxins for 48 h. Toxicity was determined by the MTT reduction assay (A), caspase-3 activity (B) and LDH release to the medium (C). * significant differences with respect to control, × significant differences between OA and DTX-2 treated cells ($p < 0.01$, $n = 3$).

Confocal microscopy

To detect p53, primary hepatocytes were treated with HGF for 24 h. After this time, the medium was changed, the HGF was renewed and AO or DTX-2 was added. Cells were incubated in these conditions for another 24 h. The treated and control cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at 4 °C. Fixed cells were washed with PBS and blocked with PBS, 1% BSA and Triton X100 for 1 h. The slides were then incubated with an anti-p53 (PromoKine) 1:300 for 3 h. After washing with PBS, the secondary anti-body (Molecular Probes®) was added at a 1:500 concentration. Finally, cells were washed 3 times with PBS adding 1 μ M Hoechst 33258 in the last wash for nuclei counterstaining.

For tubulin detection, cells were grown on cover slips. After 24 h of culture, 15, 30 and 60 nM AO or DTX-2 was added, and hepatocytes were incubated under these conditions for 24 h. After these treatments, cells were fixed in methanol during 5 min at -20 °C. Fixed cells were washed in PBS and blocked with PBS, 1% BSA and 0.1% Triton X100 for 1 h. After blocking, cells were incubated with anti β -tubulin (Sigma) 1:500 for 2 h. The cover-slips were washed 3 times

with PBS and incubated with the secondary fluorescent anti-body (ZyMax), 1:1000, for 1 h. After this incubation cells were washed 3 times with PBS, including 1 μ M Hoechst 33258 in the last wash to stain the nuclei.

The stained cells were analyzed with a Nikon TE2000-3 confocal microscope. Photos were taken along the z axis of each field analyzed, to rule out the possibility that the differences observed between control and treated cells were due to a different focal plane. Representative photos of each treatment and controls are presented in this work.

Real time PCR

Primary hepatocyte cultures were treated with HGF or vehicle 24 h after plating to induce proliferation. After this incubation, the media and HGF were renewed, 30 μ M OA or DTX-2 was added, and the cells were incubated under these conditions for another 24 h. Total RNA was extracted with a RNeasy® Mini Kit (QIAGEN). After DNase treatment, reverse transcription was performed with RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas) following the manufacturer's instructions. The cDNA was analyzed for differential

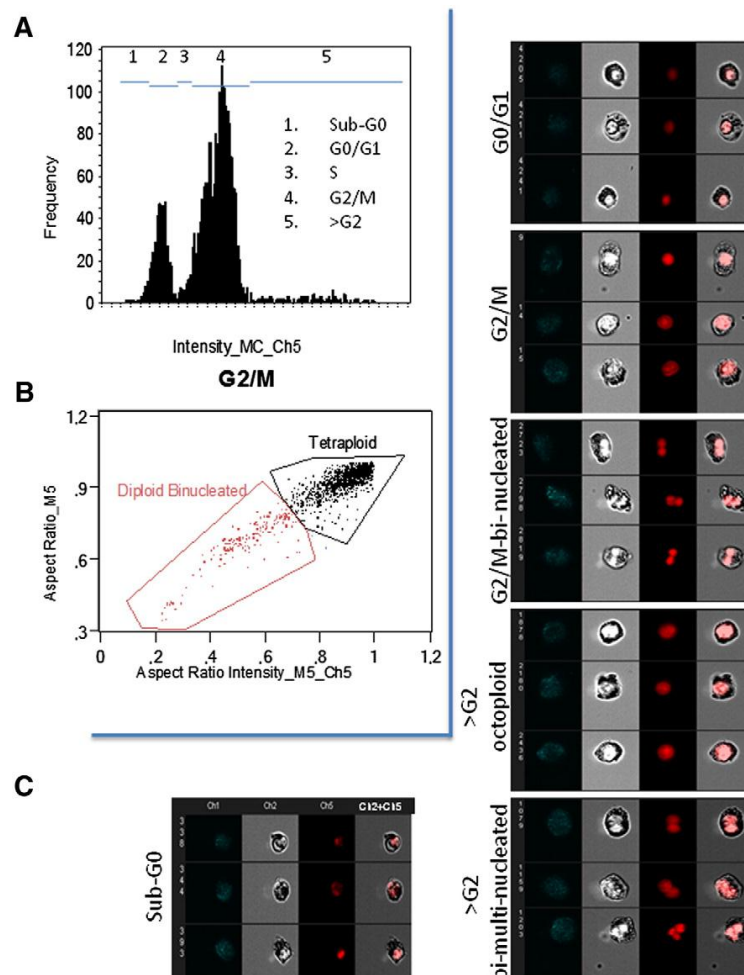


Fig. 2. Example of the analysis performed by imaging cytometry. After acquisition, typical cytometric histograms of the cell cycle were obtained (A), from the populations gated on this histograms bi-multinucleated cells were quantified in the G2/M and >G2 cell populations by plotting the nuclei aspect ratio vs the aspect ratio intensity which allowed to discriminate bi-nucleated (with an aspect ratio and an aspect ratio intensity lower than 1) from mono-nucleated cells (with an aspect ratio and an aspect ratio intensity of 1 or near 1) (B). (C) Images selected from the different populations analyzed. Ch1: side scatter, Ch2: bright field (forward scatter in flow cytometry), Ch5: propidium iodide stained nuclei.

expression of p53 using cyclophilin as housekeeper for normalization in an Applied Biosystems StepOne real time PCR system with a FastStart™ Universal SYBR Green Master kit (Roche).

Western blot

Primary hepatocytes treated with HGF, OA or DTX-2 for 24 h were lysed and the soluble protein fractions were run in 10% pre-cast acrylamide gels (Biorad). After electrophoresis the proteins were transferred to PVDF membranes (Millipore™) where p53 was detected using a rabbit anti-p53 antibody (PromoKine) diluted at 1:1000. An

anti-rabbit secondary antibody was used at 1:3000. After membrane stripping, a tubulin antibody was used to determine equal protein loading. Membrane blocking and antibody incubations were made with the SNAP i.d. system (Millipore™) following manufacturer instructions. Chemiluminescence was detected and analyzed with the VersaDoc™ system (BIORAD).

Statistical analysis

The results were analyzed using the software SIGMAPLOT©. One way ANOVA was employed for comparison of significant differences

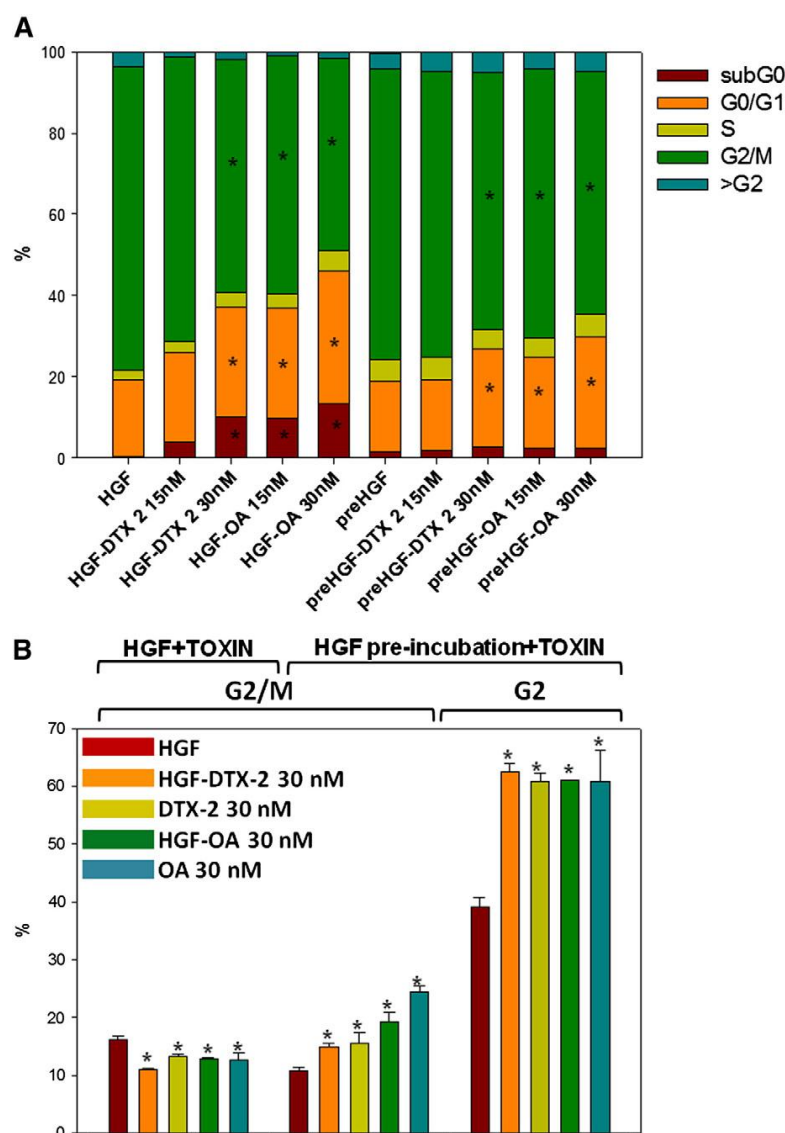


Fig. 3. (A) Cell cycle analysis of hepatocytes induced to proliferate with 20 ng/ml HGF and treated with 15 and 30 nM OA or DTX-2. In one case, cells were treated with the growth factor (HGF in the plot) and the toxins at the same time for 24 h. Alternatively, cells were pre-incubated with 20 ng/ml HGF (pre-HGF in the plot) for 24 h and then exposed to the toxins for another 24 h renewing the growth factor. (B) Determination of the bi-multi-nucleated cells in the G2/M and >G2 using imaging flow cytometric analysis. Cells in G2/M and in >G2 were separated into tetraploid or diploid bi-nucleated for cells in G2/M and in octoploid or bi-multi-nucleated for the >G2 population. * significant differences with respective control ($p < 0.05$, $n = 3$).

among groups. Comparisons between groups were made by the Holm–Sidak multiple range test. A $p < 0.05$ ($n \geq 3$) value was considered significant.

Results

When cultures of primary hepatocytes were exposed to OA or DTX-2 for 48 h, the MTT assay showed that DTX-2 is less toxic than OA (Fig. 1A). The IC_{50} for OA and DTX-2 were calculated to be 18.3 nM and 33.1 nM respectively. Caspase-3 activity was increased by both toxins, after 48 h of incubation, in hepatocytes treated with 15 and 30 nM OA or DTX-2 (Fig. 1B). Also, an important increase in the release of LDH to the medium was detected when the cells were treated with 15 and 30 nM OA or DTX-2 for 48 h (Fig. 1C). A lower increase in caspase-3 and LDH release was observed in DTX-2 treated cells when compared to OA treated cells.

Cell cycle analysis of hepatocytes treated for 24 h at the same time with 20 ng/ml HGF, 15 and 30 nM OA or DTX-2, showed a different population distribution in the cell cycle when compared to cells pre-incubated with growth factor for 24 h, and then exposed to the toxins at the same concentrations for another 24 h. In the first case, there was an increase in the G1/G0 cell population with a decrease in the G2/M population (Figs. 2 and 3A). A small difference in the relation between bi-nucleated and tetraploid cells in G2 was detected, being higher that of HGF treated cells when compared to HGF and toxin treated cells (Figs. 2 and 3B). The number of cells in the sub-G0 population was augmented in cultures treated with the toxins. The highest increase was for OA 30 nM. On the other hand, HGF pre-treated cells showed a lower increase in the G0/G1 cell population between treated and control cells when compared to the previous case (Fig. 3A). In these conditions a significant increase in the bi-multi-nucleated cell population in G2/M and $>G2$ was observed in the toxin treated cells (Fig. 3B). A marked increase in the sub-G0 population, as that observed in the cells treated at the same time with HGF and the toxins, was not evident in this occasion (Fig. 3A).

When hepatocyte cultures were exposed to 20 ng/ml HGF for a longer period (48 h) and then treated with 30 nM OA or DTX-2 for another 48 h, both toxins induced the appearance of multinucleated cells among those that survived the treatment (Fig. 4).

The expression of the p53 mRNA, determined by quantitative PCR, decreased in proliferating primary hepatocytes treated with 15 and 30 nM OA or DTX-2 for 18 h when compared to cells treated with the growth factor alone. The expression level in the toxin treated cells was similar to that observed in the control cells that were not induced to proliferate (Fig. 5A). Neither of the toxins affected the p53 gene expression in quiescent hepatocytes (results not shown). The same pattern as that observed for p53 mRNA was observed at the protein level, treating hepatocytes with HGF induced an increase in the protein level of p53 which was inhibited when HGF treated cells were exposed to OA or DTX-2 for 24 h (Fig. 5B and C). No difference in the p53 protein level was observed between the cells treated with OA and DTX-2. When p53 was studied by confocal microscopy, higher fluorescence intensity was observed in HGF treated cells when compared to control and OA or DTX-2 treated cells. No difference in the sub-cellular localization of p53 was observed in any case (Fig. 5D).

In order to determine if OA or DTX-2 affected the mitotic phase of proliferating hepatocytes, β -tubulin was analyzed by confocal microscopy. Cells were induced to proliferate with 20 ng/ml of HGF and treated with 15 and 30 nM OA or DTX-2 for 24 h. No differential effect was observed in the mitotic spindle formation between control and toxin treated cells (results not shown). Unexpectedly, cells treated with 30 nM OA or DTX-2 showed tubulin staining in the nuclei as well as a granulated staining pattern in the cytoplasm when compared to control cells. Counter staining was performed with Hoechst 33258 (Fig. 6). Nuclear tubulin was not present in the nuclei of toxin treated cells when analyzed after longer incubation periods (>48 h).

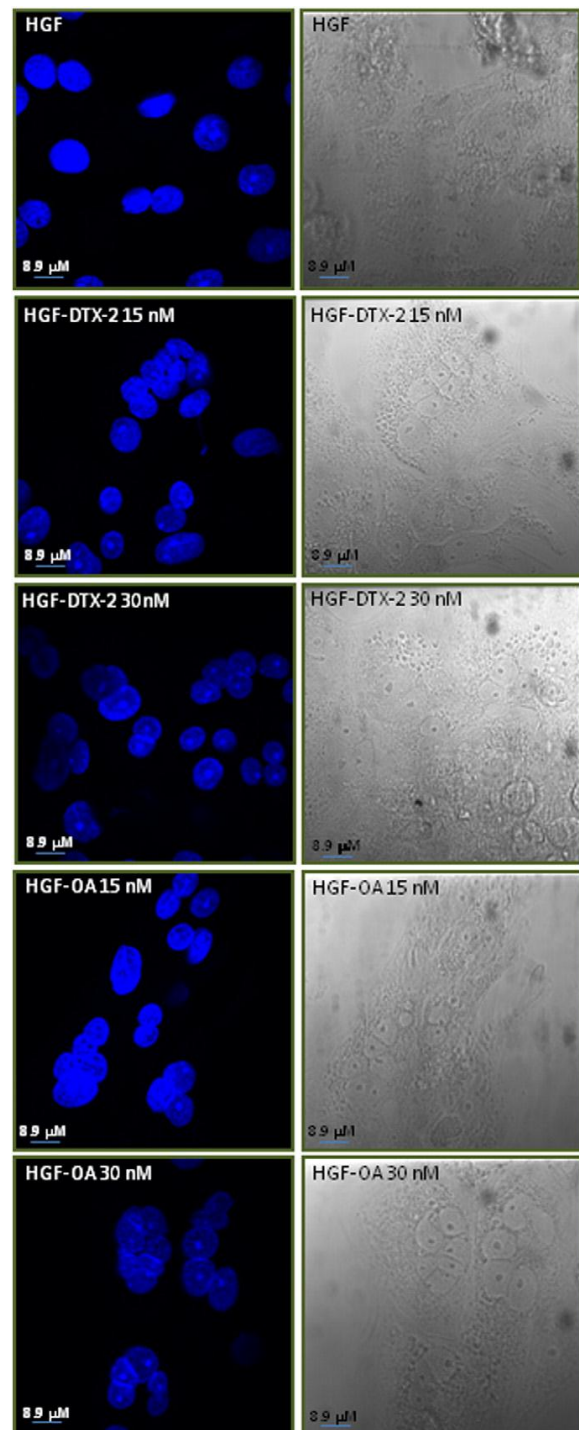


Fig. 4. Confocal images for long term incubation of hepatocytes in the presence of 20 ng/ml HGF and 30 nM OA or DTX-2. Cells were incubated with HGF for 48 h and then treated with the toxins for another 48 h renewing the growth factor. Bright field and nuclei stained with Hoechst 33258 are shown.

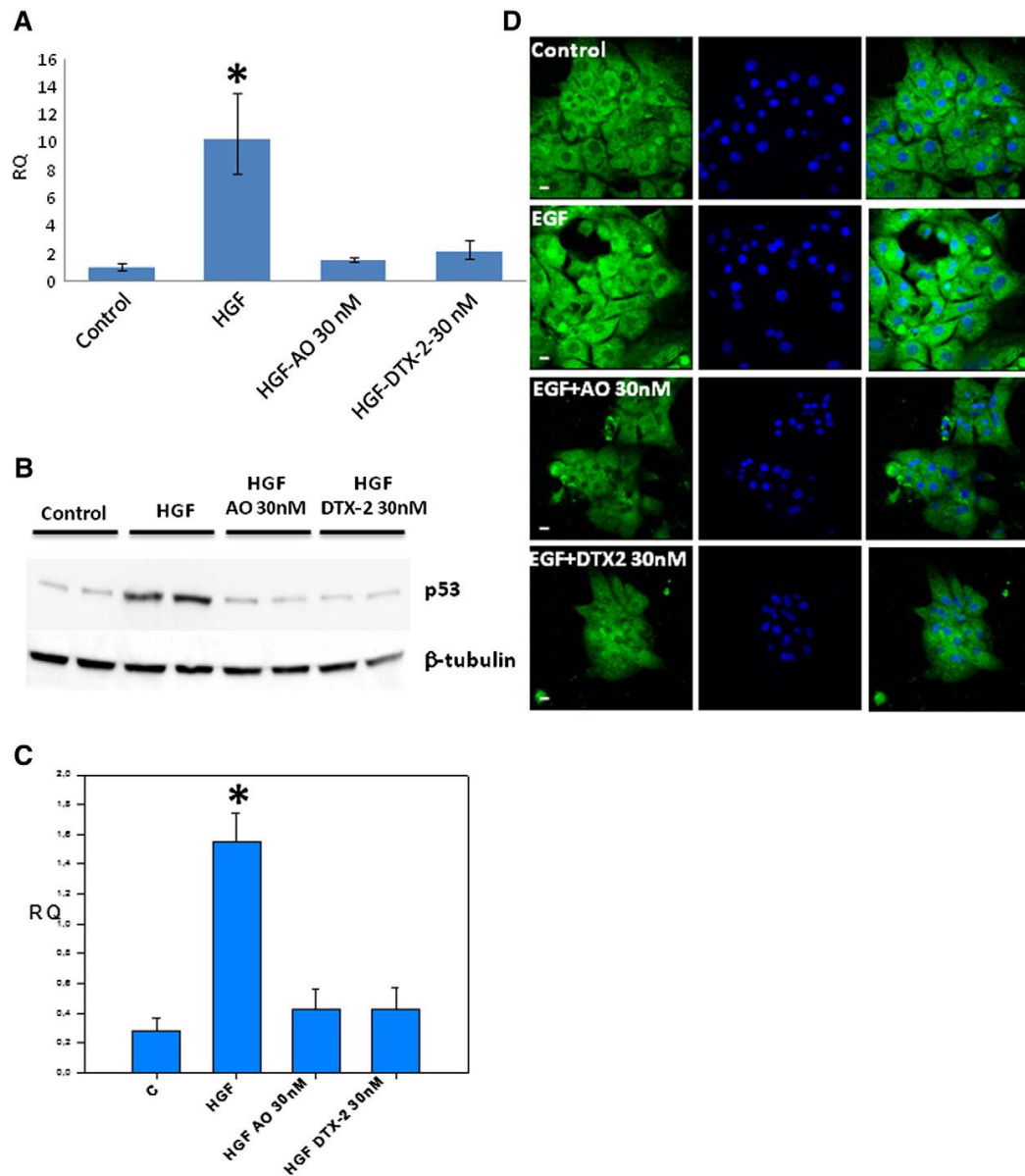


Fig. 5. (A) Relative quantification of p53 mRNA by qPCR in primary hepatocytes incubated with 20 ng/ml HGF and 30 nM OA or DTX-2 for 18 h. * significant differences with respect to control ($p < 0.01$, $n = 3$). (B) Determination of the p53 protein levels in primary hepatocytes treated with OA or DTX-2 30 nM for 24 h by western blot. Tubulin was also analyzed as an internal loading control. (C) Relative p53 protein levels normalized with tubulin. * significant difference with respect to control, HGF-OA or HGF-DTX-2 treated cells ($p < 0.01$, $n = 2$, two experiments). (D) Detection of p53 (green) and DNA (blue) by confocal microscopy in hepatocytes treated with HGF and 30 nM OA or DTX-2 for 24 h. Composite images are also shown.

Discussion

After 48 h of incubation with OA and DTX-2, these compounds exhibited a difference in potency similar to that observed in vivo after intra-peritoneal injection (Aune, et al., 2007), where the i.p. relative toxicity of DTX-2 is about 0.6 that of OA. Cell death was at least in part apoptotic as determined by the caspase-3 activity increment observed in the cell cultures exposed to OA and DTX-2. This is also supported by the increase in the sub-G0 cell population observed by flow cytometry in hepatocytes treated with the toxins. The occurrence of necrosis

cannot be ruled out, given that an important increase in the release of LDH to the medium was also detected in cells exposed to both toxins.

Different sub-populations of hepatocytes are involved in proliferation elicited in response to various types of liver injury in rodents, as revealed by several studies (Styles, et al., 1988). To elucidate which sub-population of hepatocytes is undergoing cell proliferation, cytometry coupled with fluorescence-activated cell sorting and conventional microscopy are the most accurate methods. This involves labeling the cells with propidium iodide and deoxy-bromouridine, analyzing and sorting simultaneously using two-fluorescence flow cytometry. This

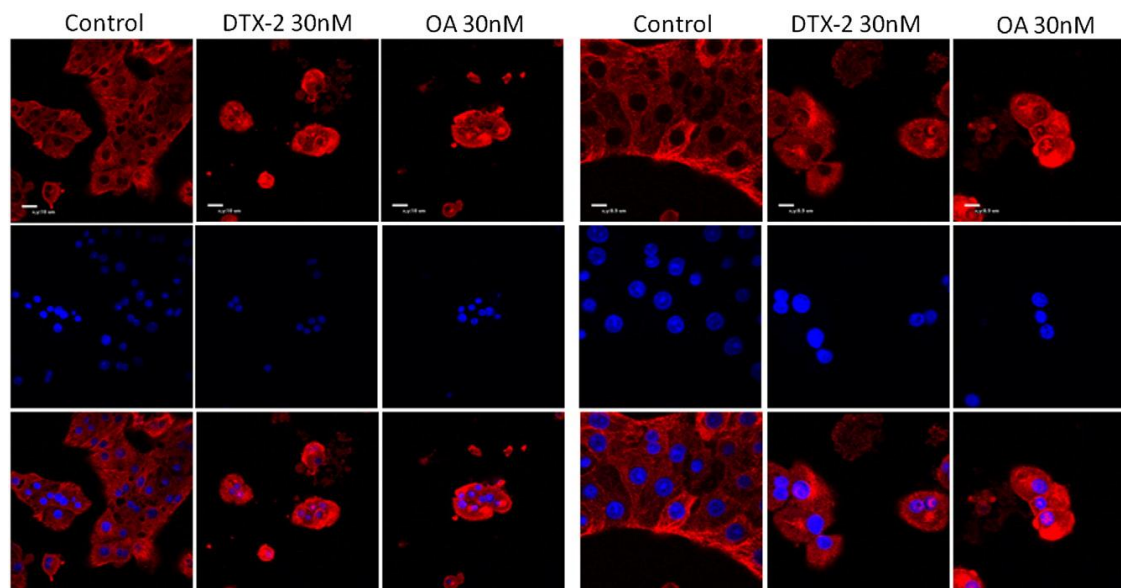


Fig. 6. Confocal images of hepatocytes treated with 30 nM OA for 24 h. Cell's β -tubulin (red) and DNA (blue) were stained. Images were captured at two different magnifications.

method allows to determine the ploidy of the cells and the incidence of cells in S phase in different ploidy groups (Styles et al., 1987, 1988). The image flow cytometric method described in this work allows to accomplish this task much more easily, given that the tetraploid and diploid bi-nucleated cell population at G2/M, and the different populations (octoploid and bi-multinucleated) in higher ploidy cells, can be determined by the analysis of the cytometric data itself without any further cell treatment or separation. Also, proliferating cells could be detected if deoxy-bromouridine is added during hepatocyte treatment. By flow cytometry, the precision of ploidy distribution determination of isolated nuclei depends on how well the flow cytometric equipment can correct for aggregates (Saeter and Seglen, 1990; Schwarze, et al., 1984). This problem is circumvented by the technique described in this work, given that single images of each event are collected and cell aggregates can be excluded during analysis or acquisition.

The cytometric analysis showed that OA and DTX-2 arrest the cell cycle of proliferating primary rat hepatocytes at G1. These results are in accordance with previous data indicating inhibition of DNA synthesis and cell cycle arrest at late G1 by OA in primary rat hepatocytes at sub-toxic concentrations (Mellgren et al., 1993, 1995). After mitogenic stimulation, the number of bi-nucleated cells increases in primary hepatocyte cultures (Eckl and Bresgen, 2003), so the increase in the bi-nucleated cell population in hepatocytes pre-incubated with HGF and then exposed to OA or DTX-2 can result from the inhibition of the cell cycle in G1 of diploid bi-nucleated cells. These cells, after mitogenic stimulation, progress through a new cell cycle and subsequently divide into two mono-nuclear 4n cells (Guidotti, et al., 2003). The inhibition at G1 by OA and DTX-2 explains the increase of the bi-nucleated cell population in proliferating hepatocytes that we report in this work. When compared to hepatic transformed cells, cell cycle inhibition at G1, has also been observed in human hepatocellular carcinoma derived HepG2 cells. On the other hand, in vitro transformed rat hepatocytes showed G2/M inhibition by OA and DTX-2 (Rubiolo, et al., 2011), implying that these toxins can alter the cell cycle progression in a different manner depending on the cell type. All hepatocellular ploidy classes show proliferative activity in culture, therefore, the higher ploidy observed in hepatocytes treated with growth factor and OA or DTX-2 for 96 h, could be a result of the proliferation of octoploid and bi-nucleated

tetraploid cells whose cell cycle would be arrested by OA and DTX-2, generating cells with a high number of nuclei. Cells with up to 16 nuclei were observed.

The negative regulation of p53 mRNA that results in a lower p53 protein level in proliferating toxin treated cells, could be responsible at least in part of the cell growth inhibition produced by OA and DTX-2. Supportive of this notion is the fact that anti-sense oligonucleotides against p53 mRNA as well as inhibitors of this protein attenuate DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures (Inoue, et al., 2002) implying that the expression of this protein is fundamental for normal hepatocyte proliferation. Also, because activation of the p53–p21^{Cip1} pathway is involved in the S-phase entry in primary rat hepatocytes (Wierod, et al., 2008), down regulation of p53 would inhibit the cell cycle at G1 which is the effect observed in proliferating hepatocytes after treatment with OA or DTX-2 in this work. After treatment for 24 h with HGF, OA or DTX-2, no change in the sub-cellular localization of p53 was observed. The protein was detected mainly in the cytoplasm, but nuclei staining was also observed. The anti-body used in this work detects total p53, so further studies are necessary to determine if particular phosphorylated or acetylated forms of p53 are found in the nuclei of cells treated with HGF or HGF plus OA or DTX-2, given that p53 suffers an important post-translational regulation by phosphorylation and acetylation (Brooks and Gu, 2003).

An unexpected finding was the detection of β -tubulin in the nuclei of OA and DTX-2 treated cells. Several reports inform the presence of tubulin isoforms β I, α and β II in the nucleus of cultured animal cells (Goo, et al., 2003; Menko and Tan, 1980; Walss-Bass, et al., 2002; Xu and Luduena, 2002; Yanagida, et al., 2004). In vitro, nuclear tubulin is thought to associate with chromatin and interact with histones (Menko and Tan, 1980; Mithieux, et al., 1984). When soluble tubulin subunits accumulate in the nucleus, the cell cycle progression is inhibited. Nuclear accumulation of β -tubulin does not occur under normal circumstances suggesting that this is a pathophysiological process and may represent a defense mechanism against stress or malignant transformation (Akoumianaki, et al., 2009). In the case of primary hepatocytes exposed to 30 nM OA or DTX-2, nuclear accumulation of β -tubulin could be a consequence of the chemical stress induced by these compounds. That this observation is a consequence of the culture conditions can't be ruled out. Further

studies are needed to determine if nuclear tubulin is involved in the inhibition of the cell cycle in primary hepatocytes.

Conclusion

This study establishes that DTX-2 is approximately 40% less toxic than OA in cultures of primary hepatocytes. Both toxins inhibit the cell cycle in G0/G1, an effect that is also observed in bi-nucleated cells. p53 and tubulin could be involved in cell cycle inhibition.

Funding support

This work was funded with the following grants: From Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain: AGL2007-60946/ALI, SAF2009-12581 (subprograma NEF), AGL2009-13581-CO2-01, TRA2009-0189, AGL2010-17875. From Xunta de Galicia, Spain: GRC 2010/10, and PGIDT07CSA012261PR, PGDIT 07MMA006261PR, PGDIT (INCITE) 09MMA003261PR, 2009/XA044, 2009/053 (Consell. Educación), 2008/CP389 (EPITOX, Consell. Innovación e Industria, programa IN-CI.TE.). From EU VIth Frame Program: 211326-CP (CONFIDENCE), 265896 BAMMBO, 265409 μ AQUA, and 262649 BEADS. From the Atlantic Area Programme (Interreg IVB Trans-national): 2008-1/003 (Atlantox) and 2009-1/117 Pharamatlantic.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Akoumianaki T, Kardassis D, Polioudaki H, Georgatos SD, Theodoropoulos PA. Nucleocytoplasmic shuttling of soluble tubulin in mammalian cells. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 8):1111–8.
- Alfert M, Geschwind II. The development of polysomaty in rat liver. *Exp Cell Res* 1958;15(1):230–2.
- Aune T, Larsen S, Aasen JA, Rehmann N, Satake M, Hess P. Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice. *Toxicol* 2007;49(1):1–7.
- Blanco J, Fernández M, Marino J, Reguera B, Míguez A, Maneiro J, et al. From *Dinophysis* spp. toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: Lassus PAG, Erard E, Gentien P, Marcaillou C, editors. Harmful marine algal blooms. Paris: Lavoisier Science Publishers; 1995. p. 777–82.
- Bohm N, Noltemeyer N. Development of binuclearity and DNA-polyploidization in the growing mouse liver. *Histochemistry* 1981;72(1):55–61.
- Brodsky WY, Uryvaeva IV. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *Int Rev Cytol* 1977;50:275–332.
- Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(2):164–71.
- Carmody EP, James KJ, Kelly SS. Dinophysistoxin-2: the predominant diarrhetic shellfish toxin in Ireland. *Toxicol* 1996;34(3):351–9.
- Dominguez HJ, Paz B, Daranas AH, Norte M, Franco JM, Fernandez JJ. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicol* 2010;56(2):191–217.
- Eckl PM. Occurrence and possible consequences of multipolar mitoses in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 1993;154(3):601–7.
- Eckl P, Bregesen N. The cultured primary hepatocyte and its application in toxicology. *J Appl Biomed* 2003;1:117–26.
- Epstein CJ. Cell size, nuclear content, and the development of polyploidy in the mammalian liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967;57(2):327–34.
- Espina B, Louzao MC, Cagide E, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, et al. The methyl ester of okadaic acid is more potent than okadaic acid in disrupting the actin cytoskeleton and metabolism of primary cultured hepatocytes. *Br J Pharmacol* 2010;159(2):337–44.
- Goo YH, Sohn YC, Kim DH, Kim SW, Kang MJ, Jung DJ, et al. Activating signal co-integrator 2 belongs to a novel steady-state complex that contains a subset of trithorax group proteins. *Mol Cell Biol* 2003;23(1):140–9.
- Guidotti JE, Bregerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278(21):19095–101.
- Inoue Y, Tomiya T, Yanase M, Arai M, Ikeda H, Tejima K, et al. p53 may positively regulate hepatocyte proliferation in rats. *Hepatology* 2002;36(2):336–44.
- Le Hegarat L, Jacquin AG, Bazin E, Fessard V. Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid, in human Caco-2 cells and in mice gut cells. *Environ Toxicol* 2006;21(1):55–64.
- Lee JS, Igarashi T, Fraga S, Dahl E, Hovgaard P, Yasumoto T. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J Appl Phycol* 1989;1(2):147–52.
- Mellgren G, Vintermyr OK, Boe R, Doskeland SO. Hepatocyte DNA replication is abolished by inhibitors selecting protein phosphatase 2A rather than phosphatase 1. *Exp Cell Res* 1993;205(2):293–301.
- Mellgren G, Vintermyr OK, Doskeland SO. Okadaic acid, cAMP, and selected nutrients inhibit hepatocyte proliferation at different stages in G1: modulation of the cAMP effect by phosphatase inhibitors and nutrients. *J Cell Physiol* 1995;163(2):232–40.
- Menko AS, Tan KB. Nuclear tubulin of tissue culture cells. *Biochim Biophys Acta* 1980;629(2):359–70.
- Mithieux G, Alquier C, Roux B, Rousset B. Interaction of tubulin with chromatin proteins. H1 and core histones. *J Biol Chem* 1984;259(24):15523–31.
- Perez-Gomez A, Garcia-Rodriguez A, James KJ, Ferrero-Gutierrez A, Novelli A, Fernandez-Sanchez MT. The marine toxin dinophysistoxin-2 induces differential apoptotic death of rat cerebellar neurons and astrocytes. *Toxicol Sci* 2004;80(1):74–82.
- Quilliam MA, Gilgan MW, Pleasance S, deFreitas ASW, Douglas D, Fritz L, et al. Confirmation of an incident of diarrhetic shellfish poisoning in eastern Canada. In: Smayda T, Shimizu Y, editors. Toxic phytoplankton blooms in the sea. Amsterdam: Elsevier; 1993. p. 547–52.
- Rubiolo JA, Lopez-Alonso H, Vega FV, Vieytes MR, Botana LM. Okadaic acid and dinophysistoxin 2 have differential toxicological effects in hepatic cell lines inducing cell cycle arrest, at G0/G1 or G2/M with aberrant mitosis depending on the cell line. *Arch Toxicol* 2011;85:1541–50.
- Saeter G, Seglen PO. Cell biology of hepatocarcinogenesis. *Crit Rev Oncog* 1990;1(4):437–66.
- Schwarze PE, Pettersen EO, Shoaib MC, Seglen PO. Emergence of a population of small, diploid hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1984;5(10):1267–75.
- Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29–83.
- Severin E, Willers R, Bettecken T. Flow cytometric analysis of mouse hepatocyte ploidy. II. The development of polyploidy pattern in four mice strains with different life spans. *Cell Tissue Res* 1984;238(3):649–52.
- Styles JA, Kelly M, Elcombe CR. A cytological comparison between regeneration, hyperplasia and early neoplasia in the rat liver. *Carcinogenesis* 1987;8(3):391–9.
- Styles JA, Kelly M, Pritchard NR, Elcombe CR. A species comparison of acute hyperplasia induced by the peroxisome proliferator methylclofenapate: involvement of the binucleated hepatocyte. *Carcinogenesis* 1988;9(9):1647–55.
- Suganuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, et al. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(6):1768–71.
- Suganuma M, Tatematsu M, Yatsunami J, Yoshizawa S, Okabe S, Uemura D, et al. An alternative theory of tissue specificity by tumor promotion of okadaic acid in glandular stomach of SD rats. *Carcinogenesis* 1992;13(10):1841–5.
- Thompson NL, Mead JE, Braun L, Goyette M, Shank PR, Fausto N. Sequential protooncogene expression during rat liver regeneration. *Cancer Res* 1986;46(6):3111–7.
- Vale P, Sampayo MA. Dinophysistoxin-2: a rare diarrhetic toxin associated with *Dinophysis acuta*. *Toxicol* 2000;38(11):1599–606.
- Walls-Bass C, Xu K, David S, Fellous A, Luduena RF. Occurrence of nuclear beta(II)-tubulin in cultured cells. *Cell Tissue Res* 2002;308(2):215–23.
- Wheatley DN. Binucleation in mammalian liver. Studies on the control of cytokinesis in vivo. *Exp Cell Res* 1972;74(2):455–65.
- Wierod L, Rosseland CM, Lindeman B, Oksvold MP, Grosvik H, Skarpen E, et al. Activation of the p53–p21(Cip1) pathway is required for CDK2 activation and S-phase entry in primary rat hepatocytes. *Oncogene* 2008;27(19):2763–71.
- Xu K, Luduena RF. Characterization of nuclear beta-tubulin in tumor cells: a possible novel target for taxol. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002;53(1):39–52.
- Yanagida M, Hayano T, Yamauchi Y, Shinkawa T, Natsume T, Isebe T, et al. Human fibrillarin forms a sub-complex with splicing factor 2-associated p32, protein arginine methyltransferases, and tubulins alpha 3 and beta 1 that is independent of its association with preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem* 2004;279(3):1607–14.
- Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Japan and chemical properties of the toxin. In: Taylor D, Seliger H, editors. Toxic dinoflagellate blooms. Amsterdam: Elsevier; 1979. p. 495–502.
- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Matsumoto GK, Clardy J. Diarrhetic shellfish poisoning. In: Ragelis EP, editor. Seafood toxins. Washington, DC: AOAC International; 1984. p. 214–7.
- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto GK, Clardy J. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 1985;41:1019–25.

3.2-Estudio de la CYN sobre H.P. de rata.

3.2.1-Protein Synthesis Inhibition and Oxidative Stress Induced by Cylindrospermopsin Elicit Apoptosis in Primary Rat Hepatocytes.

RESUMEN:

La presencia de organismos productores de cianotoxinas nocivas para el ser humano y los animales en diversas regiones del planeta va en aumento con el paso del tiempo. La cilindrospermopsina (CYN) hoy en día se reconoce como una cianotoxina de agua dulce ampliamente distribuida. Se ha demostrado que esta toxina inhibe la síntesis proteica, así como la síntesis de glutatión. Dado que el hígado parece ser el principal órgano afectado por esta toxina, nosotros empleamos cultivos de H.P. de rata para estudiar el efecto que esta toxina (dosis de rango nanomolar) tiene sobre el tipo de muerte celular. También fue objeto de estudio la probable participación de las especies reactivas de oxígeno en la muerte celular inducida por esta toxina, la relación entre la inhibición de la síntesis proteica y la citotoxicidad, y la regulación de la posible respuesta antioxidante por parte de la célula. En este sentido observamos como la CYN indujo apoptosis en este tipo de células. A las concentraciones empleadas en este trabajo, la inhibición de la síntesis proteica y el estrés oxidativo están involucrados en la muerte celular por causa de la toxina. Así mismo, se observó una activación de la respuesta antioxidante celular desde un punto de vista tanto transcripcional como translacional.

Protein Synthesis Inhibition and Oxidative Stress Induced by Cyindrospermopsin Elicit Apoptosis in Primary Rat Hepatocytes

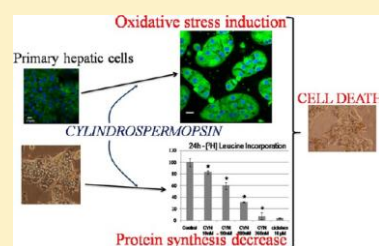
Henar López-Alonso,[†] Juan Andrés Rubiolo,^{†,‡} Félix Vega,[‡] Mercedes R. Vieytes,[‡] and Luis M. Botana^{*,†}

[†]Departamento de Farmacología, Fac. Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

[‡]Departamento de Fisiología, Fac. Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: The increasing presence of cyanotoxin producers in several regions of the world is hazardous for humans and animals. Cyindrospermopsin (CYN) is nowadays recognized as a widely distributed freshwater cyanobacterial toxin. This toxin has been shown to induce protein synthesis inhibition as well as inhibition of glutathione synthesis. Given that the liver seems to be the main target of cyindrospermopsin, in this work we used cultures of primary rat hepatocytes to study the type of cell death induced by CYN nanomolar concentrations. The involvement of reactive oxygen species in toxin induced cell death, the relationship between protein synthesis inhibition and toxicity, and the cell endogenous antioxidant response regulation were studied. We show that cyindrospermopsin induces apoptosis in primary rat hepatocytes. At the concentrations used in this work, protein synthesis inhibition and oxidative stress were involved in the cytotoxic effect elicited by the toxin. Finally, activation of the cell antioxidant response was observed at the transcriptional and translational levels.



INTRODUCTION

Cyindrospermopsin (CYN) is a widespread freshwater cyanobacterial toxin. Eutrophication and adaptation of CYN producing cyanobacteria such as *Cyindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon flos-aquae* have allowed them to inhabit new suitable habitats.¹ Swimming in contaminated pools, drinking inadequately treated water, and the consumption of toxin-laden foods are some of the possible entry routes to the organism.¹ The increasing presence of cyanotoxin producers in several regions of the world is hazardous for humans and animals. Evidence of this are the several cases of intoxications by CYN that have been reported in humans^{2–5} and animals^{6,7} after water consumption.

CYN is a stable, water-soluble toxin of 415 Da first isolated from *Cyindrospermopsis raciborskii*⁸ and *Umezakia natans*⁹ in the nineties. Later, it was shown to be produced by several other freshwater cyanobacterial species.¹⁰ Despite this, *Cyindrospermopsis raciborskii* is still recognized as the main producer of this toxin.¹¹ It is a tricyclic alkaloid containing a guanidinium group combined and linked to hydroxymethyluracil.^{8,12} The molecule contains several potential reactive sites, and there is *in vivo* evidence that it may form DNA adducts.¹³ CYN is potentially carcinogenic as at noncytotoxic concentrations it has been shown to induce cell transformation and genotoxic effects.^{10,14–18} Also, the uracil group was hypothesized to interfere with DNA synthesis, acting as a carcinogen in several mouse tissues.¹⁹

Hepatotoxicity has been reported as the main *in vivo* effect of CYN.¹³ In addition to this, other organs such as the kidney,^{5,20} lungs, adrenal glands, the intestinal tract,⁵ thymus, heart,²¹ bone marrow, and colon¹⁴ have been identified as potential targets of this cyanotoxin.

CYN's effects on acute toxicity have been attributed to the cytochrome P450 (CYP450) generated metabolites,^{16,22} while its long-term toxicity is presumed to be a consequence of protein synthesis inhibition.^{13,23} Besides inhibition of protein synthesis,^{21,24} the toxin also inhibits glutathione synthesis in primary mice and rat hepatocytes.^{16,22} However, no such effect was observed in the human cell line Caco-2, in which glutathione levels were not affected or even increased, depending on the toxin doses employed.²⁵

Since liver has been shown to be the main target for CYN,² primary cultures of rat²⁶ and mouse^{16,23} hepatocytes have been used in various studies to investigate its mechanism of action. In many of these studies, high doses of the toxin were used with short exposure times. Because lower concentrations of the toxin are more probably present in the case of intoxication and in order to determine if other factors besides protein synthesis inhibition are involved in CYN cytotoxicity, in this work we used primary rat hepatocytes treated with lower toxin concentrations than those previously reported. We determined the type of cell death induced and the effect of the toxin on protein synthesis in relation to viability. Also, the involvement of oxidative stress in cellular death was investigated.

MATERIALS AND METHODS

Toxin. Cyindrospermopsin (Enzo Live Science), isolated from *Cyindrospermopsis raciborskii*, was $\geq 95\%$ pure, and it was dissolved in water. A 2.4 mM stock solution was prepared and diluted as needed depending on the assays.

Received: August 2, 2012

Published: December 27, 2012

Isolation and Culture of Primary Rat Hepatocytes. All animal procedures were conducted according to the principles approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad de Santiago de Compostela. Primary rat hepatocytes (P.H.) were obtained from 200 to 300 g Sprague–Dawley male rats fed ad libitum. The Seglen perfusion method²⁷ was followed with modifications. Anesthesia was induced with isoflurane 5%, and it was maintained by an intraperitoneal injection of a Ketamine/Xilacine mix (22%:20% v/v, Imalgene1000 100 mg/mL, Merial; Xilagesic 2%, Calier) dissolved in physiological solution. After perfusion, the liver was excised and the cells dispersed in Leibovitz medium (Sigma). The cells were filtered through a sterile 200 μ m nylon mesh and allowed to decant for 15 min. After this, they were washed twice with Leibovitz medium, and cell viability was estimated by the trypan blue exclusion method. Preparations with less than 90% viability were discarded. After resuspension in attachment medium [199: E-MEM 1:4 (Sigma), 1 g/L BSA, 5 mg/L insulin (Sigma), 26.2 mM HCO₃Na, 100 μ g/mL streptomycin (Sigma), 100 UI/mL penicillin (Calbiochem), 1.2 μ M dexametasone (Sigma), and 10% fetal bovine serum (Gibco)], hepatocytes were plated at a density of 7.2×10^4 cells/cm² on appropriate supports and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 5 h. After this period, the medium was replaced by postattachment medium [199: E-MEM 1: 4 (Sigma), 1 g/L BSA, 5 mg/L insulin (Sigma), 26.2 mM HCO₃Na, 100 μ g/mL streptomycin (Sigma), 100 UI/mL penicillin (Calbiochem), 0.6 mM hydrocortisone (Sigma), and 10% fetal bovine serum (Gibco)]. Cells were maintained in this medium at 37 °C and 5% CO₂ for different time periods, depending on the experiment.

Cell Viability Determination. The Alamar Blue (Invitrogen) method was used following the manufacturer's instructions. Cells were seeded in 96-well plates at a concentration of 20000 cells per well. Twenty-four hours later, CYN at different concentrations was added, and viability was determined up to 48 h. Alamar Blue was added 12 h after toxin treatment. Fluorescence was measured until 48 h of toxin exposure elapsed, in a Bio-Tek Synergy 4 Microplate reader, with an excitation wavelength of 560 nm and an emission wavelength of 590 nm.

Caspase-3 Determination. Apoptosis was determined measuring caspase-3 activity with the commercial kit EnzCheck casp-3 Assay Kit 1 (Molecular Probes), following the manufacturer's instructions. In brief, after treatment, the cells were harvested and lysed, and 50 μ L of the cleared lysates from each sample was seeded in a 96-well plate. Then, the caspase-3 specific substrate, (7-amino-4-methylcoumarin-derived substrate Z-DEVD-AMC) in reaction buffer was added. After 30 min of incubation, caspase-3 activity was determined fluorometrically with a microplate reader (Bio-Tek, FL600 microplate fluorescence reader). Each condition was assayed in triplicate, and three independent experiments were performed.

Flow Imaging Cytometry. Primary hepatocytes treated with the vehicle, 180 nM, or 360 nM CYN for 24 and 48 h were trypsinized and washed twice with PBS. Cells were fixed with 70% ethanol for 30 min at -20 °C. Fixed cells were washed with PBS and resuspended in a solution of PBS containing 100 μ g/mL propidium iodide (P.I.) (Sigma) and 0.5 mg/mL RNase (Sigma). After 30 min of incubation in this solution, 5000 events, for each sample, were captured with an AMNIS ImageStream Imaging Flow Cytometer. Aggregates were eliminated during acquisition with the aid of the cytometer software (Inspire) and any cell doublet that still appeared after acquisition was eliminated with the data analysis software (Ideas3.0).

Lactate Dehydrogenase (LDH) Release. Enzyme activity was determined spectrophotometrically in the culture medium of the control, 180 and 360 nM CYN treated cells, measuring NADH oxidation. To 900 μ L of the reaction mix (50 mM phosphate buffer, 0.25 mM NADH, and 0.75 mM pyruvate) at 30 °C, 100 μ L of culture medium was added, and absorbance variation was measured at 340 nm for 3 min. The results are presented as the percentage of enzyme released to the medium in toxin treated cells with respect to control cells.

Annexin V Staining. FITC-conjugated Annexin V staining was determined by confocal microscopy and by spectrofluorimetry. Cells were seeded on coverslips for confocal microscopy or on 48-well plates for spectrofluorimetry and treated with 90, 180, 360 nM CYN for 6, 24, and 48 h. When the treatment periods elapsed, the cells were

washed with PBS, and Annexin V (CELL LAB ApoScreen) dissolved in binding buffer, as indicated by the manufacturer, was added. To rule out the possibility of necrosis, 5 μ g/mL propidium iodide was added, during Annexin V staining. After a 15 min incubation period, Annexin V and P.I. were removed, and cells were analyzed. A Nikon TE2000-3 was employed for confocal microscopy analysis. Fluorimetric analysis was performed with a Bio-Tek, FL600 microplate fluorescence reader.

Spectrofluorimetric Determination of Reactive Oxygen Species (ROS). ROS were determined measuring dichlorofluorescein oxidation fluorimetrically. Control and CYN treated cells were supplemented with 20 μ M dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma) 30 min before analysis. When the incubation ended, cells were washed 3 times with PBS. Finally, PBS was added, and fluorescence was measured at an excitation wavelength of 495 nm and an emission wavelength of 530 nm with a microplate reader (Bio-Tek FL600 microplate fluorescence reader). The multiple reading per well mode was used to get a more accurate fluorescence determination for each treatment. The results presented in this work are the means of the measurements of each well with their respective standard deviation for a representative experiment.

Confocal Microscopy. Primary hepatocytes, seeded on coverslips, were treated with 180 or 360 nM CYN for 24 h. After treatment, cells were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde (PFA) for 15 min at 4 °C. Fixed cells were washed 3 times with PBS, blocked with PBS supplemented with 1% BSA (w/v) for 1 h, and permeabilized with 0.1% (v/v) Triton X100 dissolved in PBS for 5 min. Permeabilized samples were incubated with the primary antibody for Nr2f2 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) at a concentration of 1:500, diluted in PBS and 2% BSA for 3 h. After washing 3 times with PBS, the cells were incubated with the CY3 labeled secondary antibody, diluted 1:500 for 1 h. After staining, the samples were washed 3 times with PBS, adding 1 μ M Hoechst 33258 in the last wash for nuclei counterstaining.

To assay oxidative stress by this technique, cells were incubated with CYN for 24 h. Thirty minutes before the treatment period elapsed, 20 μ M DCF-DA was added to the culture medium. The coverslips were washed 3 times with PBS and fixed with 4% PFA for 15 min at 4 °C. After fixation, coverslips were washed three times with PBS, and in the last one, 1 μ M Hoechst 33258 was added for nuclei counterstaining.

For all the determinations described in this section, after mounting the coverslips, the stained cells were analyzed with a Nikon TE2000-3 confocal microscope. Representative photos for each treatment and controls are presented in this work.

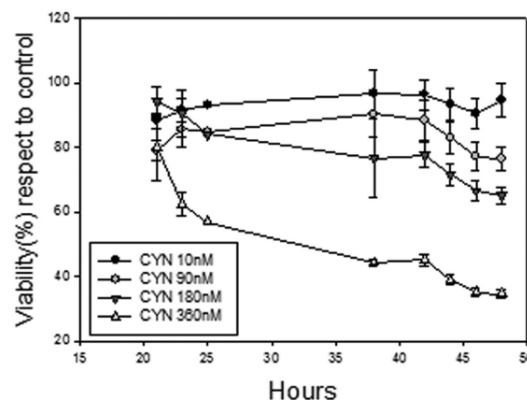


Figure 1. Decrease in cell viability of CYN treated primary rat hepatocyte cultures. Cells were treated with the toxin up to 48 h. Cell viability was determined by the Alamar-Blue assay ($n = 4$, $p < 0.01$). Differences between the 10 nM CYN treatment and control were not significant. Differences of the 360 nM CYN (at all times), 90 and 180 nM CYN (from 24 h of incubation) treatments were significant compared to controls.

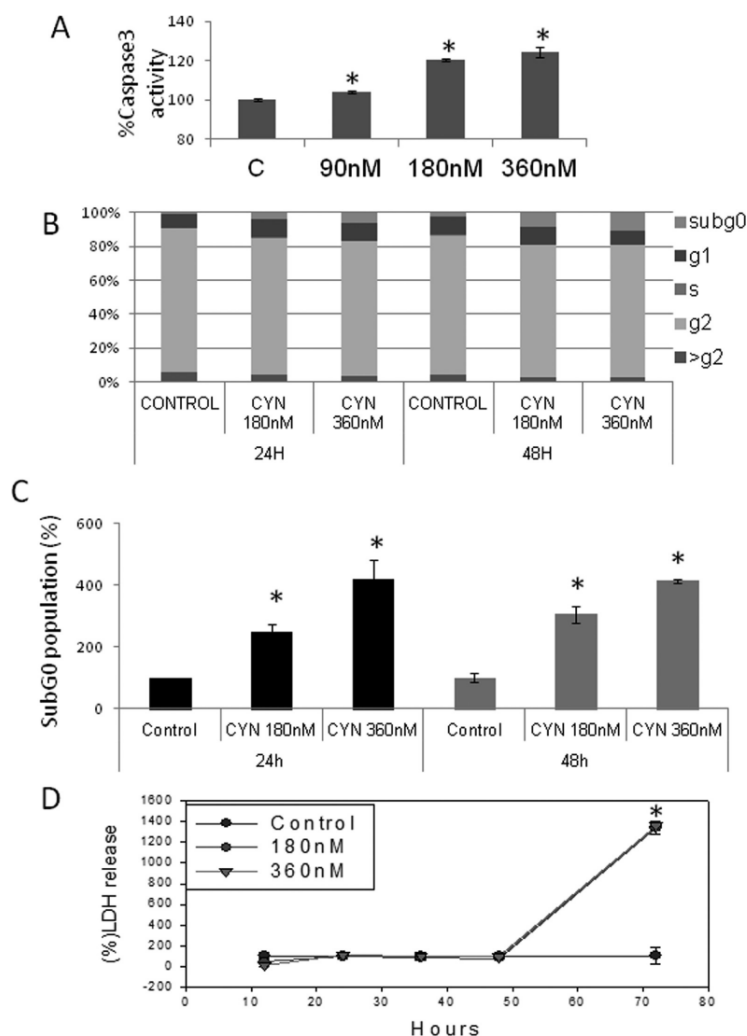


Figure 2. (A) Caspase-3 activity after 48 h in CYN treated and control cells. (B) Flow cytometric analysis of the cell cycle of CYN treated and control cells. (C) Effect of CYN in the SubG0 population as determined by flow cytometry. (D) LDH released to the medium at 24, 48, and 72 h in primary hepatocytes exposed to CYN. *, Significant differences with respect to the control ($n = 3$, $p < 0.01$).

SDS-PAGE and Western Blot. Cyindrospermopsin treated and control hepatocytes were suspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% Triton), containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma), and sonicated three times at 30–50 kHz for 10 s in an ice bath. Protein concentration in each lysate was determined by the Bradford assay.²⁸ Fifteen micrograms of total protein was mixed with loading buffer, loaded in 10% acrylamide precast gels (BIO-RAD), and resolved at 100 V for 90 min. After electrophoresis, the proteins were transferred to PVDF membranes (Millipore) at 100 V for 1 h and 20 min. The membranes were blocked with 3% (w/v) milk dissolved in PBS for 1 h, and incubated with the primary antibodies for 4 h at R.T. Primary antibody dilutions were anti-Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1:2000 and anti-HistoneH1 (Millipore) 1:600. The secondary antibody was used at 1:5000 in all cases. The membranes were revealed with SuperSignal west pico (Thermo scientific), and image acquisition was made with the Dyversity system from Syngene. The protein expression differences between treatments were determined densitometrically with the image analysis software GeneTools, using HistoneH1 as the housekeeper protein.

Real Time PCR. Cells were treated with 90, 180, or 360 nM CYN for 24 h. Total RNA was purified with PureZOL (BIO-RAD) following the manufacturer's instructions. The RNA was quantified spectrophotometrically with NanoDrop2000 (Thermo Scientific). After DNase treatment, reverse transcription was performed with the RevertAid M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas). The cDNA was analyzed by real time PCR using FastStart™ Universal SYBR Green Master Kit (Roche) with Applied Biosystem StepOne. Differential gene expression of Nrf2 and Keap-1 was determined using the 18s ribosomal mRNA as the housekeeper for normalization (see Supporting Information, Table 1, for primer sequences). The $\Delta\Delta\text{CT}$ method was used for relative quantification. The StepOne software (Applied Biosystems) was used to calculate the fold change and standard deviation of each cDNA from treated P.H. with respect to control cells. The relative fold expression (RQ) was determined by $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. The error bars display the calculated maximum (RQ Max) and minimum (RQ Min) expression levels that represent standard deviation of the mean expression level (RQ value) with a confidence <0.05 . Each treatment was analyzed in triplicate, and three experiments were done.

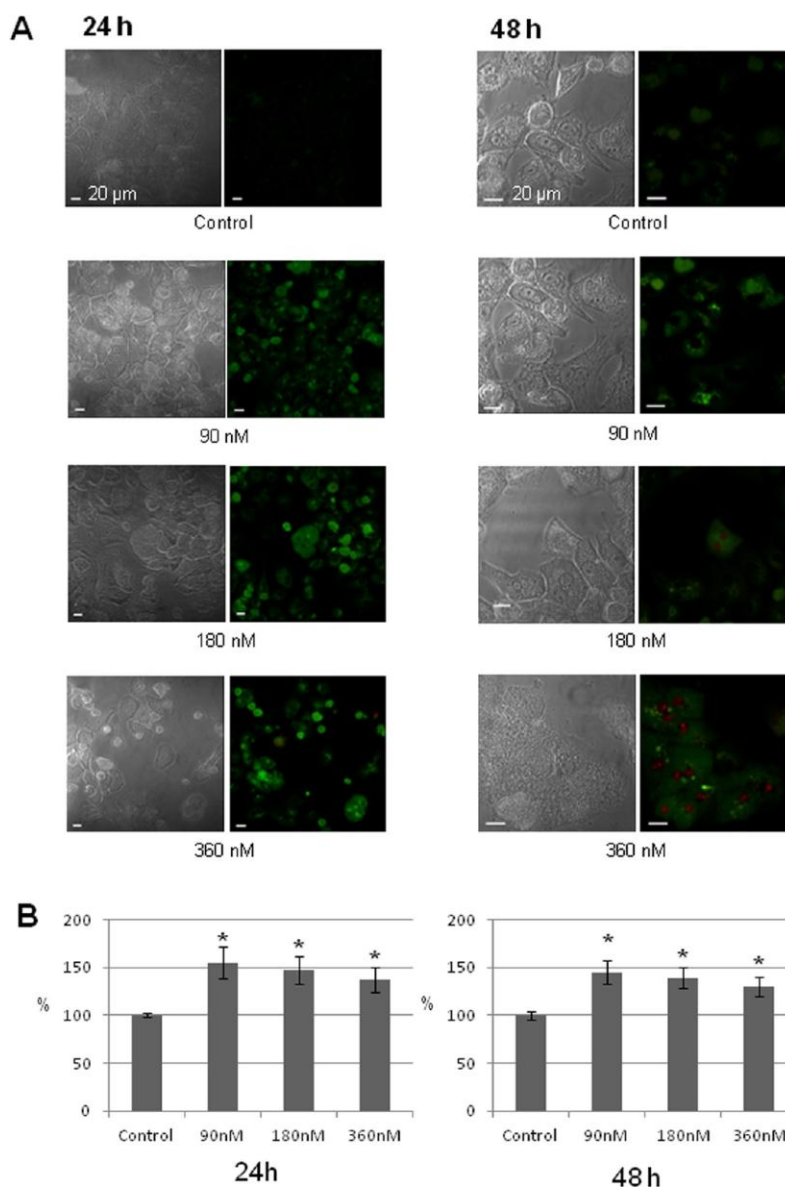


Figure 3. FITC conjugated Annexin V and P.I. staining in P.H. treated with CYN. (A) Confocal microscopy determination of Annexin V and P.I. Representative photos for 24 and 48 h of treatment are shown. (B) Determination by spectrofluorimetry of FITC conjugated Annexin V in P.H. treated with CYN for 24 and 48 h, expressed as % variation with respect to the control (set as 100%). *, Significant differences with respect to the control ($n = 6$, $p < 0.01$).

Protein Synthesis Determination. Protein synthesis was determined according to a previously described method²⁹ with modifications. In brief, [³H]-L-leucine incorporation into the cellular protein of the control, CYN, or cycloheximide (positive control for protein synthesis inhibition) treated P.H. was determined. Five hours before CYN treatment ended, P.H. were incubated with 5 μ Ci/mL [³H]-L-leucine (140 Ci/mmol) (Hartmann Analytic). Cells were then washed once with HBSS and twice with ice-cold 10% (w/v) trichloroacetic acid. Finally, 0.3 M NaOH was added, and the cells were transferred to a tube where digestion continued for 1 h. One hundred microliters from these lysates was added to 2 mL of

scintillation fluid Ultima Gold (Perkin-Elmer), and samples were counted for 5 min in a Beckman LS6000TA scintillation counter. DNA concentration in each sample was used to normalize the protein synthesis rate with respect to total cell number. For this, a standard curve was generated spectrofluorometrically using 0–800 ng of salmon sperm DNA (Sigma) diluted in 0.2 M Tris, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, and 4 μ g/mL Hoechst 33258 (Sigma) at pH 7.4. Five microliters of each lysate was incubated in the same solution as the standards for 30 min. After determining the fluorescence of each sample, the DNA concentration in the cell lysates was extrapolated from the standard curve. Fluorescence was measured with a Bio-Tek,

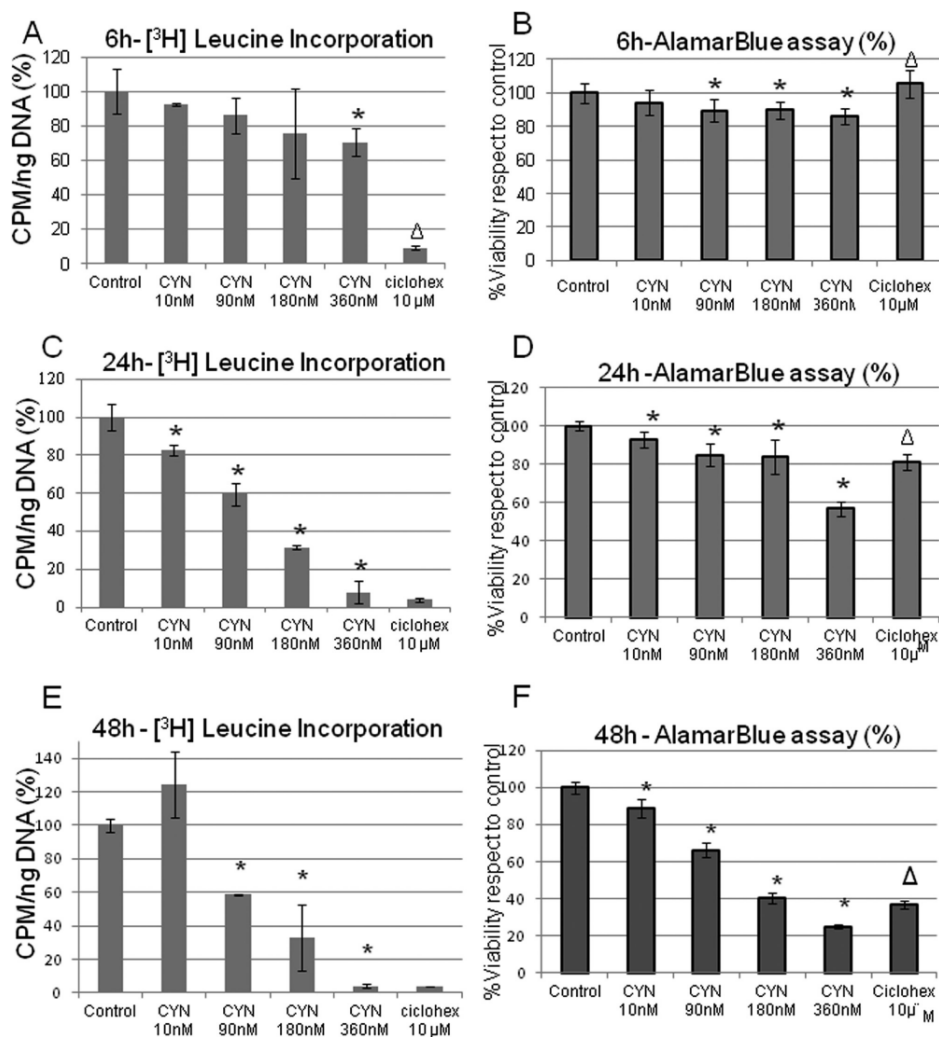


Figure 4. (A, C, and E) Incorporation of [^3H]-L-leucine into the protein of P.H. incubated with CYN for 6, 24, and 48 h. The results are expressed as the % variation of CPM/ng DNA in toxin treated cells with respect to the control. (B, D, and F) viability of P.H., exposed to CYN in the same conditions as those in the protein synthesis experiments. *, Significant differences with respect to the control. Δ , Significant differences between P.H. treated with 360 nM CYN and cells incubated with 10 μM cycloheximide ($n = 3$, $p < 0.01$).

FL600 microplate fluorescence reader at 356 and 458 nm, excitation and emission, respectively.

Statistical Analysis. The results were analyzed using the Sigmaplot software. One way ANOVA was employed for comparison of significant differences among groups. Comparisons between groups were made by the Holm–Sidak multiple-range test. A $p < 0.01$ ($n \geq 3$) value was considered significant.

RESULTS

According to the Alamar Blue assay, CYN reduced cell viability in P.H. at the three tested concentrations (Figure 1). The cell viability decreased approximately 50% when cells were treated with 360 and 180 nM CYN for 24 and 48 h, respectively. Caspase-3 activity increased in cells treated for 48 h with 90, 180, and 360 nM CYN (Figure 2A), and the cell cycle analysis showed a higher subG0 population in CYN treated cells when compared to those in controls (Figure 2B,C, and Supporting Information,

Figure 1). Apoptosis was also determined using Annexin V. All of the toxin concentrations tested (90, 180, and 360 nM) produced an increase of Annexin V staining after 24 and 48 h, as detected by confocal microscopy. Most of the cells that were stained with Annexin V showed no P.I., except for those treated with 180 and 360 nM CYN for 48 h (Figure 3A). An increase in Annexin V stained cells was observed in toxin treated cultures after the first 6 h (Supporting Information, Figure 2). In order to determine if necrosis was also induced by CYN, the LDH released to the medium was determined in hepatocyte cultures treated with the toxin. No variation was observed in CYN treated cultures up to 48 h, while an increase in enzymatic activity in the medium was observed after 72 h of treatment (Figure 2D).

To determine the effect of CYN on the protein synthesis of P.H., cultures of these cells were treated with the toxin for 6, 24,

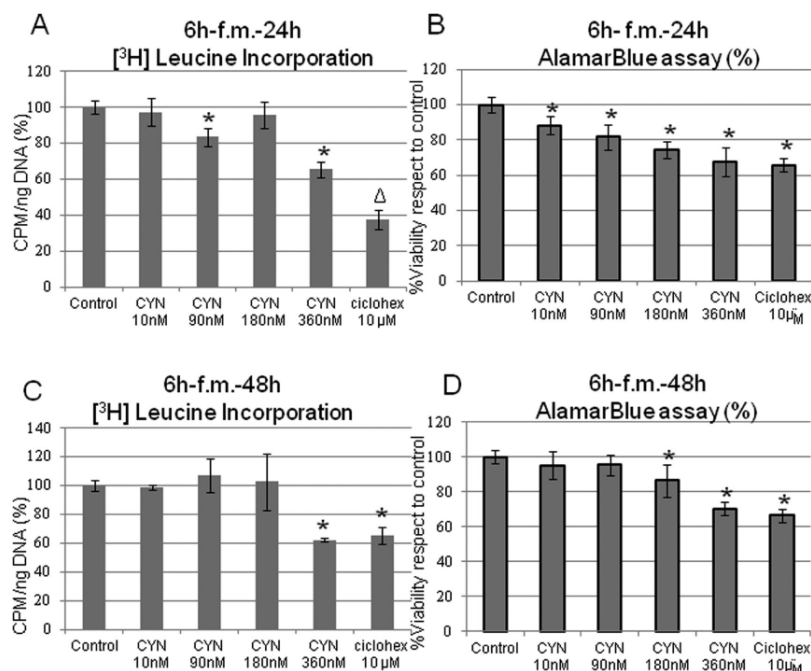


Figure 5. Determination of protein synthesis inhibition by incorporation of [³H]-L-leucine into protein of P.H. treated with CYN for 6 h and then cultured in fresh medium (f.m.) up to 24 h (A) and 48 h (C), expressed as described in Figure 3. Viability of P.H. treated in the same conditions as those in the protein synthesis experiments (B,D). *, Significant differences with respect to the control. Δ , Significant differences between P.H. treated with 360 nM CYN and cells incubated with 10 μ M cycloheximide ($n = 3$, $p < 0.01$).

and 48 h, and [³H]-L-leucine incorporation was determined. Simultaneously, viability assays were made to compare protein synthesis inhibition rates with cell death rates, for each condition tested. We observed a time and dose dependent response in protein synthesis inhibition and viability decrease in all cases. After 6 h, only 360 nM CYN induced a significant decrease of protein synthesis. Over 90% of protein synthesis inhibition was observed after 24 and 48 h in P.H. treated with the same toxin concentration, while lower concentrations were not capable of producing complete inhibition of protein synthesis (Figure 4A, C, and E). Cellular viability, for the same treatment conditions, decreased around 15%, 55%, and 75% in cells incubated with 360 nM CYN for 6, 24, and 48 h, respectively (Figure 4B, D, and F). Lower toxin concentrations were mildly cytotoxic after 24 h but reduced cell viability up to 60% after 48 h (Figure 4B, D, and F). In these experiments, cycloheximide, a reversible protein synthesis inhibitor, was less cytotoxic than CYN at all times examined, even though the rate of protein synthesis inhibition was similar to that observed for 360 nM CYN after 24 or 48 h of toxin exposure. Because protein synthesis inhibition by CYN has been reported to be irreversible,²³ we decided to determine if a short-term exposure to the toxin was sufficient to induce long-term protein synthesis inhibition and viability effects. For this, hepatocytes were treated with 10, 90, 180, and 360 nM CYN for 6 h and then incubated with fresh, toxin free medium up to 24 or 48 h. The protein synthesis inhibition observed was approximately 35–40% after 24 h and also 40% after 48 h for the highest concentration of toxin tested (Figure 5A and C). No protein synthesis inhibition was observed for the rest of CYN concentrations tested after 24 and 48 h. The cell viability assays after 24 h of incubation showed that cell viability

decreased around 25 and 35%, in 180 and 360 nM CYN treated cultures, respectively (Figure 5B and D). The decrease in cell viability was slightly lower after 48 h, about 15 and 30% for 180 and 360 nM CYN, respectively. Cycloheximide treatment produced the highest rate of protein synthesis inhibition but induced a similar rate of cell death compared to that of CYN after 24 h (Figure 5A and B) and the same rate of protein synthesis inhibition and cell death compared to those of CYN after 48 h (Figure 5C and D).

CYN induced oxidative stress at all the concentrations tested after 24 and 48 h of incubation. We observed an increase in DCF oxidation in CYN treated hepatocytes by confocal microscopy (Figure 6A) and after spectrofluorimetric determination (Figure 6B). A 3-fold increase in fluorescence was observed in hepatocytes treated with 360 nM CYN for 48 h. To determine if oxidative stress was involved in the cytotoxic effect of CYN, we performed viability assays with Alamar Blue for P.H. treated with 360 nM CYN and the antioxidant resveratrol. Resveratrol partially rescued the cells in a concentration dependent manner after 24 and 48 h of treatment. The increase in cell viability in cultures treated with CYN plus 20 μ M resveratrol was about 32% and 7% after 24 and 48 h, respectively, when compared to that of CYN treated cells (Figure 7).

To study if CYN induced ROS affected the endogenous antioxidant response in P.H., the protein level of the transcription factor that regulates the expression of antioxidant enzymes, Nrf2, was determined by confocal microscopy and Western blots. By both methods we observed a higher level of this transcription factor in toxin treated cells after 48 h (Figure 8A and B). Densitometric quantification indicated that 2-fold and 5-fold increases in Nrf2 were observed in cells treated with

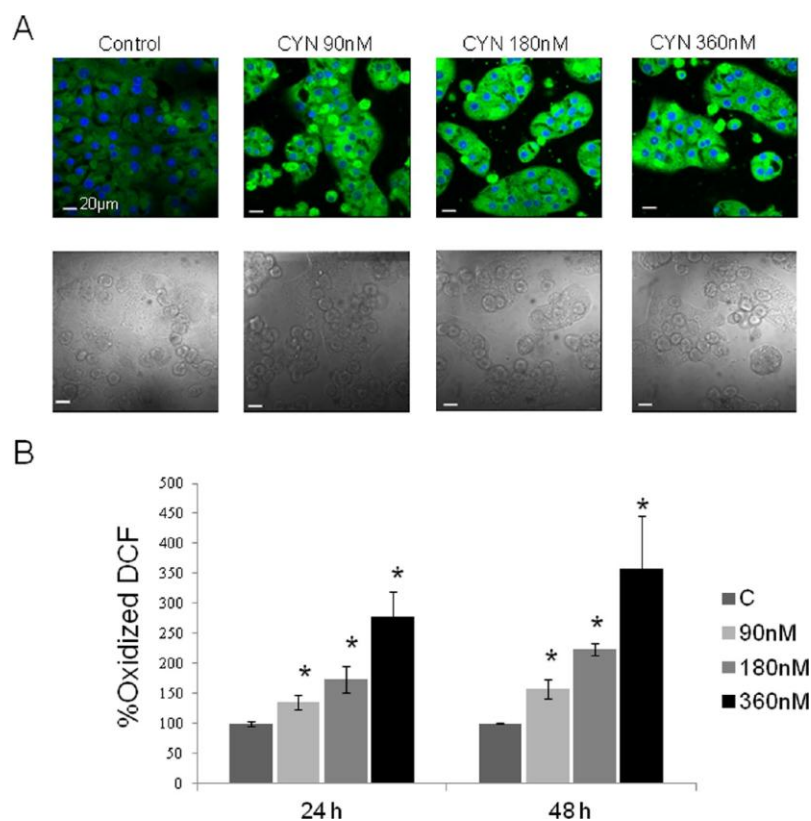


Figure 6. Determination of oxidized DCF in CYN treated P.H. (A) Confocal microscopy determination, where representative photos for each 24 h treatment are shown. (B) Fluorimetric determination of DCF oxidation in P.H. treated with CYN for 24 and 48 h, expressed as % variation with respect to the control (set as 100%). *, Significant differences with respect to the control ($n = 3$, $p < 0.01$).

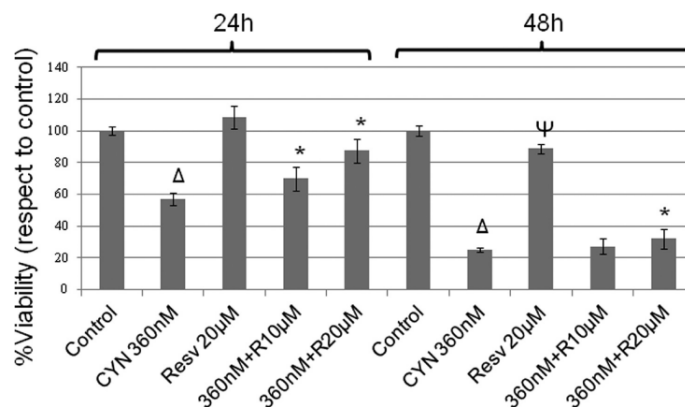


Figure 7. Viability, determined by the Alamar blue assay, of P.H. treated with CYN or CYN + resveratrol for 24 and 48 h. *, Significant differences between resveratrol + CYN treated samples and CYN treated samples. Δ, Significant differences with respect to the controls ($n = 3$, $p < 0.01$).

180 and 360 nM CYN, respectively (Figure 8C). No difference was observed after 24 h of treatment (results not shown). To determine if the difference observed in the Nrf2 protein level after 48 h was a consequence of transcriptional regulation, real time PCR was used to measure the expression levels of this transcription factor in control and CYN treated cells. In

cells treated with 360 nM CYN for 24 h, an increase in Nrf2 expression was observed, but cells incubated for 48 h showed mild down-regulation of its mRNA in toxin treated cultures, when compared to that of controls (Figure 8D). Because Nrf2 is regulated by its repressor Keap1, the transcription level of this species was also determined. CYN

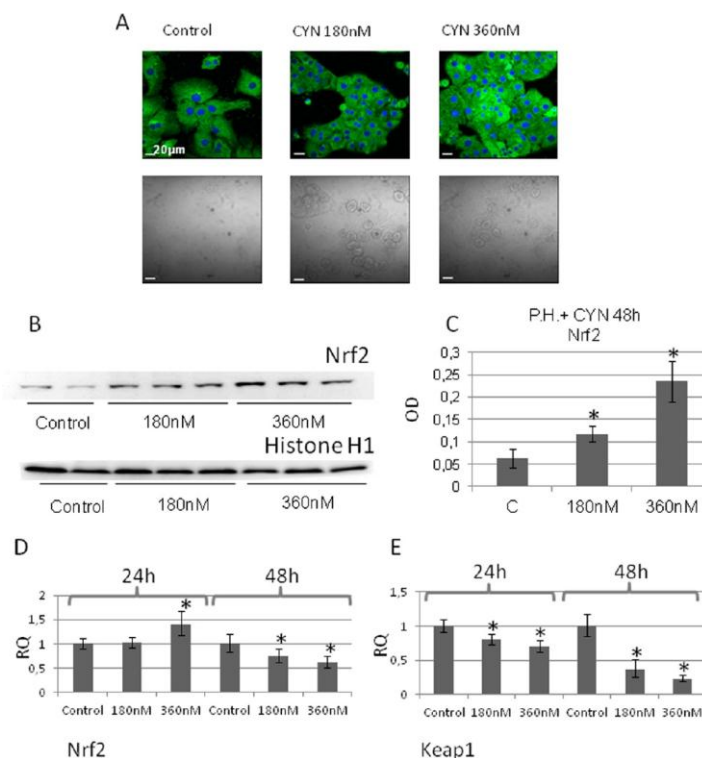


Figure 8. (A) Nrf2 detected by confocal microscopy in cells exposed 48 h to CYN. (B) Nrf2 detection by Western blot in cultures treated with 180 and 360 nM CYN for 48 h. (C) Densitometric analysis of the results presented in Figure 7 B. (D and E) Relative quantification of Nrf2 and Keap1 mRNA by qPCR in P.H. treated for 24 and 48 h with toxin. *, Significant differences with respect to the control ($p < 0.05$, $n = 3$).

induced a decrease in Keap1 transcription after 24 and 48 h (Figure 8E).

DISCUSSION

Cylindrospermopsin, at the concentrations used in this work, produced a dose and time dependent decrease of cell viability in P.H. cultures. When the type of cell death was analyzed, we mainly observed apoptosis, as determined by caspase-3 determination, flow cytometry, and FITC-conjugated Annexin V staining. Given that phosphatidylserine translocation is an early event in apoptosis, Annexin V staining was performed with hepatocytes treated with CYN for 6 h. CYN treated cells showed increased Annexin V staining implying that apoptosis is induced rapidly by the toxin. After a long exposure time (48 h), a mild increase of P.I. staining was observed in cells treated with 180 and 360 nM CYN, indicative of the loss of membrane integrity. An increase in LDH leakage to the medium was observed but only after 72 h of toxin exposure. This could be the consequence of secondary necrosis that occurs in apoptotic cells in culture, as has been described before.³⁰ Other authors have used LDH release to the medium to determine the viability of P.H. treated with CYN.^{16,23} These studies used higher CYN concentrations (in the micromolar range) implying that at low concentrations CYN could be apoptotic while inducing necrosis at higher doses.

In P.H. of rats and mice, CYN (in the micromolar range) inhibits protein synthesis.^{23,24} In order to assess the degree of protein synthesis inhibition exerted by CYN at the doses

employed in this work, [³H]-leucine incorporation assays were performed. These were made in parallel with viability experiments to determine how protein synthesis inhibition is implicated in cell death. Of the concentrations tested, only the highest one (360 nM) produced complete protein synthesis inhibition after 24 h, which continued up to 48 h. This effect was accompanied by a decrease in cell viability of approximately 50 and 70% after 24 and 48 h, respectively. At the same time, complete protein synthesis inhibition by cycloheximide induced a lower cytotoxicity after 24 and 48 h, similar to that observed for 180 nM CYN, where the protein synthesis was not completely inhibited. This indicates that besides protein synthesis inhibition, other factors are involved in cell death induced by CYN. Reinforcing this notion is the fact that, even when a mild protein synthesis inhibition was observed after 6 h of toxin exposure, this molecule decreased cell viability by 30% when incubation continued without toxin up to 24 or 48 h. When cells were treated with the toxin for 6 h and then incubated for another 18 or 42 h with fresh media, the cells treated with the highest CYN concentration tested did not recover their normal protein synthesis rate, which remained at the same level as that observed after 6 h of incubation or even slightly decreased, indicating an irreversible protein synthesis inhibition as shown by others.²³ This last experiment, when compared to those where the toxin was present for 24 or 48 h, also shows that the toxin needs several hours to exert its complete protein synthesis inhibition. It has been reported that metabolic activation mediates the toxicity of CYN,^{16,31} so this could be the reason

for the results observed in cells incubated with the toxin for 6 h and then incubated in toxin-free media up to 24 or 48 h.

When we determined ROS in CYN treated P.H., we observed a time and dose dependent increase in these species. As a consequence, the transcription of the antioxidant response element (ARE) binding factor, Nrf2, was induced. This, combined with a decrease in the transcription of Keap1 (Nrf2 inhibitor), led to higher Nrf2 protein levels in CYN treated cells after 48 h of exposure. These results show an attempt of the cells to counteract the deleterious effects of oxidative species generated by CYN exposure. In order to determine if oxidative stress was involved in CYN toxicity in primary hepatocytes, we used resveratrol, which has been shown to act as an effective cytoprotective agent against oxidative stress in several cell culture systems including P.H.^{32–34} This compound exerted partial cytoprotection in CYN treated cells. A dose–response cytoprotection was observed in the first 24 h, whereas the protective activity of resveratrol was lower after 48 h of incubation. Other authors¹⁶ have reported that oxidative stress is not observed in primary mouse hepatocytes treated with 5 μ M CYN for 12 h. At the toxin concentration used by these authors, necrotic cell death was observed.¹⁶ Our results indicate that oxidative stress is involved in the cytotoxicity induced by CYN at lower concentrations, in primary rat hepatocytes. The reason for this could be that the lower toxin concentrations and longer exposure times we used induced apoptosis, while in the case of necrosis induction, the insult to the cells produced by the toxin could be of such a magnitude, and cell death so rapid, that oxidative stress could not be observed.

CONCLUSIONS

In summary, we show that CYN induces apoptosis at the nanomolar range and that this is mediated at least by oxidative stress and protein synthesis inhibition.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Representative histograms obtained after flow cytometry imaging; photos of the gated populations; confocal microscopy determination of FITC-conjugated Annexin V staining; and primer sequences. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel/Fax: 0034-982 252 242. E-mail: Luis.Botana@usc.es.

Funding

This work was funded with the following FEDER cofunded-grants: from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain, SAF2009-12581 (subprograma NEF), AGL2009-13581-CO2-01, TRA2009-0189, and AGL2010-17875; from Xunta de Galicia, Spain, GRC 2010/10 and PGDIT 07MMA006261PR, PGDIT (INCITE) 09MMA003261PR, PGDIT (INCITE) 09261080PR, 2009/XA044, and 10PXIB261254 PR; from EU VIIth Frame Program, 211326-CP (CONFIDENCE), 265896 BAMMBO, 265409 μ AQUA and 262649 BEADS, and 312184 PharmaSea; and from the Atlantic Area Programme (Interreg IVB Trans-national), 2009-1/117 Pharamatlantic.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ABBREVIATIONS

P.H., primary rat hepatocytes; CYN, cylindrospermopsin; PBS, phosphate buffered saline; LDH, lactate dehydrogenase; f.m., fresh medium; P.I., propidium iodide; ROS, reactive oxygen species; DCF-DA, dichlorofluorescein diacetate; PFA, paraformaldehyde; BSA, Bovine serum albumin; HBSS, Hank's buffered salt solution

REFERENCES

- (1) Kinnear, S. (2010) Cylindrospermopsin: a decade of progress on bioaccumulation research. *Mar. Drugs* 8, 542–564.
- (2) Byth, S. (1980) Palm Island mystery disease. *Med. J. Aust.* 2 (40), 42.
- (3) Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., Shaw, G. R., and Eaglesham, G. K. (2001) Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109, 663–668.
- (4) Griffiths, D. J., and Saker, M. L. (2003) The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 18, 78–93.
- (5) Hawkins, P. R., Runnegar, M. T., Jackson, A. R., and Falconer, I. R. (1985) Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1292–1295.
- (6) Saker, M. L., Nogueira, I. C., Vasconcelos, V. M., Neilan, B. A., Eaglesham, G. K., and Pereira, P. (2003) First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 243–250.
- (7) Thomas, A. D., Saker, M. L., Norton, J. H., and Olsen, R. D. (1998) Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northern Queensland. *Aust. Vet. J.* 76, 592–594.
- (8) Ohtani, I., Moore, R. E., and Runnegar, M. T. C. (1992) Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7941–7942.
- (9) Harada, K. I., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M. F., Watanabe, M., and Terao, K. (1994) Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32, 73–84.
- (10) Zegura, B., Straser, A., and Filipic, M. (2011) Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins: a review. *Mutat. Res.* 727, 16–41.
- (11) van Apeldoorn, M. E., van Egmond, H. P., Speijers, G. J., and Bakker, G. J. (2007) Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 7–60.
- (12) Falconer, I. R., and Humpage, A. R. (2006) Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environ. Toxicol.* 21, 299–304.
- (13) Shaw, G. R., Seawright, A. A., Moore, M. R., and Lam, P. K. (2000) Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity. *Ther. Drug Monit.* 22, 89–92.
- (14) Bazin, E., Huet, S., Jarry, G., Hegarat, L. L., Munday, J. S., Humpage, A. R., and Fessard, V. (2010) Cytotoxic and genotoxic effects of cylindrospermopsin in mice treated by gavage or intraperitoneal injection. *Environ. Toxicol.* 27, 277–284.
- (15) Humpage, A. R., Fenech, M., Thomas, P., and Falconer, I. R. (2000) Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 472, 155–161.
- (16) Humpage, A. R., Fontaine, F., Froschio, S., Burcham, P., and Falconer, I. R. (2005) Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 68, 739–753.
- (17) Maire, M. A., Bazin, E., Fessard, V., Rast, C., Humpage, A. R., and Vasseur, P. (2010) Morphological cell transformation of Syrian

hamster embryo (SHE) cells by the cyanotoxin, cylindrospermopsin. *Toxicol* 55, 1317–1322.

(18) Straser, A., Filipic, M., and Zegura, B. (2011) Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Arch. Toxicol.* 85, 1617–1626.

(19) Falconer, I. R., and Humpage, A. R. (2001) Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga cylindrospermopsis raciborskii containing the toxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* 16, 192–195.

(20) Falconer, I. R., Hardy, S. J., Humpage, A. R., Froschio, S. M., Tozer, G. J., and Hawkins, P. R. (1999) Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environ. Toxicol.* 14, 143–150.

(21) Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M. F., Harada, K. I., Ito, E., and Watanabe, M. (1994) Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicol* 32, 833–843.

(22) Runnegar, M. T., Kong, S. M., Zhong, Y. Z., and Lu, S. C. (1995) Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 219–225.

(23) Froschio, S. M., Humpage, A. R., Burcham, P. C., and Falconer, I. R. (2003) Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ. Toxicol.* 18, 243–251.

(24) Runnegar, M. T., Xie, C., Snider, B. B., Wallace, G. A., Weinreb, S. M., and Kuhlenkamp, J. (2002) In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicol. Sci.* 67, 81–87.

(25) Gutierrez-Praena, D., Pichardo, S., Jos, A., Moreno, F. J., and Camean, A. M. (2012) Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2. *Water Res.* 46, 1566–1575.

(26) Chong, M. W., Wong, B. S., Lam, P. K., Shaw, G. R., and Seawright, A. A. (2002) Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytotomin in primary rat hepatocytes. *Toxicol* 40, 205–211.

(27) Seglen, P. O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13, 29–83.

(28) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

(29) Freshney, R. I. (1994) Quantitation and Experimental Design, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, 3rd ed., Wiley-Liss, New York.

(30) Majno, G., and Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3–15.

(31) Bazin, E., Mourot, A., Humpage, A. R., and Fessard, V. (2010) Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. *Environ. Mol. Mutagen.* 51, 251–259.

(32) de la Lastra, C. A., and Villegas, I. (2007) Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1156–1160.

(33) Rubiolo, J. A., and Vega, F. V. (2008) Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species. *Biomed. Pharmacother.* 62, 606–612.

(34) Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A., and Tillement, J. P. (1999) Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25, 87–97.

DISCUSIÓN

4-DISCUSIÓN

La presencia de las ficotoxinas en aguas marinas y continentales, y también en productos del mar empleados para el consumo humano hace necesario tener un mejor y mayor conocimiento del mecanismo de acción de estas toxinas para aportar a quien corresponda, mejores herramientas de decisión con el fin de adoptar medidas de protección de la salud pública más eficientes, equilibradas y ajustadas al peligro real que estas toxinas suponen. Como resultado de los experimentos llevados a cabo en esta tesis, se obtuvieron una serie de resultados que a continuación se discuten.

4.1.-Estudio del efecto de las toxinas diarreas (AO y DTX-2) sobre hepatocitos primarios y transformados

Por un lado, en la presente tesis doctoral se realizó un análisis toxicológico de AO y DTX-2 sobre las células Clone 9, HepG2 y H.P. de rata, para así profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción de estas toxinas y evaluar comparativamente, analogías y diferencias del AO respecto de la DTX-2. Estos resultados se publicaron en sendos trabajos titulados “Okadaic acid and dinophys toxin 2 have differential toxicological effects in hepatic cell lines inducing cell cycle arrest, at G0/G1 or G2/M with aberrant mitosis depending on the cell line” y “Comparative study of toxicological and cell cycle effects of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in primary rat hepatocytes”. En los citados estudios, se observó cómo el AO y la DTX-2 son equipotentes para la línea celular Clone 9, mientras que para las células HepG2, así como para los H.P. de rata, la DTX-2 es un 40% menos potente que el AO. Ésta diferencia de potencia es la misma que observaron Aune *et.al.* tras la administración intraperitoneal de las toxinas en ratones [77]. Sin embargo en otros artículos publicados, realizados con cultivos de neuronas cerebelares, la diferencia de potencia entre AO y DTX-2 es mayor [112] que la que nosotros observamos en la línea HepG2 y en el cultivo primario de hepatocitos.

La toxicidad que el AO mostró en nuestros ensayos, se encuentra entre los límites anteriormente publicados por otros grupos que han descrito IC_{50} entre 5 y 100 nM [154-157]. Las células Clone 9 y los H.P. cuando son expuestas al AO y a la DTX-2 muestran una sensibilidad similar, y a su vez son más sensibles que las HepG2. Aunando algunos datos publicados anteriormente junto con los obtenidos en ésta tesis, parece claro que las líneas celulares no son el mejor modelo para el estudio de la toxicidad relativa entre estas toxinas debido a la variabilidad de los resultados observados entre estas.

4.1.1-Estudio de la citotoxicidad del AO y la DTX-2 en células hepáticas

Cuando estudiamos el tipo de muerte celular inducida por el tratamiento de las células hepáticas con AO y DTX-2 vimos que en las células Clone 9 la población subdiploide aumentó respecto a las células no expuestas a las toxinas, y lo hizo en mayor grado cuando se emplearon mayores concentraciones de ambas moléculas. Además, en el estudio de p53, se observó cómo ésta proteína había migrado al núcleo en las células tratadas. Para entender mejor la implicación de este hallazgo cabe citar algunos aspectos funcionales de p53, también conocida como “proteína supresora tumoral”. Se conoce el papel trascendental que p53 juega en la respuesta de las células ante estímulos lesivos, ante los cuales, esta proteína se activa para impedir la progresión de células mutadas o dañadas. p53 es un factor de transcripción cuya expresión se induce ante múltiples señales de daño celular (la más estudiada el daño del ADN). La activación de p53 supone a su vez una regulación positiva o negativa (según los casos) de distintos genes efectores involucrados en diversas funciones celulares, entre las que cabe destacar la detención del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis [158]. La proteína p53 es compleja en su estructura y también posee una vasta complejidad funcional. Además, esta proteína sufre diversas transformaciones post-transcripcionales como son la fosforilación, la acetilación y la ubiquitinización.

Estas modificaciones acontecen previa migración de p53 al núcleo, y actúan como eficientes herramientas para regular la activación-desactivación de p53, así como su estabilidad y su vida media [159]. Además de las vías clásicas de actividad de p53 dependientes de la transcripción de diversos genes, estudios más recientes han demostrado las bases del mecanismo de acción de p53 cuando ejerce una actividad proapoptótica independiente de transcripción [160, 161], que además tiene lugar en cualquier tipo de célula que se vea sometida a alguno de los factores estresantes que activan p53, como son por ejemplo el daño del ADN y la hipoxia [160-162]. Posteriormente otros grupos corroboraron con sus estudios la existencia de una muerte celular programada mitocondrial, mediada directamente por p53 [163-167]. Considerando las vías que p53 emplea para inducir la muerte programada de las células, la presencia de p53 en el núcleo de las células Clone 9 tratadas indica que al menos cierto grado de apoptosis está involucrado en la citotoxicidad observada tras la incubación de esta línea celular con las ficotoxinas. Este hecho no ocurre en el caso de la línea de hepatoma humano HepG2. Sin embargo, en los H.P., tanto la población sub-G0 como la actividad de la caspasa-3 aumentaron significativamente, lo que apunta a que también en este caso la apoptosis está implicada, en la muerte de los H.P. no obstante, no puede descartarse la posible presencia de necrosis celular, ya que los hepatocitos tratados liberaron cierta cantidad de LDH al medio de cultivo.

4.1.2-El AO y la DTX-2 afectan de distinta manera el ciclo celular de distintos tipos de células hepáticas

Las dos toxinas inhibieron el ciclo celular de las líneas celulares estudiadas y de los H.P. de rata, pero lo hicieron en diferentes fases. Sobre las Clone 9, el AO y la DTX-2 tienen un efecto similar, inhibiendo el ciclo celular en G2/M e induciendo la aparición de células con mitosis aberrantes. Esto se deduce del hecho de que la población de células Clone 9 con múltiples núcleos es producto de una segregación aberrante de los cromosomas, sin que exista variación en la cantidad de ADN con respecto a

células en G2. La segregación aberrante de los cromosomas impide la progresión del ciclo celular, posiblemente induciendo muerte celular. El hecho de que se observen más células con mitosis aberrantes en células tratadas con AO 30 nM con respecto a las tratadas con AO 60 nM, mientras que se observa una mayor población apoptótica en las tratadas con AO 60 nM soporta esta hipótesis. En el caso de las HepG2 y los H.P. proliferantes, el ciclo celular se detiene en G0/G1. En ambos tipos celulares, al igual que ocurría al comparar la potencia de las toxinas entre sí (donde la toxicidad de la DTX-2 era 0,6 veces la del AO), el tratamiento con AO se asocia a mayor inhibición del ciclo celular que en el caso de las células tratadas con DTX-2.

Estudios previos a la realización de esta tesis, demostraron que tras estimulación mitogénica, la población de células binucleadas en cultivos de H.P. aumenta [168-170]. Estas células en presencia de mitógenos, progresan a través del ciclo celular generando dos células mononucleadas ($4n$) [171]. En este sentido, nosotros observamos cómo las células que se preincubaron con factor de crecimiento hepático (HGF) y luego se expusieron a las toxinas, muestran mayores poblaciones de células binucleadas. Esto deriva de la inhibición del ciclo celular en G1 de células binucleadas.

Por lo tanto, tanto el AO como la DTX-2 alteran el ciclo celular en cualquiera de los modelos estudiados, si bien lo hacen en distintas fases en función de la célula que se trate, (G2/M en Clone 9, G0/G1 en HepG2 y H.P. de rata).

Estos resultados en conjunto con los obtenidos en los experimentos de toxicidad, refuerzan la idea de que probablemente los H.P. sean un mejor modelo que las líneas transformadas para el estudio de estas toxinas, debido a la variabilidad de resultados que se observan en las líneas celulares.

4.1.3-EI AO y la DTX-2 alteran la expresión de ciclinas en las células estudiadas

Las ciclinas son proteínas reguladoras de la actividad enzimática de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), y ambas son dos grupos de proteínas que regulan positivamente la progresión del ciclo celular [172], ya que cuando las CDKs están activadas regulan la actividad de proteínas reguladoras específicas que median y regulan la transición desde G1 hasta M en células proliferantes. Las ciclinas son sintetizadas durante las fases G1, S, y G2, y son degradadas tras cumplir su función, o destruidas al final de la mitosis [173, 174]. Se han descrito diversos grupos de ciclinas, y todas ellas cuentan con un dominio bastante conservado, responsable de su unión a las CDKs [175]. Las ciclinas C, D, y E (CC, CD, y CE) son características de la fase G1. Cuando la célula recibe señales mitóticas, comienza la expresión de la CD y de la CE, siendo el complejo CE-CDK2 el que determina la transición de la fase G1 a S. En este punto, al finalizar la fase G1, se encuentra el punto de restricción (PR), a partir del cual la mitosis progresa independientemente de las señales mitóticas o antimitóticas que la célula reciba. En el comienzo de la fase S las ciclinas D y E son degradadas, mediante ubiquitinización y posterior direccionamiento hacia el proteosoma, sólo entonces comienza la síntesis de la ciclina A (CA). Durante la fase G2 aumenta la cantidad disponible de ciclinas A y B, y cuando la ciclina B (CB) entra en el núcleo comienza la mitosis. La degradación de la CB durante la fase M es imprescindible para que se produzca la correcta segregación de los cromosomas y que el ciclo continúe [174]. Por tanto, las ciclinas A y B realizan su principal función durante la mitosis [173, 175] (Figura5). Otras ciclinas recientemente descritas son las ciclinas F y G, pero de estas se tiene menor información. Se cree que la ciclina F controla el paso de la fase G2 a M, y que la ciclina G actúa frente al daño en el ADN [176, 177].

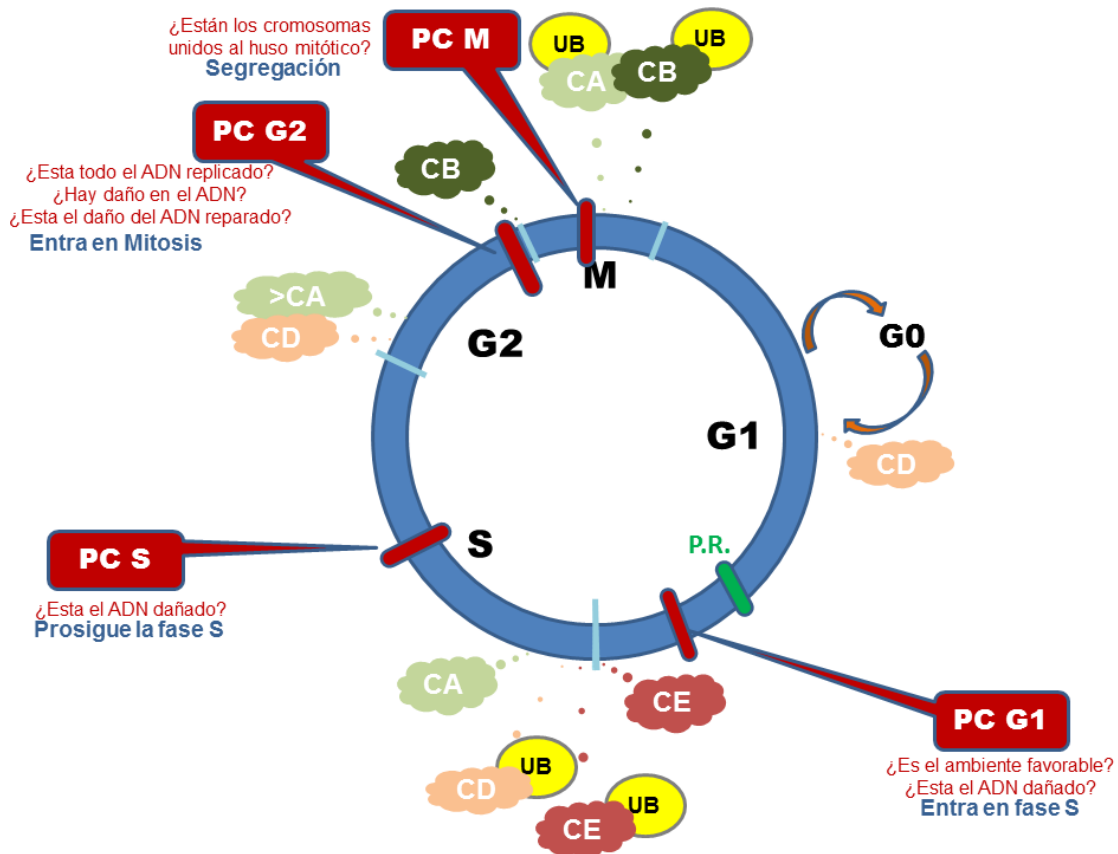


Figura 5: Implicación de las ciclinas D, E, A, y B (CD, CE, CA, y CB) en la progresión y las distintas fases del ciclo celular. Siendo Ubiquitina (UB), Punto de restricción (PR), Puntos de control de G1, de G2 y de M (PC G1, PC G2, PC M).

A lo largo del ciclo celular existen diversos puntos de control (PC) que verifican el correcto desarrollo del proceso. Al comienzo de la fase M está el PC de ADN no replicado [178]. Al final de la mitosis el PC de la separación de cromosomas comprueba el correcto alineamiento de los cromosomas en el huso mitótico. Si esta alineación es incorrecta, la CB no se degrada y se impide por tanto la citocinesis [179]. Además, también existen PC de daño de ADN, localizados en G1, S, y G2 (Figura 5). Si se detecta alguna deficiencia se activa la proteína p53 que detiene el ciclo celular e intenta reparar el daño. En caso de no ser posible la reparación se induce apoptosis de la célula [180, 181].

Tras evaluar el perfil de expresión de las ciclinas en las células hepáticas tratadas con AO y DTX-2 en comparación con los controles, se vio que en el caso de las Clone 9 la

expresión de las ciclinas A, B, y D estaba aumentada. Esto está de acuerdo con los resultados observados en la progresión del ciclo celular después de la exposición a AO y DTX-2. El incremento en la expresión de las ciclinas mencionadas permiten a las células pasar de la fase G1 a la fase de síntesis de ADN (S), para finalmente una vez alcanzada la fase G2 ser incapaces de segregar los cromosomas correctamente durante la mitosis. Se ha demostrado que en células con fallos en los puntos de control mitóticos (y consecuentemente células con una alineación inadecuada de los cromosomas) se induce apoptosis tras la segregación incorrecta de los cromosomas [182]. De igual manera, se ha demostrado que en el cortex cerebral de ratas, el AO induce la expresión de la ciclina B₁ y mitosis catastróficas, resultado de una combinación de puntos de control del ciclo celular deficientes y daño celular [183] [184]. El incremento de las ciclinas A y B₁ inducido por AO y DTX-2 en células Clone 9 apunta a la inducción de apoptosis como consecuencia de una segregación aberrante de los cromosomas. En el caso de las células HepG2 al igual que en Clone 9, observamos una regulación positiva de la ciclina D, sin embargo las ciclinas A₂ y B₁ estaban sub-expresadas respecto a los controles. Esto es concordante con los datos obtenidos por citometría de flujo, en los cuales se observó una inhibición del ciclo en G0/G1 sin apreciarse mitosis aberrantes. Como hemos mencionado, en el comienzo de la fase S del ciclo celular la síntesis de ciclina A es imprescindible [185]. En los histogramas de citometría de las HepG2 tratadas con AO o DTX-2 se observó un desplazamiento de la población en G1 hacia la derecha, es decir, las células están entre G1 y S, o se encuentran en la fase S pero incapaces de progresar, posiblemente por la carencia de ciclina A. Esta acumulación de células en la fase S también ha sido observada con anterioridad por otros autores que trataron células Caco-2 (adenocarcinoma colorectal humano) con AO en concentraciones similares a las que nosotros empleamos [186]. De cualquier modo son necesarios más experimentos que ayuden a esclarecer este proceso.

4.1.4-Efecto del AO y la DTX-2 sobre la expresión de p53 en células hepáticas

En lo referente al efecto que el AO y la DTX-2 tienen sobre p53 y el ciclo celular, tanto en Clon 9 como en HepG2, se observó la migración de p53 al núcleo. Esto podría tener relación con la inhibición del ciclo celular de HepG2 en G0/G1. Sin embargo, en los H.P. proliferantes tratados con ambas toxinas la expresión y la presencia de la proteína p53 disminuye significativamente. Esta regulación negativa de p53 podría ser responsable, al menos en parte de la detención del ciclo celular, ya que, aunque resulte confuso, otros investigadores han demostrado que en hepatocitos primarios de rata, la presencia de p53 es fundamental para la síntesis de ADN. Al exponer el cultivo de H.P. de rata a concentraciones crecientes de HGF vieron cómo se incrementaba la expresión de p53 y posteriormente la cantidad de ADN, de forma dosis-dependiente. Además comprobaron que al incorporar un oligonucleótido antisentido del ARNm codificante para p53, o al añadir al medio de cultivo pifithrin- α (inhibidor de p53), la cantidad de ADN en las células se reducía [187]. Por otro lado, se ha demostrado que la activación de la ruta p53-p21^{cip1} determina la entrada de los hepatocitos en la fase S del ciclo celular [188]. p21 es el regulador de crecimiento, inducido por p53, mejor caracterizado. p21 generalmente se describe como inhibidor del crecimiento, ya que inhibe selectivamente algunas CDKs imprescindibles para la progresión del ciclo celular. En este contexto, Wierod y colaboradores demostraron que en los H.P. de rata en cultivo, el factor de crecimiento epitelial (EGF) estimula la expresión de p53 y p21, y que esto es importante para la translocación nuclear de CDK2 y CDK4, y por tanto es clave para la progresión del ciclo celular de los hepatocitos hasta la fase S. Por lo tanto, estos autores proponen que tanto p53 como p21 pueden jugar un doble papel en la regulación del crecimiento de los H.P. de rata, participando tanto en la inhibición como en la estimulación de síntesis de ADN, en función de las señales recibidas por las células [188]. Todo esto implica que el ciclo celular de los hepatocitos se detiene en G1 cuando los niveles de p53 descienden, y eso es precisamente lo que vimos

cuando se analizó p53 y el ciclo celular de H.P. proliferantes tratados con AO y DTX-2. Los niveles de p53 en H.P. proliferantes descienden y consecuentemente se observa una inhibición del efecto del agente mitogénico (HGF). En lo que respecta a la localización sub-celular de p53 en los H.P., cuando fueron tratados conjuntamente con HGF y toxinas, no se observó cambio alguno en la localización de p53, detectándose tanto en el núcleo como en el citosol. Esto podría deberse al tipo de anticuerpo empleado en las tinciones, ya que nosotros empleamos un anticuerpo policlonal anti-p53 total. Como ya hemos mencionado anteriormente, esta proteína está regulada post-transduccionalmente por fosforilación y acetilación [159]. Por esto los resultados obtenidos utilizando un anticuerpo para las formas fosforiladas o acetiladas de la proteína podrían diferir de los obtenidos utilizando un anticuerpo capaz de reconocer la forma sin modificaciones pos-transduccionales.

4.1.5-El AO y la DTX-2 tienen distintos efectos sobre el citoesqueleto de tubulina de hepatocitos

En los tres tipos celulares estudiados el citoesqueleto de tubulina se vio alterado por estas ficotoxinas, pero de diversa manera. En las células Clone 9 examinadas mediante microscopía confocal, previa tinción de la β -tubulina y el ADN, tanto el AO como la DTX-2, produjeron importantes defectos en la formación de los husos mitóticos, lo que tuvo como consecuencia una segregación incorrecta de los cromosomas que finalmente nos permitió observar las mitosis aberrantes que se presentan en este trabajo. Por otra parte, en la línea HepG2 no se aprecian alteraciones evidentes, en lo que respecta a los husos mitóticos. Sin embargo, en ambos casos parece haber cierta despolimerización de la β -tubulina. Inesperadamente en los H.P. observamos la presencia de tubulina polimerizada en el núcleo. En 2009 se publicó un artículo en el cual se demostraba que en células expuestas a estrés químico la migración de la tubulina al núcleo representa un mecanismo de defensa, deteniéndose el ciclo celular, y previniendo la potencial transformación celular hacia la

malignidad [189]. Por esto, la presencia de tubulina en el núcleo de H.P. expuestos a AO y DTX-2 puede ser una consecuencia del estrés químico producido por estas moléculas. Sin embargo, otra posible causa que no debemos descartar es la presencia de estas células en condiciones de cultivo, ya que períodos largos de incubación pueden producir cierto estrés en las células, estrés que sumado al generado por los compuestos en estudio puede producir migración de tubulina hacia el núcleo.

4.2-Estudio del efecto de CYN sobre hepatocitos primarios

En esta tesis doctoral también se planteó como objetivo entender el mecanismo de acción de la toxina de agua dulce CYN, a fin de aportar información que ayude, en la medida de lo posible, a entender el efecto producido por la toxina durante los episodios de intoxicación de diversas poblaciones. En el trabajo publicado en la revista “Chemical Research in Toxicology”, denominado “Protein synthesis inhibition and oxidative stress induced by cylindrospermopsin elicit apoptosis in primary rat hepatocytes” evaluamos diversos aspectos implicados en la muerte de los H.P. de rata a causa de la CYN.

4.2.1-La CYN, a concentraciones nanomolares, es toxica e induce apoptosis en H.P.

A las concentraciones empleadas en nuestro trabajo la CYN demostró ser citotóxica para los H.P. con un patrón dependiente de la dosis y del tiempo, siendo la apoptosis el principal tipo de muerte celular inducido como lo indican los diversos experimentos que llevamos a cabo. En estos experimentos observamos que la actividad de caspasa-3 estaba incrementada, de manera dosis dependiente, en las células tratadas con CYN. A su vez, experimentos de citometría de flujo por imagen previa tinción de yoduro de propidio (I.P.) mostraron un aumento de la población sub-G0 en las células tratadas con CYN respecto a los controles. Durante la apoptosis se produce una característica fragmentación internucleosomal del ADN por acción de endonucleasas,

estas enzimas generan fragmentos de tamaño variable y múltiples de aproximadamente 200 pares de bases [190, 191], y parte de estos fragmentos son los que se localizan en la población sub-G0 tras el análisis citométrico. Para confirmar la existencia de apoptosis en H.P. tratados con CYN se llevaron a cabo experimentos de tinción con Anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) que se analizaron por detección espectrofluorimétrica y por microscopía confocal. Estos ensayos confirmaron la inducción de apoptosis por CYN, pues todas las concentraciones probadas provocaron un incremento del número de células marcadas. La Anexina V se une a la fosfatidilserina, que habitualmente se encuentra en la cara citosólica de la membrana celular, pero que tras una señal apoptótica, en los primeros estadios del proceso, se transloca y se sitúa en la cara externa de la membrana celular [192]. Por tanto, como éste es un suceso temprano en la apoptosis, nosotros optamos por tratar las células durante 6 h. En este caso se vio como aumentaba la proporción de células marcadas, lo que pone de manifiesto que la CYN desencadena rápidamente apoptosis sobre los H.P. Además se empleó microscopía confocal para evaluar los resultados del marcaje conjunto con I.P. y Anexina V. En este experimento vimos un ligero incremento de I.P. en las células que habían sido expuestas a la toxina durante 48 h, lo que es indicativo de la pérdida de integridad de la membrana celular.

A fin de establecer si además de apoptosis, la CYN producía pérdida de integridad celular propia de la necrosis, evaluamos la liberación al medio de cultivo de lactato deshidrogenasa, que se produce debido a la permeabilización celular que se observa durante la muerte necrótica. Sólo se observó un incremento significativo de esta enzima tras 72 h de tratamiento. Tanto la tinción nuclear con I.P. que se menciona más arriba como la aparición de la LDH en el medio de cultivo, después de largos tiempos de incubación, nos indican que es posible la presencia de cierto grado de necrosis, sin embargo, es más probable una necrosis secundaria a consecuencia de la apoptosis, cuya presencia se ha observado en células en cultivo [29]. Majno *et al*

detallaron ya en 1995 las fases y características de las células apoptóticas. Ellos describieron una fase tardía de la apoptosis en la que se observan imágenes típicas de células necróticas, afirmando que esta segunda fase de apoptosis debía ser llamada “necrosis apoptótica” [190]. Un ejemplo de necrosis apoptótica es el de los cuerpos hialinos de Councilman, asociados a ciertas enfermedades hepáticas [193]. Otros grupos de investigación han empleado la liberación de LDH como método para establecer la viabilidad celular de H.P. tratados con la CYN [145, 147]. Estos autores emplearon concentraciones de toxina muy superiores a las nuestras, lo que indica que la CYN induce apoptosis o necrosis en función de las concentraciones empleadas. La presencia de apoptosis a estas concentraciones no se puede descartar debido a que los autores mencionados no realizaron experimentos que permitiesen hacerlo.

4.2.2-La CYN inhibe la síntesis de proteína a concentraciones nanomolares en H.P.

Se sabe que la CYN en concentraciones micromolares inhibe la síntesis de proteínas de H.P. de rata y ratón [61, 147]. Para determinar si esto también se observaba a concentraciones nanomolares (inductoras de apoptosis), realizamos experimentos para determinar la síntesis proteica a través de incorporación de leucina tritiada ($[^3\text{H}\text{-Leucina}]$). De forma paralela realizamos experimentos de viabilidad celular con alamar blue a fin de establecer si existía alguna relación entre el efecto de la CYN sobre la síntesis proteica y la citotoxicidad observada para esta molécula. La CYN 360 nM al cabo de 24 h ejerció una total inhibición de la síntesis proteica que se mantuvo hasta las 48 h. A ésta inhibición le acompañó una disminución en la viabilidad celular del 50% y 75% tras 24 y 48 h respectivamente. Sin embargo, cuando la síntesis proteica de los H.P. fue inhibida en el mismo grado empleando cicloheximida, la toxicidad observada después de 24 y 48 h de tratamiento fue mucho menor, comparable a la ejercida por la concentración de CYN de 180 nM, que no produjo una total inhibición de la síntesis de proteínas, como si hizo la cicloheximida. Esto nos

indicó que la inhibición de la síntesis proteica no es el único mecanismo implicado en la muerte celular causada por esta cianotoxina. Sustentando esta hipótesis se encuentran los datos obtenidos de los experimentos en los que se expuso a los H.P. a CYN durante 6 h para luego seguir incubando las células sin toxina hasta cumplirse las 24 o las 48 h. Estos demostraron que ante una inhibición de síntesis proteica nula o muy inferior a la observada en los experimentos en los que la toxina se mantuvo en el medio hasta las 24 y 48 h, se observó una reducción importante de la viabilidad celular. Con estos experimentos en los que se renovó el medio de cultivo, retirando la toxina después de 6 h de exposición, comprobamos que la inhibición es irreversible ya que la tasa de inhibición se mantuvo constante (o incluso disminuyó un poco mas) desde las 6 h hasta que se cumplieron las 24 y 48 h. Esto concuerda con lo publicado por otros investigadores [147]. Si se comparan los resultados obtenidos de los dos grupos de experimentos, se puede ver que la CYN necesita cierto tiempo para ejercer totalmente su poder inhibitorio sobre la síntesis de proteínas, una vez que se encuentra en contacto con las células. En este sentido, ya se ha demostrado que la activación metabólica está implicada en la toxicidad de la CYN [145, 194], y ésta podría ser la razón por la cual las células tratadas con toxina durante 6 h y luego incubadas con medio fresco hasta las 24 o 48 h se asocian con menores tasas de viabilidad que las células que simplemente permanecieron 6 h en presencia de CYN. También está relacionado con este hecho, que siendo la inhibición de la síntesis proteica producida por CYN irreversible, y aunque CYN 360 nM inhibió totalmente la síntesis proteica después de 24 h, no se observó lo mismo en las células que fueron tratadas con CYN 360 nM durante 6 h y que luego fueron incubadas en medio fresco hasta las 24 y 48 h. En este último caso, ante una inhibición de síntesis proteica irreversible, se esperaría que la síntesis proteica a las 24 y 48 h se mantuviese nula, sin embargo como muestran los experimentos realizados, la síntesis a estos tiempos fue similar (o ligeramente menor) a la observada en los cultivos control. Esto indica

que la activación metabólica producida por CYN puede ser necesaria para posibilitar la inhibición irreversible de síntesis proteica.

4.2.3-El estrés oxidativo está involucrado en la citotoxicidad de CYN en H.P.

Son varios los trabajos publicados que afirman que tras exponer diversos tipos celulares y modelos animales a CYN se reducen los niveles y la síntesis de glutatión [146, 148, 195], según Norris *et al.*, *in vivo* esta disminución no contribuye significativamente a la toxicidad aguda de CYN [148]. Otros autores (que también observaron mermas de al menos un 50% en los niveles de glutatión en todas las condiciones estudiadas) para evaluar el probable incremento de estrés oxidativo en la célula emplearon malondialdehído como indicador del mismo, y no observaron cambio significativo en los niveles de estrés oxidativo en H.P. de ratón tratados con CYN. Por esto consideran improbable que la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) medie en la citotoxicidad asociada a CYN. Sin embargo, ellos emplearon dosis muy superiores (CYN 5 μ M) a las empleadas en nuestro trabajo, utilizando incubaciones de 12 h, y en estas condiciones, las células sufrieron muerte por necrosis. [145]. En nuestros experimentos, cuando determinamos la presencia ROS en las células tratadas con CYN se observó un incremento de este indicador de estrés oxidativo. Las ROS aumentaron de un modo dependiente de la concentración de la toxina y del tiempo de exposición a la misma. De igual modo, se observa la activación de la respuesta antioxidante celular, tendente a contrarrestar esta situación de estrés oxidativo a través de la inducción del factor de transcripción Nrf2, y la represión de la transcripción de Keap1 (inhibidor de Nrf2). Como consecuencia, se observa un aumento en la concentración intracelular de Nrf2. Para determinar si el estrés oxidativo observado estaba involucrado en la muerte de los H.P. se utilizó resveratrol, una molécula conocida por sus propiedades citoprotectoras frente al estrés oxidativo en diversos cultivos celulares incluyendo los H.P. [196, 197]. Este compuesto protegió

parcialmente a las células tratadas con CYN. La citoprotección observada fue dosis dependiente, al menos durante las primeras 24 h. Sin embargo a las 48 h la actividad citoprotectora fue menor. Nuestro trabajo indica que el estrés oxidativo está involucrado en la citotoxicidad inducida por la CYN sobre H.P. de rata. Esta diferencia con los trabajos realizados por otros autores que se mencionan más arriba podría ser debida a las diferentes concentraciones de toxina empleadas. Menores concentraciones de CYN durante periodos de incubación más largos inducen apoptosis, mientras que mayores concentraciones parecen producir necrosis, en cuyo caso el daño a la célula podría ser de tal magnitud que la muerte se produce en un corto periodo de tiempo sin dar opción a que se observe estrés oxidativo, o que este estrés oxidativo sea irrelevante con respecto a otros procesos lesivos.

CONCLUSIONES

5-CONCLUSIONES

5.1-Conclusiones del estudio del AO y la DTX-2 en células hepáticas:

- A. El ácido okadaico y la dinofisistoxina-2 son equipotentes en cultivos de hepatocitos transformados de rata (células Clone 9), pero el ácido okadaico es más tóxico que la dinofisistoxina-2 en células de hepatoma humano (células HepG2) y en H.P. de rata.
- B. Los resultados de viabilidad obtenidos en líneas celulares indican que estas no son el mejor modelo predictivo de toxicidad relativa, al menos para las moléculas evaluadas.
- C. Los cultivos de hepatocitos primarios mostraron una sensibilidad frente el ácido okadaico y la dinofisistoxina-2 similar a la observada in vivo después de administración intraperitoneal.
- D. En células Clone 9 el ácido okadaico y la dinofisistoxina-2 indujeron alteraciones en la segregación de los cromosomas, generando husos mitóticos aberrantes y consecuentemente mitosis aberrantes.
- E. En células HepG2 y H.P. proliferantes no se observaron fallos en la mitosis pero las toxinas inhibieron el ciclo celular en fase G0/G1.
- F. Las dos toxinas estudiadas indujeron la sobre expresión de las ciclinas A, B, y D en células Clone 9, mientras que en las células HepG2 regularon positivamente la ciclina D y negativamente las ciclinas A2 y B1. Estas alteraciones se vieron reflejadas en la inhibición del ciclo celular de las células Clone 9 en fase G2 y de las células HepG2 en la fase G0/G1.
- G. En H.P. proliferantes, ambas toxinas inhibieron el ciclo celular en G0/G1 previniendo el incremento en la expresión de p53 inducida por los mitógenos, y siendo el efecto del ácido okadaico mayor que el de la Dinofisistoxina-2.

H. En las células Clone 9 tratadas se observa como p53 migra al núcleo, sin embargo en HepG2 no se observa diferencia en la sub localización celular de p53 al comparar las células tratadas respecto a los cultivos control.

5.2-Conclusiones del estudio CYN sobre H.P. de rata.

I. A concentraciones nanomolares, la CYN es tóxica para H.P. de rata induciendo:

- i. Inhibición de la síntesis de proteínas
- ii. Inhibición del ciclo celular
- iii. Aumento en las especies reactivas del oxígeno
- iv. Activación de la respuesta antioxidante celular
- v. Apoptosis

J. El estrés oxidativo está involucrado en la muerte celular inducida por cilindrospermopsina.

K. La inhibición de la síntesis de proteínas en H.P. tratados con CYN a concentraciones nanomolares es total e irreversible

L. La activación metabólica de CYN puede ser necesaria para la inhibición de la síntesis proteica y la consecuente citotoxicidad, aunque esta hipótesis requiere confirmación experimental.

BIBLIOGRAFÍA

6-BIBLIOGRAFÍA

1. Barange M., Field J., Harris R., Hofmann E., Perry R., and Werner F., *Marine Ecosystems and Global Change*. 2010, Oxford: Oxford University Press.
2. Nicolaou K.C., Frederick M.O., and Aversa R.J., *The continuing saga of the marine polyether biotoxins*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. **47**(38): p. 7182-225.
3. Mayer A.M. and Gustafson K.R., *Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds*. *Int J Cancer*, 2003. **105**(3): p. 291-9.
4. Mayer A.M. and Lehmann V.K., *Marine pharmacology in 1999: antitumor and cytotoxic compounds*. *Anticancer Res*, 2001. **21**(4A): p. 2489-500.
5. Yasumoto T., *The chemistry and biological function of natural marine toxins*. *Chem Rec*, 2001. **1**(3): p. 228-42.
6. Torres Y.R., Berlinck R.G., Nascimento G.G., Fortier S.C., Pessoa C., and de Moraes M.O., *Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis**. *Toxicon*, 2002. **40**(7): p. 885-91.
7. Burja A.M., Banaigs B., Abou-Mansour E., Grant Burgess J., and Wright P.C., *Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products*. *Tetrahedron*, 2001. **57**(46): p. 9347-9377.
8. Volk R.-B. and Furkert F.H., *Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth*. *Microbiological Research*, 2006. **161**(2): p. 180-186.
9. Yasuhara-Bell J. and Lu Y., *Marine compounds and their antiviral activities*. *Antiviral Research*, 2010. **86**(3): p. 231-240.

10. Leary D., Vierros M., Hamon G., Arico S., and Monagle C., *Marine genetic resources: A review of scientific and commercial interest*. Marine Policy, 2009. **33**(2): p. 183-194.
11. Cardozo K.H.M., Guaratini T., Barros M.P., Falcão V.R., Tonon A.P., Lopes N.P., Campos S., Torres M.A., Souza A.O., Colepicolo P., and Pinto E., *Metabolites from algae with economical impact*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2007. **146**(1–2): p. 60-78.
12. Smetacek V., *A watery arms race*. Nature, 2001. **411**(6839): p. 745.
13. Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D., and Enevoldsen H.O., *Manual on harmful marine microalgae*. 1 ed. Monographs on oceanographic methodology. 2003, Paris: UNESCO. 793.
14. Geraci J.R., Anderson D.M., Timperi R.J., St. Aubin D.J., Early G.A., Prescott J.H., and Mayo C.A., *Humpback Whales (Megaptera novaeangliae) Fatally Poisoned by Dinoflagellate Toxin*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1989. **46**(11): p. 1895-1898.
15. Saker M.L., Nogueira I.C., Vasconcelos V.M., Neilan B.A., Eaglesham G.K., and Pereira P., *First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters*. Ecotoxicol Environ Saf, 2003. **55**(2): p. 243-50.
16. Thomas A.D., Saker M.L., Norton J.H., and Olsen R.D., *Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northern Queensland*. Aust Vet J, 1998. **76**(9): p. 592-4.
17. Pitois S., Jackson M., and Wood B., *Problems associated with the presence of cyanobacteria in recreational and drinking water*. Int J Environ Health Res, 2000. **10**: p. 203 - 218.
18. Winder M. and Cloern J.E., *The annual cycles of phytoplankton biomass*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2010. **365**(1555): p. 3215-3226.

19. Chorus I. and Bartman J., *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.*, ed. I. Chorus and J. Bartman. 1999, London and New York: E & FN Spon.
20. Miraglia M., Marvin H.J., Kleter G.A., Battilani P., Brera C., Coni E., Cubadda F., Croci L., De Santis B., Dekkers S., Filippi L., Hutjes R.W., Noordam M.Y., Pisante M., Piva G., Prandini A., Toti L., van den Born G.J., and Vespermann A., *Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe*. Food Chem Toxicol, 2009. **47**(5): p. 1009-21.
21. Maestrini S. and Graneli E., *Environmental-conditions and ecophysiological mechanisms which led to the 1988 chrysochromulina-polylepis bloom - an hypothesis*. Oceanologica Acta (0399-1784), 1991. **14**(4): p. 397-413.
22. Smayda T.J., *Novel and Nuisance Phytoplankton Blooms in the Sea: Evidence for a Global Epidemic*. 1990: RWS-North Sea Directorate.
23. Sobel J. and Painter J., *Illnesses caused by marine toxins*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(9): p. 1290-6.
24. Smayda T., *Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea*. Asociation for the Sciences of Limnology and Oceanography, 1997. **49**: p. 1137-1153.
25. Daranas A.H., Norte M., and Fernández J.J., *Toxic marine microalgae*. Toxicon, 2001. **39**(8): p. 1101-1132.
26. Hallegraeff G.M., *A review of harmful algal blooms and their apparent global increase**. Phycologia, 1993. **32**(2): p. 79-99.
27. Paerl H.W., Fulton R.S., 3rd, Moisander P.H., and Dyble J., *Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria*. ScientificWorldJournal, 2001. **1**: p. 76-113.
28. Wang D.Z., *Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review*. Mar Drugs, 2008. **6**(2): p. 349-71.

29. Botana L.E., *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology, and Detection*. Second ed, ed. L. Botana. 2008: CRC Press.
30. Meunier F.A., Mattei C., and Molgo J., *Marine toxins potently affecting neurotransmitter release*. Prog Mol Subcell Biol, 2009. **46**: p. 159-86.
31. Wiese M., D'Agostino P.M., Mihali T.K., Moffitt M.C., and Neilan B.A., *Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs*. Mar Drugs, 2010. **8**(7): p. 2185-211.
32. Clark R.F., Williams S.R., Nordt S.P., and Manoguerra A.S., *A review of selected seafood poisonings*. Undersea Hyperb Med, 1999. **26**(3): p. 175-84.
33. Botana L.M., Alfonso A., Botana A., Vieytes M.R., Vale C., Vilariño N., and Louzao C., *Functional assays for marine toxins as an alternative, high-throughput-screening solution to animal tests*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2009. **28**(5): p. 603-611.
34. Franchini A., Malagoli D., and Ottaviani E., *Targets and effects of yessotoxin, okadaic acid and palytoxin: a differential review*. Mar Drugs, 2010. **8**(3): p. 658-77.
35. Draisci R., Giannetti L., Lucentini L., Marchiafava C., James K.J., Bishop A.G., Healy B.M., and Kelly S.S., *Isolation of a new okadaic acid analogue from phytoplankton implicated in diarrhetic shellfish poisoning*. J Chromatogr A, 1998. **798**(1-2): p. 137-45.
36. Ten-Hage L., Delaunay N., Pichon V., Coute A., Puiseux-Dao S., and Turquet J., *Okadaic acid production from the marine benthic dinoflagellate *Prorocentrum arenarium* Faust (Dinophyceae) isolated from Europa Island coral reef ecosystem (SW Indian Ocean)*. Toxicon, 2000. **38**(8): p. 1043-54.
37. Yasumoto T., Seino N., Murakami Y., and Murata M., *Toxins produced by benthic dinoflagellates*. Biological Bulletin, 1987. **172**: p. 128-131.

38. Caroppo C., Congestri R., and Bruno M., *On the presence of Phalacroma rotundatum in the southern Adriatic Sea (Italy)*. Aquatic Microbial Ecology., 1995. **17**(3): p. 301-310.
39. Dominguez H.J., Paz B., Daranas A.H., Norte M., Franco J.M., and Fernandez J.J., *Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications*. Toxicon, 2010. **56**(2): p. 191-217.
40. Howard M.D.A., Silver M., and Kudela R.M., *Yessotoxin detected in mussel (Mytilus californicus) and phytoplankton samples from the U.S. west coast*. Harmful Algae, 2008. **7**(5): p. 646-652.
41. Pulido O.M., *Domoic acid toxicologic pathology: a review*. Mar Drugs, 2008. **6**(2): p. 180-219.
42. EFSA, *Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish - Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins)*. EFSA Journal, 2010.
43. Yokoyama A., Murata M., Oshima Y., Iwashita T., and Yasumoto T., *Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel agonist isolated from a marine dinoflagellate*. J Biochem, 1988. **104**(2): p. 184-7.
44. Watkins S.M., Reich A., Fleming L.E., and Hammond R., *Neurotoxic shellfish poisoning*. Mar Drugs, 2008. **6**(3): p. 431-55.
45. Mountfort D., Beuzenberg V., MacKenzie L., and Rhodes L., *Enhancement of growth and gymnodimine production by the marine dinoflagellate, Karenia selliformis*. Harmful Algae, 2006. **5**(6): p. 658-664.
46. Cuypers E., Abdel-Mottaleb Y., Kopljar I., Rainier J.D., Raes A.L., Snyders D.J., and Tytgat J., *Gambierol, a toxin produced by the dinoflagellate Gambierdiscus toxicus, is a potent blocker of voltage-gated potassium channels*. Toxicon, 2008. **51**(6): p. 974-83.

47. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Grauso L., and Tartaglione L., *A 4-decade-long (and still ongoing) hunt for palytoxins chemical architecture*. *Toxicon*, 2011. **57**(3): p. 362-7.
48. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., and Forino M., *Palytoxins: A still haunting Hawaiian curse*. *Phytochemistry Reviews*, 2010. **9**(4): p. 491-500.
49. Ramos V. and Vasconcelos V., *Palytoxin and analogs: biological and ecological effects*. *Mar Drugs*, 2010. **8**(7): p. 2021-37.
50. Louzao M.C., Ares I.R., and Cagide E., *Marine toxins and the cytoskeleton: a new view of palytoxin toxicity*. *FEBS J*, 2008. **275**(24): p. 6067-74.
51. Tubaro A., Durando P., Del Favero G., Ansaldi F., Icardi G., Deeds J.R., and Sosa S., *Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure*. *Toxicon*, 2011. **57**(3): p. 478-95.
52. Taniyama S., Mahmud Y., Terada M., Takatani T., Arakawa O., and Noguchi T., *Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan*. *J Nat Toxins*, 2002. **11**(4): p. 277-82.
53. Furey A., O'Doherty S., O'Callaghan K., Lehane M., and James K.J., *Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: Toxicological and health considerations*. *Toxicon*, 2010. **56**(2): p. 173-190.
54. Hwang D.F. and Noguchi T., *Tetrodotoxin poisoning*. *Adv Food Nutr Res*, 2007. **52**: p. 141-236.
55. Narahashi T., *Tetrodotoxin—A brief history—*. Japan Academy, 2008. **5**.
56. Pratheepa V. and Vasconcelos V., *Microbial diversity associated with tetrodotoxin production in marine organisms*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, (0).
57. Pearson L., Mihali T., Moffitt M., Kellmann R., and Neilan B., *On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin*. *Mar Drugs*, 2010. **8**(5): p. 1650-80.

58. Hitzfeld B.C., Hoger S.J., and Dietrich D.R., *Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment*. Environ Health Perspect, 2000. **108 Suppl 1**: p. 113-22.
59. Duy T.N., Lam P.K., Shaw G.R., and Connell D.W., *Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water*. Rev Environ Contam Toxicol, 2000. **163**: p. 113-85.
60. Sivonen K., Kononen K., Carmichael W., Dahlem A., Rinehart K., Kiviranta J., and Niemela S., *Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium Nodularia spumigena in the Baltic Sea and structure of the toxin*. Applied and Environmental Microbiology, 1989. **5(8)**: p. 1999-1995.
61. Runnegar M.T., Xie C., Snider B.B., Wallace G.A., Weinreb S.M., and Kuhlenskamp J., *In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues*. Toxicol Sci, 2002. **67(1)**: p. 81-7.
62. Araoz R., Molgo J., and Tandeau de Marsac N., *Neurotoxic cyanobacterial toxins*. Toxicon, 2010. **56(5)**: p. 813-28.
63. Dittmann E., Fewer D.P., and Neilan B.A., *Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots*. FEMS Microbiol Rev, 2013. **37(1)**: p. 23-43.
64. Nakagawa Y., Yanagita R.C., Hamada N., Murakami A., Takahashi H., Saito N., Nagai H., and Irie K., *A simple analogue of tumor-promoting aplysiatoxin is an antineoplastic agent rather than a tumor promoter: development of a synthetically accessible protein kinase C activator with bryostatin-like activity*. J Am Chem Soc, 2009. **131(22)**: p. 7573-9.
65. Stewart I., Schluter P., and Shaw G., *Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review*. Environmental Health: A Global Access Science Source, 2006. **5(1)**: p. 7.

66. Chorus I., Falconer I.R., Salas H.J., and Bartram J., *Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2000. **3**(4): p. 323-47.
67. Chorus I. and Fastner J., *Recreational exposure to cyanotoxins*. Cyanotoxins - occurrence, causes, consequences, 2001: p. 190 - 199.
68. Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Sano M., Matsumoto G.K., and Clardy J., *Diarrhetic shellfish toxins*. Tetrahedron, 1985. **41**(6): p. 1019-1025.
69. Yasumoto T., Oshima Y., and Yamaguchi M., *Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district*. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries., 1978. **44**: p. 1249-1255.
70. Aune T. and Yndestad M., *Diarrhetic shellfish poisoning*, in *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, I.R. Falconer, Editor. 1993, Elsevier Science: London, UK. p. 87-104.
71. Fernandez M.L., Miguez A., Cacho E., and Martinez A., *Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels*. Toxicon, 1996. **34**(3): p. 381-7.
72. Ahmed Z., Sarker M., and Sack D., *Protection of adult rabbits and monkeys from lethal shigellosis by oral immunization with a thymine-requiring and temperature-sensitive mutant of Shigella flexneri Y*. Vaccine, 1990. **8**: p. 153 - 158.
73. Vale P. and de M.S.M.A., *First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (Solen marginatus) and green crabs (Carcinus maenas) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton*. Toxicon, 2002. **40**(7): p. 989-96.
74. Vale P. and Sampayo M.A., *Dinophysistoxin-2: a rare diarrhoeic toxin associated with Dinophysis acuta*. Toxicon, 2000. **38**(11): p. 1599-606.
75. Moroño A., Arévalo F., Fernández M.L., Maneiro J., Pazos Y., Salgado C., and Blanco J., *Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels Mytilus*

- galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. Aquatic Toxicology, 2003. **62**(4): p. 269-280.
76. Carmody E.P., James K.J., and Kelly S.S., *Dinophysistoxin-2: the predominant diarrhoeic shellfish toxin in Ireland*. Toxicon, 1996. **34**(3): p. 351-9.
77. Aune T., Larsen S., Aasen J.A.B., Rehmann N., Satake M., and Hess P., *Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice*. Toxicon, 2007. **49**(1): p. 1-7.
78. CSID:23076274 h.w.c.c.C.-S.h.a., Aug 9, 2013).
79. Tachibana K., Scheuer P.J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Van Engen D., Clardy J., Gopichand Y., and Schmitz F.J., *Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus Halichondria*. Journal of the American Chemical Society, 1981. **103**(9): p. 2469-2471.
80. Hu T., Doyle J., Jackson D., Marr J., Nixon E., Pleasance S., Quilliam M.A., Walter J.A., and Wright J.L.C., *Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1992. **0**(1): p. 39-41.
81. Viviani R., *Eutrophication, marine biotoxins, human health*. Sci Total Environ, 1992. **Suppl**: p. 631-62.
82. Dickey R.W., Bobzin S.C., Faulkner D.J., Bencsath F.A., and Andrzejewski D., *Identification of okadaic acid from a Caribbean dinoflagellate, Prorocentrum concavum*. Toxicon, 1990. **28**(4): p. 371-377.
83. Van Egmond H., Aune T., Lassus P., Speijers G., and Waldock M., *Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation*. J. Nat. Toxins, 1993. **2**: p. 41-83.
84. Van Apeldoorn M., *Diarrhoeic shellfish poisoning: A review*. 1998, RIVM/CSR.
85. Haamer J., *Presence of the phycotoxin okadaic acid in mussels (Mytilus edulis) in relation to nutrient composition in Swedish coastal water*. J. Shellfish Res, 1995. **14**: p. 209-216.

86. Sedmak B. and Fanuko N., *Occurrence of Dinophysis spp. and toxic shellfish in the Northern Adriatic*. Journal of Applied Phycology, 1991. **3**(4): p. 289-294.
87. Blanco J., Fernández M., Míguez A., and Moroño A., *Okadaic acid depuration in the mussel Mytilus galloprovincialis: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions*. Marine Ecology Progress Series, 1999. **176**: p. 153-163.
88. Whittle K. and Gallacher S., *Marine toxins*. British Medical Bulletin, 2000. **56**(1): p. 236-253.
89. Bialojan C. and Takai A., *Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics*. Biochem J, 1988. **256**(1): p. 283-90.
90. Fujiki H. and Suganuma M., *Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters*. J Cancer Res Clin Oncol, 1999. **125**(3-4): p. 150-5.
91. Le Hegarat L., Jacquin A.G., Bazin E., and Fessard V., *Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid, in human Caco-2 cells and in mice gut cells*. Environ Toxicol, 2006. **21**(1): p. 55-64.
92. Tubaro A., Sosa S., Altinier G., Soranzo M.R., Satake M., Della Loggia R., and Yasumoto T., *Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice*. Toxicon, 2004. **43**(4): p. 439-45.
93. Tubaro A., Sosa S., Carbonatto M., Altinier G., Vita F., Melato M., Satake M., and Yasumoto T., *Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice*. Toxicon, 2003. **41**(7): p. 783-92.
94. EU-NRL, *Minutes of the 4th meeting of EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins*. 2001: Vigo, Spain. p. 29-31.
95. Matias W.G., Traore A., and Creppy E.E., *Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome*. Human & Experimental Toxicology, 1999. **18**(5): p. 345-350.

96. Matias W.G. and Creppy E.E., *Transplacental passage of [3H]-okadaic acid in pregnant mice measured by radioactivity and high-performance liquid chromatography*. Hum Exp Toxicol, 1996. **15**(3): p. 226-30.
97. Anonymous, *Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Molluscan Bivalves*. 2005, Food and Agriculture Organization.: Oslo, Norway. p. 33.
98. Ito E. and Terao K., *Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds*. Nat Toxins, 1994. **2**(6): p. 371-7.
99. Ito E., Yasumoto T., Takai A., Imanishi S., and Harada K., *Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method*. Toxicol, 2002. **40**(2): p. 159-65.
100. Berven G., Saetre F., Halvorsen K., and Seglen P.O., *Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionality of rat liver and intestinal cells*. Toxicol, 2001. **39**(2-3): p. 349-62.
101. Matias W. and Creppy E., *Evidence for enterohepatic circulation of okadaic acid in mice*. Toxic Substance Mechanism, 1996b. **15**: p. 405-414.
102. Franchinia A., Marchesini E., Poletti R., and Ottaviani E., *Swiss mice CD1 fed on mussels contaminated by okadaic acid and yessotoxins: effects on thymus and spleen*. Eur J Histochem, 2005. **49**(2): p. 179-88.
103. Tubaro S., Sosa S., Bornancin A., and Hungerford J., *Pharmacology and Toxicology of Diarrhetic Shellfish Toxins.*, in *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology, and Detection.*, L. Botana, Editor. 2008, CRC Press. p. 229-253.
104. Fessard V., Grosse Y., Pfohl-Leszkowicz A., and Puiseux-Dao S., *Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes*. Mutat Res, 1996. **361**(2-3): p. 133-41.

105. Fujiki H., Sueoka E., Komori A., and Suganuma M., *Tumor promotion and TNF- α gene expression by the okadaic acid class tumor promoters*. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 1997. **15**(1): p. 1-40.
106. Suganuma M., Tatematsu M., Yatsunami J., Yoshizawa S., Okabe S., Uemura D., and Fujiki H., *An alternative theory of tissue specificity by tumor promotion of okadaic acid in glandular stomach of SD rats*. Carcinogenesis, 1992. **13**(10): p. 1841-5.
107. Fujiki H. and Suganuma M., *Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds*. Adv Cancer Res, 1993. **61**: p. 143-94.
108. Fujiki H., Suganuma M., Suguri H., Yoshizawa S., Takagi K., Uda N., Wakamatsu K., Yamada K., Murata M., Yasumoto T., and et al., *Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin*. Jpn J Cancer Res, 1988. **79**(10): p. 1089-93.
109. Suganuma M., Okabe S., Sueoka E., Nishiwaki R., Komori A., Uda N., Isono K., and Fujiki H., *Tautomycin: an inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A but not a tumor promoter on mouse skin and in rat glandular stomach*. J Cancer Res Clin Oncol, 1995. **121**(9-10): p. 621-7.
110. Munday R., *Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic Acid in animals?* Toxins (Basel), 2013. **5**(2): p. 267-85.
111. Repeto-Jimenez M. and Repeto-Kuhn G., *Toxicología fundamental*. 4 ed, ed. E.D. Santos. 2009. 620.
112. Perez-Gomez A., Garcia-Rodriguez A., James K.J., Ferrero-Gutierrez A., Novelli A., and Fernandez-Sanchez M.T., *The marine toxin dinophysistoxin-2 induces differential apoptotic death of rat cerebellar neurons and astrocytes*. Toxicol Sci, 2004. **80**(1): p. 74-82.

113. Toyofuku H., *Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report)*. Marine Pollution Bulletin, 2006. **52**(12): p. 1735-1745.
114. Miller A.P. and Tisdale E.S., *Public Health Engineering: Epidemic of Intestinal Disorders in Charlestown, W. Va., Occurring Simultaneously with Unprecedented Water Supply Conditions*. Am J Public Health Nations Health, 1931. **21**(2): p. 198-200.
115. Zegura B., Straser A., and Filipic M., *Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review*. Mutat Res, 2011. **727**(1-2): p. 16-41.
116. Honkanen R.E., Zwiller J., Moore R.E., Daily S.L., Khatra B.S., Dukelow M., and Boynton A.L., *Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases*. J Biol Chem, 1990. **265**(32): p. 19401-4.
117. Carmichael W., *Freshwater blue-green algae (cyanobacteria) toxins - a review*. The water environment - Algal toxins and health, 1981: p. 1 - 13.
118. Yu S.Z., *Primary prevention of hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol Hepatol, 1995. **10**(6): p. 674-82.
119. Jochimsen E.M., Carmichael W.W., An J.S., Cardo D.M., Cookson S.T., Holmes C.E., Antunes M.B., de Melo Filho D.A., Lyra T.M., Barreto V.S., Azevedo S.M., and Jarvis W.R., *Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil*. N Engl J Med, 1998. **338**(13): p. 873-8.
120. Chiswell R.K., Shaw G.R., Eaglesham G., Smith M.J., Norris R.L., Seawright A.A., and Moore M.R., *Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, Cylindrospermopsis raciborskii: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition*. Environmental Toxicology, 1999. **14**(1): p. 155-161.
121. Shaw G.R., Seawright A.A., Moore M.R., and Lam P.K., *Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity*. Ther Drug Monit, 2000. **22**(1): p. 89-92.

122. CSID:26396261 h.w.c.c.C.-S.h.a., Aug 9, 2013).
123. Ohtani I., Moore R., and Runnegar M., *Cylindrospermopsin: A Potent Hepatotoxin from the Blue-Green Alga Cylindrospermopsis raciborskii*. Journal of American Chemical Society., 1992. **114**: p. 7941-7942.
124. Kinnear S., *Cylindrospermopsin: a decade of progress on bioaccumulation research*. Mar Drugs, 2010. **8**(3): p. 542-64.
125. Stüken A., Rücker J., Endrulat T., Preussel K., Hemm M., Nixdorf B., Karsten U., and Wiedner C., *Distribution of three alien cyanobacterial species (Nostocales) in northeast Germany: Cylindrospermopsis raciborskii, Anabaena bergii and Aphanizomenon aphanizomenoides*. Phycologia, 2006. **45**(6): p. 696-703.
126. Bonilla S., Aubriot L., Soares M.C., Gonzalez-Piana M., Fabre A., Huszar V.L., Lurling M., Antoniadou D., Padisak J., and Kruk C., *What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria Planktothrix agardhii and Cylindrospermopsis raciborskii?* FEMS Microbiol Ecol, 2012. **79**(3): p. 594-607.
127. Rucker J., Stuken A., Nixdorf B., Fastner J., Chorus I., and Wiedner C., *Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenon-dominated temperate lakes*. Toxicon, 2007. **50**(6): p. 800-9.
128. Gugger M., Molica R., Le Berre B., Dufour P., Bernard C., and Humbert J.F., *Genetic diversity of Cylindrospermopsis strains (cyanobacteria) isolated from four continents*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(2): p. 1097-100.
129. Berry J.P. and Lind O., *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, 2010. **55**(5): p. 930-8.
130. Saker M.L. and Eaglesham G.K., *The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii in tissues of the Redclaw crayfish Cherax quadricarinatus*. Toxicon, 1999. **37**(7): p. 1065-77.

131. Saker M.L., Metcalf J.S., Codd G.A., and Vasconcelos V.M., *Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel Anodonta cygnea*. *Toxicon*, 2004. **43**(2): p. 185-94.
132. Byth S., *Palm Island mystery disease*. *Med J Aust*, 1980. **2**(1): p. 40, 42.
133. Griffiths D.J. and Saker M.L., *The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin*. *Environ Toxicol*, 2003. **18**(2): p. 78-93.
134. Hawkins P.R., Runnegar M.T., Jackson A.R., and Falconer I.R., *Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir*. *Appl Environ Microbiol*, 1985. **50**(5): p. 1292-5.
135. Saker M., Thomas A., and Norton J., *Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of north Queensland*. *Environ Toxicol*, 1999. **14**: p. 179 - 182.
136. Bazin E., Huet S., Jarry G., Hegarat L.L., Munday J.S., Humpage A.R., and Fessard V., *Cytotoxic and genotoxic effects of cylindrospermopsin in mice treated by gavage or intraperitoneal injection*. *Environ Toxicol*, 2010. **27**(5): p. 277-284.
137. Falconer I.R., Hardy S.J., Humpage A.R., Froscio S.M., Tozer G.J., and Hawkins P.R., *Hepatic and Renal Toxicity of the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in Male Swiss Albino Mice*. *Environ Toxicol*, 1999. **14**(1): p. 143-150.
138. Hawkins P., Runnegar M., Jackson A., and Falconer I., *Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir*. *Appl Environ Microbiol*, 1985. **50**: p. 1292 - 1295.

139. Terao K., Ohmori S., Igarashi K., Ohtani I., Watanabe M.F., Harada K.I., Ito E., and Watanabe M., *Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga Umezakia natans*. *Toxicon*, 1994. **32**(7): p. 833-43.
140. Rogers E.H., Zehr R.D., Gage M.I., Humpage A.R., Falconer I.R., Marr M., and Chernoff N., *The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation*. *Toxicon*, 2007. **49**(6): p. 855-64.
141. Young F.M., Micklem J., and Humpage A.R., *Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells in vitro*. *Reprod Toxicol*, 2008. **25**(3): p. 374-80.
142. Falconer I.R. and Humpage A.R., *Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins*. *Environ Toxicol*, 2006. **21**(4): p. 299-304.
143. Seawright A., Nolan C., Shaw G., Chiswell R., Norris R., Moore M., and Smith M., *The Oral Toxicity for Mice of the Tropical Cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynsk)*. *Environmental Toxicology*, 1999. **14**(1): p. 135-142.
144. Chong M.W., Wong B.S., Lam P.K., Shaw G.R., and Seawright A.A., *Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytotoxin in primary rat hepatocytes*. *Toxicon*, 2002. **40**(2): p. 205-11.
145. Humpage A.R., Fontaine F., Froschio S., Burcham P., and Falconer I.R., *Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress*. *J Toxicol Environ Health A*, 2005. **68**(9): p. 739-53.
146. Runnegar M.T., Kong S.M., Zhong Y.Z., and Lu S.C., *Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes*. *Biochem Pharmacol*, 1995. **49**(2): p. 219-25.
147. Froschio S.M., Humpage A.R., Burcham P.C., and Falconer I.R., *Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation*

- from acute toxicity in mouse hepatocytes*. Environ Toxicol, 2003. **18**(4): p. 243-51.
148. Norris R.L., Seawright A.A., Shaw G.R., Senogles P., Eaglesham G.K., Smith M.J., Chiswell R.K., and Moore M.R., *Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin in vivo in the mouse*. Toxicol, 2002. **40**(4): p. 471-6.
149. Humpage A.R., Fenech M., Thomas P., and Falconer I.R., *Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2000. **472**(1-2): p. 155-161.
150. Maire M.A., Bazin E., Fessard V., Rast C., Humpage A.R., and Vasseur P., *Morphological cell transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells by the cyanotoxin, cylindrospermopsin*. Toxicol, 2010. **55**(7): p. 1317-22.
151. Straser A., Filipic M., and Zegura B., *Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line*. Arch Toxicol, 2011. **85**(12): p. 1617-26.
152. Hall J.E. and Guyton A.C., *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 2011, Philadelphia, Pa.: Saunders/Elsevier.
153. Kmiec Z., *Cooperation of liver cells in health and disease*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2001. **161**: p. III-XIII, 1-151.
154. Diogene G., Fessard V., Dubreuil A., and Puisieux-Dao S., *Comparative studies of the actin cytoskeleton response to maitotoxin and okadaic acid*. Toxicol In Vitro, 1995. **9**(1): p. 1-10.
155. Huynh-Delerme C., Fessard V., Kiefer-Biasizzo H., and Puisieux-Dao S., *Characteristics of okadaic acid--induced cytotoxic effects in CHO K1 cells*. Environ Toxicol, 2003. **18**(6): p. 383-94.
156. Leira F., Alvarez C., Vieites J.M., Vieytes M.R., and Botana L.M., *Study of cytoskeletal changes induced by okadaic acid in BE(2)-M17 cells by means of a*

- quantitative fluorimetric microplate assay*. *Toxicol In Vitro*, 2001. **15**(4-5): p. 277-82.
157. Tubaro A., Florio C., Luxich E., Sosa S., Della Loggia R., and Yasumoto T., *A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels*. *Toxicon*, 1996. **34**(7): p. 743-52.
158. Laptenko O. and Prives C., *Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(6): p. 951-61.
159. Brooks C.L. and Gu W., *Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(2): p. 164-71.
160. Marchenko N.D., Zaika A., and Moll U.M., *Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(21): p. 16202-12.
161. Sansome C., Zaika A., Marchenko N.D., and Moll U.M., *Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells*. *FEBS Lett*, 2001. **488**(3): p. 110-5.
162. Moll U.M., Marchenko N., and Zhang X.K., *p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction*. *Oncogene*, 2006. **25**(34): p. 4725-43.
163. Arima Y., Nitta M., Kuninaka S., Zhang D., Fujiwara T., Taya Y., Nakao M., and Saya H., *Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(19): p. 19166-76.
164. Dumont P., Leu J.I., Della Pietra A.C., 3rd, George D.L., and Murphy M., *The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential*. *Nat Genet*, 2003. **33**(3): p. 357-65.
165. Leu J.I., Dumont P., Hafey M., Murphy M.E., and George D.L., *Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(5): p. 443-50.

166. Yamaguchi H., Chen J., Bhalla K., and Wang H.G., *Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubule-damaging agents by p53 transcription-dependent and -independent pathways*. J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39431-7.
167. Zhao Y., Chaiswing L., Velez J.M., Batinic-Haberle I., Colburn N.H., Oberley T.D., and St Clair D.K., *p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3745-50.
168. Eckl P. and Bresgen N., *The cultured primary hepatocyte and its application in toxicology*. Journal of Applied Biomedicine, 2003. **1**(No. 3): p. 117-126.
169. Mellgren G., Vintermyr O.K., Boe R., and Doskeland S.O., *Hepatocyte DNA replication is abolished by inhibitors selecting protein phosphatase 2A rather than phosphatase 1*. Exp Cell Res, 1993. **205**(2): p. 293-301.
170. Mellgren G., Vintermyr O.K., and Doskeland S.O., *Okadaic acid, cAMP, and selected nutrients inhibit hepatocyte proliferation at different stages in G1: modulation of the cAMP effect by phosphatase inhibitors and nutrients*. J Cell Physiol, 1995. **163**(2): p. 232-40.
171. Guidotti J.E., Bregerie O., Robert A., Debey P., Brechot C., and Desdouets C., *Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19095-101.
172. Sanchez I. and Dynlacht B.D., *New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(3): p. 311-21.
173. Haesslein J.L. and Jullian N., *Recent advances in cyclin-dependent kinase inhibition. Purine-based derivatives as anti-cancer agents. Roles and perspectives for the future*. Curr Top Med Chem, 2002. **2**(9): p. 1037-50.
174. Aragón Mamani Z., Xiomara Bonkanka Tabares C., Gallardo Naranjo J., García Velázquez D., and Medina Campos M.C., *Luces y Sombras en el Uso de*

- Quinasas Dependientes de Ciclinas como Dianas Terapéuticas en Cáncer.* Biocancer, 2006. **3**.
175. Malumbres M. and Barbacid M., *Mammalian cyclin-dependent kinases.* Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(11): p. 630-641.
176. Kimura S.H., Ikawa M., Ito A., Okabe M., and Nojima H., *Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery.* Oncogene, 2001. **20**(25): p. 3290-300.
177. Kong M., Barnes E.A., Ollendorff V., and Donoghue D.J., *Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction.* EMBO J, 2000. **19**(6): p. 1378-88.
178. Shao L., Hittelman W.N., Lin J., Yang H., Ajani J.A., and Wu X., *Deficiency of cell cycle checkpoints and DNA repair system predispose individuals to esophageal cancer.* Mutat Res, 2006. **602**(1-2): p. 143-50.
179. Rudner A.D. and Murray A.W., *The spindle assembly checkpoint.* Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(6): p. 773-80.
180. Xu B., Kim S., and Kastan M.B., *Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(10): p. 3445-50.
181. Branzei D. and Foiani M., *Regulation of DNA repair throughout the cell cycle.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(4): p. 297-308.
182. Warrenner R., Beamish H., Burgess A., Waterhouse N.J., Giles N., Fairlie D., and Gabrielli B., *Tumor cell-selective cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints.* FASEB J, 2003. **17**(11): p. 1550-2.
183. Castedo M., Perfettini J.L., Roumier T., Andreau K., Medema R., and Kroemer G., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition.* Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2825-37.

184. Chen B., Cheng M., Hong D.J., Sun F.Y., and Zhu C.Q., *Okadaic acid induced cyclin B1 expression and mitotic catastrophe in rat cortex*. *Neurosci Lett*, 2006. **406**(3): p. 178-82.
185. Cardoso M.C., Leonhardt H., and Nadal-Ginard B., *Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication*. *Cell*, 1993. **74**(6): p. 979-92.
186. Traore A., Baudrimont I., Ambaliou S., Dano S.D., and Creppy E.E., *DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco-2 cells, a human colonic epithelial cell line*. *Arch Toxicol*, 2001. **75**(2): p. 110-7.
187. Inoue Y., Tomiya T., Yanase M., Arai M., Ikeda H., Tejima K., Ogata I., Kimura S., Omata M., and Fujiwara K., *p53 May positively regulate hepatocyte proliferation in rats*. *Hepatology*, 2002. **36**(2): p. 336-44.
188. Wierod L., Rosseland C.M., Lindeman B., Oksvold M.P., Grosvik H., Skarpen E., and Huitfeldt H.S., *Activation of the p53-p21(Cip1) pathway is required for CDK2 activation and S-phase entry in primary rat hepatocytes*. *Oncogene*, 2008. **27**(19): p. 2763-71.
189. Akoumianaki T., Kardassis D., Polioudaki H., Georgatos S.D., and Theodoropoulos P.A., *Nucleocytoplasmic shuttling of soluble tubulin in mammalian cells*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 8): p. 1111-8.
190. Majno G. and Joris I., *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. *Am J Pathol*, 1995. **146**(1): p. 3-15.
191. Kornberg R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. *Science*, 1974. **184**(4139): p. 868-71.
192. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., and Reutelingsperger C., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. *J Immunol Methods*, 1995. **184**(1): p. 39-51.

193. Weedon D., Searle J., and Kerr J.F., *Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology*. Am J Dermatopathol, 1979. **1**(2): p. 133-44.
194. Bazin E., Mouroit A., Humpage A.R., and Fessard V., *Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG*. Environ Mol Mutagen, 2010. **51**(3): p. 251-9.
195. Runnegar M.T., Kong S.M., Zhong Y.Z., Ge J.L., and Lu S.C., *The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **201**(1): p. 235-41.
196. de la Lastra C.A. and Villegas I., *Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): p. 1156-60.
197. Rubiolo J.A. and Vega F.V., *Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species*. Biomed Pharmacother, 2008. **62**(9): p. 606-12.

