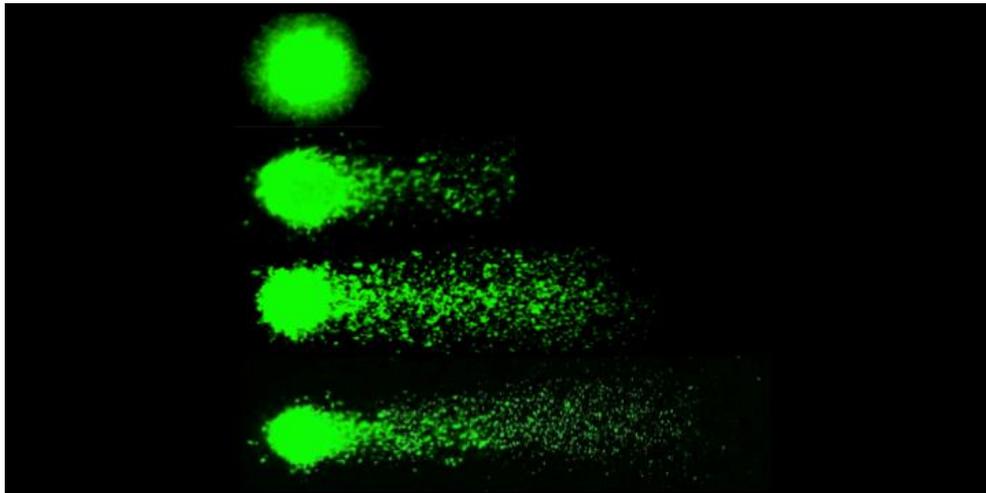




TRABAJO FIN DE GRADO
“DETERMINACIÓN DEL DAÑO
GENOTÓXICO Y OXIDATIVO EN EL
ADN DE CÉLULAS CACO-2 TRAS LA
EXPOSICIÓN A
CILINDROSPERMOPSINA”



Lourdes López Gil
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla
Julio 2017



Trabajo Fin de Grado de **carácter experimental**

Grado en Farmacia

**“DETERMINACIÓN DEL DAÑO
GENOTÓXICO Y OXIDATIVO EN EL ADN
DE CÉLULAS CACO-2 TRAS LA
EXPOSICIÓN A CILINDROSPERMOPSINA”**

Tutoras: Dra. Ángeles Jos Gallego y Dra. María Puerto
Rodríguez

Área de Investigación: Departamento de Nutrición y
Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Área de
Toxicología

Lourdes López Gil

6 de julio de 2017

Resumen

Las cianobacterias se encuentran distribuidas globalmente, siendo las aguas dulces su hábitat más común. Dichos microorganismos son capaces de sintetizar numerosos metabolitos, entre ellos los denominados cianotoxinas. Dentro de dichas toxinas destaca la Cilindrospermopsina (CYN), cianotoxina emergente de los últimos años, siendo responsable de episodios hepatoentéricos en Australia y Brasil.

La CYN, con una estructura de alcaloide tricíclico, posee distintos mecanismos de acción, tales como la inhibición de la síntesis de proteínas y del glutatión, el incremento de especies reactivas de oxígeno y la capacidad para actuar como agente genotóxico. Sin embargo, hasta la fecha, estudios que se centren en la determinación de sus efectos genotóxicos y epigenéticos son escasos y contradictorios. Es por ello, que el presente trabajo indaga acerca del potencial genotóxico de la CYN, usando como modelo experimental la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2, la cual se expuso a concentraciones de CYN de 0, 0,625, 1,25 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 y 48 h. Se ha utilizado el ensayo cometa estándar, para la evaluación del daño genotóxico directo, y su versión modificada con las enzimas Formamido pirimidina ADN glicosilasa (FPG) y Endonucleasa III (Endo III). Estas enzimas permiten reconocer las bases del material genético que se hayan oxidado, evaluando de esa forma el proceso de oxidación de las bases púricas y pirimidínicas, respectivamente.

Los resultados obtenidos mostraron que la CYN no produce daño genotóxico directo en la hebra de ADN de las células Caco-2 a ninguna de las concentraciones de exposición empleadas. Del mismo modo, la incubación con las enzimas de restricción no mostró oxidación en las hebras de ADN. Estos resultados son de gran utilidad para esclarecer el perfil toxicológico de esta cianotoxina emergente. Sin embargo, sería necesario completar dicho estudio con otros ensayos de genotoxicidad para confirmar los resultados negativos que hemos obtenido tras la exposición de Caco-2 a CYN.

PALABRAS CLAVE: Cilindrospermopsina, genotoxicidad, daño oxidativo, ensayo cometa.

Índice

Índice	3
Introducción	4
Objetivos	11
Materiales y métodos	12
Suministros y productos químicos.....	12
Línea celular	12
Concentraciones de exposición de CYN.....	12
Ensayo cometa	13
Realización del experimento	14
Estadística	16
Resultados	17
Discusión	20
Conclusiones	24
Agradecimientos	25
Bibliografía	26
Anexo I	35

Introducción

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos presentes prácticamente en cualquier ecosistema, tanto en hábitats acuáticos como terrestres, a excepción de aguas en las que no penetra la luz solar (Agrawal y Singh, 2000). Existen evidencias geológicas de su existencia desde hace 3,5 billones de años, lo cual significa que son una de las formas de vida más antiguas, y por tanto más evolucionadas, ya que se han ido adaptando según cambiaba el entorno que habitaban (Schopf, 2000). La proliferación de sus floraciones ha sido constatada en las aguas de todo el planeta, como consecuencia de un incremento observable de la eutrofización (Quesada y cols., 2006; Fathaili y cols., 2010; Messineo y cols., 2010). Cuando estas floraciones se desarrollan en aguas superficiales y potables, suponen un riesgo para la salud de los seres humanos y la sostenibilidad del medio ambiente (Schopf, 2000).

Numerosas especies de cianobacterias han desarrollado la capacidad de sintetizar una amplia variedad de estructuras y metabolitos, conocidos con el nombre de cianotoxinas, la mayor parte de ellas con función desconocida, pero que han sido puestas de manifiesto como tóxicas para diferentes organismos (Welker y Von Döhren, 2006; Rezanka y Dembitsky, 2006; Smith y cols., 2008). Ya que, como se ha mencionado con anterioridad, las cianobacterias son uno de los grupos procariotas más antiguos y ampliamente distribuidos, se deduce que la biosíntesis de las cianotoxinas podría formar parte de una adaptación evolutiva para conseguir la supervivencia dentro del ecosistema (Rzymiski y Poniedziałek, 2014).

La clasificación de las cianotoxinas puede hacerse en base a cuatro grandes grupos: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas y dermatoxinas (Carmichael y Li, 2006). En este trabajo, nos centraremos en una toxina que ha emergido recientemente como una de las cianotoxinas citotóxicas más importantes presentes en las aguas dulces de todo el mundo: la cilindrospermopsina (CYN) (De la Cruz y cols., 2013).

Por su estructura, la CYN se incluye dentro del grupo de los alcaloides (Figura 1A). Esta toxina contiene un grupo guanidino tricíclico combinado con un grupo hidroximetiluracilo. La totalidad del esqueleto molecular de la CYN fue resuelto por

espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear por Othani y cols. en 1992. En lo referente a sus propiedades químicas, la CYN es un zwitterión o ión híbrido, es decir, un compuesto químico eléctricamente neutro pero que posee cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes (Chiswell y cols., 1999). Esto hace que la toxina posea un carácter hidrofílico y sea estable a diferentes rangos de luz (incluida la luz ultravioleta), temperatura y condiciones de pH (De la Cruz y cols., 2013). Debido a su alta solubilidad en agua y su mínima tasa de biodegradación, cabe esperar que grandes cantidades de la toxina puedan ser encontradas en el agua (Wormer y cols., 2010). Este hecho fue observado por primera vez por Norris y cols. (2001) en un estudio experimental con cultivos de *Cylindrospermopsis raciborskii*. En diferencia a otras cianotoxinas tales como las microcistinas, la forma extracelular de la CYN predomina mayoritariamente sobre la forma intracelular (Buratti y cols., 2017). Además, ha sido declarada la existencia de dos isómeros naturales: 7-epicilindrospermopsina (7-epiCYN), epímero de CYN en el puente de hidroxilo (Figura 1B), y 7-deoxicilindrospermopsina (7-deoxiCYN), variante de CYN ausente de grupo hidroxilo en el carbono 7 (Figura 1C) (Pearson y cols., 2010). Posteriormente, se identificaron otras dos variantes de CYN: 7-desoxi-desulfo-CYN y 7-desoxi-desulfo-12-acetil-CYN, cuyas estructuras aún no se han dilucidado con exactitud (Wimmer y cols., 2014).

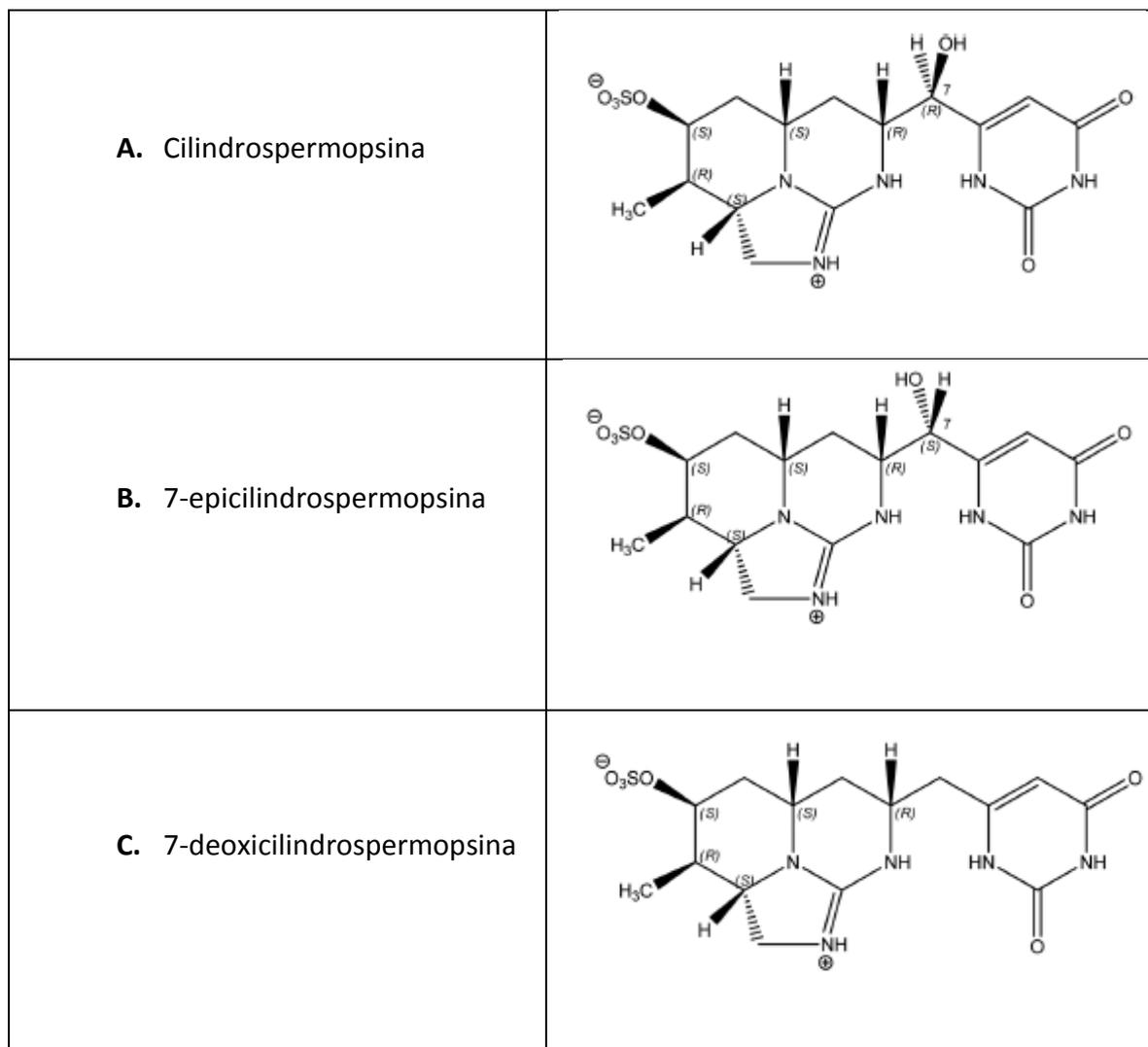


Figura 1. Estructuras de la CYN **(A)** y sus isómeros: 7-epicilindropermopsina **(B)** y 7-deoxicilindropermopsina **(C)** (De la Cruz y cols., 2013).

La síntesis de CYN tiene lugar en numerosas especies de cianobacterias, siendo *Cylindropermopsis raciborskii* (Figura 2) la mayor productora de CYN (Buratti y cols., 2017), y en otras en menor medida como *Umezakia natans* (Harada y cols., 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker y cols., 1997), *Anabaena bergii* (Schembri y cols., 2001), *Raphidiopsis curvata* (Li y cols., 2001a), *Aphanizomenon flos-aquae* (Preußel y cols., 2006), *Anabaena lapponica* (Spoof y cols., 2006), y *Lyngbya wollei* (Seifert y cols., 2007). Existen evidencias de que dichas especies están ampliamente distribuidas por los cinco continentes (Moreira y cols., 2012).

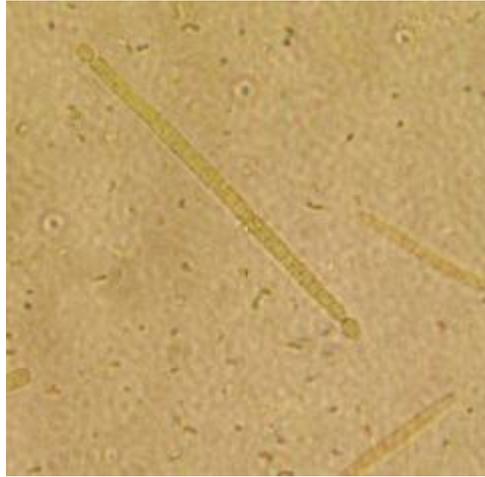


Figura 2. Imagen de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Buratti y cols., 2017).

La exposición humana a esta toxina puede ocurrir por varias vías: durante la realización de actividades de ocio en lagos, ríos y embalses, por consumo de productos agrícolas que hayan sido regados con aguas que alberguen la toxina o por consumo de alimentos de origen acuático cuyo hábitat natural sean aguas contaminadas con CYN (Thomas y cols., 1998). Sin embargo, la principal vía de intoxicación humana viene dada por el consumo y utilización de agua potable contaminada con cianobacterias (Kuiper-Goodman y cols., 1999). En este sentido, se ha relacionado a la CYN con distintos casos de intoxicaciones, concretamente en Australia y Brasil (Hawkins y cols., 1985; Carmichael y cols., 2001). El incidente de Australia, que tuvo lugar en la región de Palm Island en el año 1979, fue el primer episodio de intoxicación documentado por consumo de agua contaminada con CYN, en el que se registraron 148 casos de pacientes hospitalizados con síntomas de hepatoenteritis y daño tubular renal (Hawkins y cols., 1985). Otro episodio ocurrió en el año 1996, en el que fallecieron aproximadamente 50 pacientes que estaban recibiendo diálisis con agua contaminada con cianotoxinas, concretamente CYN y microcistinas. Este incidente tuvo lugar en la región brasileña de Caruaru (Carmichael y cols., 2001).

A pesar de los graves sucesos anteriormente mencionados y, en general, del aparente riesgo que supone, la CYN no ha sido aún evaluada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ni añadida a la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), aunque la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (EPA) la ha incluido en la lista de sustancias con gran

prioridad de ser caracterizadas, debido al alto riesgo que supone (EPA, 2001). Por tanto, son necesarios nuevos datos con respecto a su mecanismo de acción para poder aclarar completamente y con exactitud su perfil toxicológico. Además, recientemente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) también ha puesto de manifiesto la necesidad de disponer de más datos de caracterización toxicológica de esta cianotoxina (Testai y cols., 2016). Cabe resaltar también que, dentro de la evaluación toxicológica de las sustancias requerida por las entidades evaluadoras, la genotoxicidad se incluye entre los parámetros básicos a determinar mediante una batería de diferentes ensayos (EFSA, 2011), lo que es indicativo de la relevancia e interés de estas investigaciones.

Los principales mecanismos de acción de la CYN que se han propuesto son la inhibición de la síntesis de proteínas (Runnegar y cols., 2002; Froscio y cols., 2003) y del glutatión (GSH) (Runnegar y cols., 1995; Humpage y cols., 2005). La inhibición de la síntesis de proteínas dificulta el inicio y final de la mitosis que, en consecuencia, provoca un descenso en la proliferación celular (Salaün y cols., 2004). Por otra parte, la reducción de GSH viene dada por una inhibición de la enzima glutatión reductasa (Humpage y cols., 2005). Ambos mecanismos descritos son independientes al proceso de biotransformación de CYN a través del citocromo p450 (CYP450) (Froscio y cols., 2003; Humpage y cols., 2005).

Así mismo, los diferentes estudios llevados a cabo sobre esta cianotoxina sugieren que ésta posee actividad pro-genotóxica y potencialmente carcinogénica, aunque los mecanismos de tal acción están pobremente esclarecidos a pesar de su riesgo aparente (Sieroslawska y Rymuszka, 2014). Son diversos los autores que han evaluado la actividad genotóxica de la CYN. Humpage y cols. (2005) detectaron rotura del ADN mediante el ensayo cometa en células hepáticas de ratón tratadas con CYN después de 18 horas de exposición. Esta técnica se basa en el movimiento de fragmentos del ADN de células individuales dañados con carga negativa a través de un gel de electroforesis en presencia de un campo eléctrico (Azqueta y cols., 2014; Gunasekarana y cols., 2015). Posteriormente, se desarrolló este ensayo en la línea celular de linfocitos de sangre periférica humana (HPBLs), y se observó un incremento de la rotura de la hebra de ADN tras 4 horas de exposición a la concentración más alta

ensayada (0,5 µg/ml). Además, los resultados obtenidos tras 24 horas de exposición revelaron daño en el ADN a concentraciones de exposición inferiores (0,05 y 0,1 µg/ml) (Zegura y cols., 2011). Más tarde, la genotoxicidad directa de CYN fue estudiada en células HepG2, y los resultados mostraron un incremento de % ADN en cola tras 12, 24 y 72h de exposición, lo que viene a significar rotura de las hebras del material genético (Štraser y cols., 2011; Štraser y cols., 2013a, b). También se evaluó la rotura directa de la hebra de ADN que podía producir un extracto de agua clorada convencionalmente y contaminada con *Cylindrospermopsis raciborskii*, incluyendo CYN, en células HepG2, resultando ser este extracto genotóxico a una concentración de 1 µg/ml tras 24 h de exposición, y tras 48 y 72 h, a una concentración de 0,5 µg/ml (Fonseca y cols., 2012). Sin embargo, en células de ovario de hámster chino (CHO K1) no se observó daño en el ADN tras la exposición a CYN (Fessard y Bernard, 2003). De igual modo, un estudio realizado en hepatocitos de *Prochilodus lineatus* por Liebel y cols. (2011) concluyó que la exposición a CYN en este cultivo celular no producía daño en el ADN.

También se ha demostrado que la CYN induce estrés oxidativo por generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en diferentes modelos *in vitro*. Concretamente, la exposición a CYN produjo un incremento de ERO que ocasionó diferentes alteraciones morfológicas en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 (Gutiérrez-Praena y cols., 2012a). Además, este incremento de ERO también se observó en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) (Gutiérrez-Praena y cols., 2012b), en células HepG2 (Liebel y cols., 2015), en linfocitos humanos (Poniedziałek y cols., 2015) y en hepatocitos de ratón (López-Alonso y cols., 2013). Adicionalmente, es conocida la capacidad de las ERO de inducir la oxidación de las bases púricas y pirimidínicas, y en consecuencia, contribuir al daño genotóxico y provocar la rotura del ADN (Roos y Kaina, 2006). Es por ello que ha sido estudiada también la influencia de la exposición a CYN sobre la oxidación de las bases nitrogenadas del ADN mediante la utilización del ensayo cometa. En este caso, se realiza una modificación de la versión estándar que consiste en la incubación con enzimas de restricción que permiten determinar la oxidación de las bases púricas y pirimidínicas (Collins y cols., 2008; Azqueta y cols., 2009). Sin embargo, los estudios que existen hasta la fecha centrados en dicha determinación son casi inexistentes. La

CYN no ocasionó oxidación del material genético en hepatocitos de ratón (Humpage y col., 2005) ni en células HepG2 (Straser y col., 2013a). Sin embargo, Sieroslawska y Rymuszka (2014) determinaron el daño oxidativo de CYN mediante un ensayo fluorimétrico de oxidación del ADN, comprobándose la capacidad de la toxina para inducir daño oxidativo en el material genético de las células CLC.

Por todo lo comentado anteriormente, son necesarios nuevos datos con respecto al mecanismo de acción de la CYN para determinar con claridad su perfil genotóxico. Es por ello, que el presente trabajo de carácter experimental tiene como objetivo estudiar el mecanismo de acción genotóxica de la CYN mediante la versión alcalina del ensayo cometa estándar y modificado con las enzimas Formamido pirimidina ADN glicosilasa (Fpg) y Endonucleasa III (Endo III), habiéndose escogido dicha técnica por su gran rapidez, sensibilidad y capacidad para detectar un amplio espectro de lesiones en las hebras del ADN (Andersson y Hellman, 2005). Además, debido a que la ruta mayoritaria de exposición humana a CYN es por consumo de agua contaminada (Gutiérrez-Praena y cols., 2011), el cultivo celular seleccionado para nuestro experimento fue la línea celular procedente de un adenocarcinoma de colon humano (Caco-2), la cual se usa comúnmente en modelos *in vitro* para predecir la biodisponibilidad oral de xenobióticos (Xie y cols., 2010) e imita estrechamente la características morfológicas y bioquímicas de los enterocitos humanos (Sambuy y cols., 2005).

Objetivos

El presente trabajo de carácter experimental tiene como finalidad aportar información, por primera vez, sobre la genotoxicidad directa y el daño oxidativo en el ADN que la cianotoxina Cilindrospermopsina (CYN) podría llegar a producir en la línea celular intestinal humana Caco-2. Para ello se llevará a cabo el ensayo cometa estándar y modificado con las enzimas Formamido pirimidina ADN glicosilasa (Fpg) y Endonucleasa III (Endo III), las cuales detectarán la oxidación de las bases púricas y pirimidínicas, respectivamente. Dichos experimentos contribuirán al conocimiento del perfil toxicológico de dicha toxina, así como a establecer los posibles riesgos derivados de su exposición por vía oral.

Materiales y métodos

- **Suministros y productos químicos**

El medio de cultivo celular, el suero fetal bovino y los reactivos necesarios para el cultivo fueron proporcionados por BioWhittaker (Madrid, España). Los demás reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España) y VWR International Eurolab (Madrid, España). La Cilindrospermopsina (pureza > 95%) fue adquirida en Alexis Corporation (Lausen, Suiza). La enzima de restricción Fpg nos la proporcionó Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) y la enzima Endo III, C-viral S.L. (Sevilla, España).

- **Línea celular**

La línea celular Caco-2, que procede de un adenocarcinoma de colon humano, fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC No. HTB-37). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad relativa (incubadora de CO₂, NuAire[®], España). El medio celular, llamado medio esencial mínimo (MEM), se suplementó con un 10% de suero fetal bovino (SFB), 50 mg/ml de gentamicina, 2 mM de L- glutamina, un 1% de aminoácidos no esenciales, y 1 mM de piruvato, en un volumen final de 500 ml. Las células crecieron en frascos estériles de 75 cm², y fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) y subcultivadas con medio MEM enriquecido tres veces en semana. Para el ensayo cometa, se usaron placas de 24 pocillos en las que se sembraron las células a una densidad de 3,5 x 10⁵ células/ml. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de exclusión del colorante azul tripán (Strober, 2001) y el recuento se realizó con la cámara de Neu-Bauer (Mellado-García y cols., 2015).

- **Concentraciones de exposición de CYN**

Las concentraciones de exposición de CYN se eligieron en base a experimentos previos de citotoxicidad realizados en el Área de Toxicología (Gutiérrez-Praena y cols., 2011). De los marcadores utilizados, la reducción de la sal de tetrazolio (MTS) se

distinguió como el marcador más sensible, cuyo valor de concentración efectiva media (EC_{50}) fue 2,5 $\mu\text{g/ml}$. La EC_{50} se seleccionó como la mayor concentración de exposición de CYN, seguidas de $EC_{50}/2$ y $EC_{50}/4$. Las tres concentraciones elegidas para realizar el ensayo cometa fueron 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 1,25 $\mu\text{g/ml}$ y 0,625 $\mu\text{g/ml}$ de CYN, las cuales se prepararon en disolución con medio MEM sin suero partiendo de un vial comercial de CYN cuya concentración era 1000 $\mu\text{g/ml}$.

- **Ensayo cometa**

El ensayo cometa, también conocido como electroforesis en gel de células individuales, se ha convertido en uno de los métodos más habituales para determinar daños en el ADN celular (Collins, 2004). El experimento permite detectar roturas de cadena, dobles o simples, y sitios lábiles del ADN de cualquier célula eucariota, y además, posibilita el análisis del daño genotóxico a nivel de células individuales (Azqueta y cols., 2014). Tal es la simplicidad, sensibilidad, versatilidad, rapidez y economía de esta técnica que se puede aplicar en estudios de genotoxicidad, biomonitorización humana y epidemiología molecular (Collins, 2004).

El principio básico del ensayo cometa se fundamenta en la capacidad de migración, en presencia de un campo eléctrico, de los fragmentos de ADN dañados con carga negativa a través de un gel de agarosa hacia el ánodo o polo positivo (Gunasekaran y cols., 2015). La imagen, obtenida en el microscopio de fluorescencia, se asimila a un cometa con la intensidad de la cola dependiente de la frecuencia y magnitud de las roturas producidas en la hebra de ADN, hecho que será indicativo de la genotoxicidad de la sustancia estudiada (Azqueta y cols., 2014) (Figura 3). Además, ciertas modificaciones pueden ser introducidas para detectar distintos tipos de daño genotóxico. Una de ellas es el uso de enzimas de restricción específicas, las cuales detectarán y cortarán la cadena de ADN en aquellos sitios donde se haya producido oxidación de bases nitrogenadas. Las enzimas de restricción usadas en el presente trabajo son: Fpg, la cual escindiré aquellas bases púricas que se hayan oxidado (Collins, 2004), tales como la 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoxiguanosina, considerada como un marcador común de daño oxidativo en el ADN (Maatouk y cols., 2004; Andersson y

Hellman, 2005; Azqueta y cols., 2014), y Endo III, que detecta las bases pirimidínicas oxidadas (Collins, 2004).

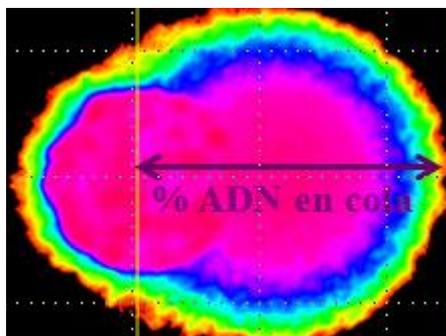


Figura 3. Imagen de un “cometa” observado al microscopio de fluorescencia.

• Realización del experimento

Las células Caco-2 fueron sembradas en placas de 24 pocillos con medio MEM sin SFB y, tras 24h, se expusieron a concentraciones de CYN crecientes (0-2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24 ó 48 h. Además, un control negativo (medio sin SFB) y un control positivo (100 μM de H_2O_2 durante 5 minutos a 4°C) fueron incluidos para monitorizar los ensayos. Tras el tiempo de exposición a la toxina (24 ó 48 h), el medio MEM fue retirado, y las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y neutralizadas de nuevo con PBS. La disolución celular se centrifugó y el pellet fue resuspendido con PBS. Posteriormente, se llevó a cabo el ensayo de exclusión del colorante azul tripán para determinar una densidad celular exacta de $2,5 \times 10^5$ células/ml. La suspensión celular se mezcló con 140 μl de agarosa de bajo punto de fusión, y las células se sembraron en 12 gotas de 5 μl respectivamente, repartidas a lo largo del portaobjetos y solidificadas durante 5 min a 4°C . Los portas se sumergieron en solución de lisis (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma, 1% Tritón, pH=10) durante toda la noche (Mellado-García y cols., 2015).

Una vez retirada la solución de lisis, los portas son lavados 3 veces durante 5 minutos con tampón F (HEPES 40 mM, KCl 0,1 M, EDTA 0,5 mM, Albúmina de Suero Bovino 0,2 mg/mL, a pH 8,0 ajustado con 6 M KOH). Posteriormente, se procedió a la incubación de los dos primeros geles de cada portaobjetos con solución de lisis para la

realización del ensayo cometa estándar y con tampón F y enzimas de restricción el resto de los geles. Este último caso se realiza para determinar la oxidación de las bases púricas y pirimidínicas, mediante el ensayo cometa modificado (Figura 4). Las concentraciones de incubación de cada enzima fueron optimizadas, y se determinó que la enzima Fpg se incubaría a una concentración de 0,125 U/ml, y la enzima Endo III a una concentración de 18 U/ml.

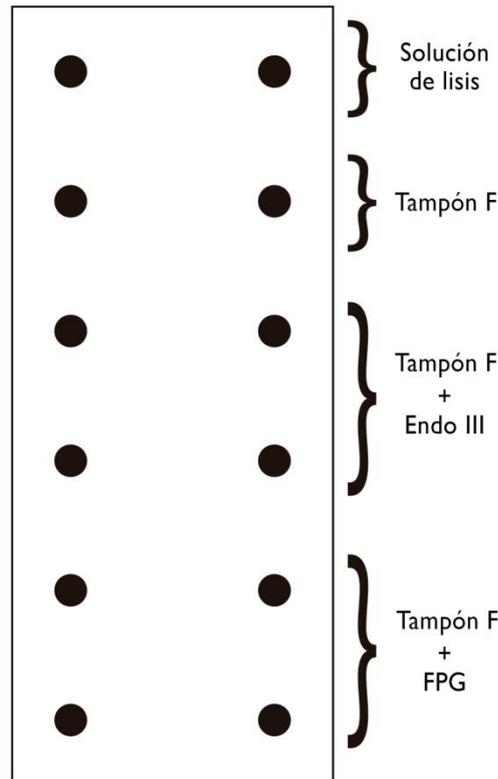


Figura 4. Esquema de un portaobjetos con todas las incubaciones realizadas en nuestro ensayo cometa.

Seguidamente, los portaobjetos se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se procedió a la desnaturalización de las células mediante la inclusión de los portaobjetos en solución de electroforesis (300 mM NaOH y 1 mM de EDTA) durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se lleva a cabo la electroforesis, para que el ADN dañado de las células previamente desnaturalizadas migre hacia el polo positivo en respuesta al campo eléctrico al que se las somete, en las siguientes condiciones: a un voltaje de 25 V y a una intensidad de corriente entre 350-400 mA, durante 20 minutos a 4°C (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2014). Finalizada la electroforesis,

se procedió a la neutralización de los núcleos mediante lavados con H₂O destilada y PBS durante 10 min cada producto, y posterior deshidratación con etanol al 70% y etanol absoluto durante 15 minutos cada uno.

Por último, el ADN fue teñido con Tampón TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, a pH 7,5) y SYBR Gold (Invitrogen, Termofisher, MA USA), y se visualizó con el microscopio de fluorescencia Olympus BX61 acoplado a un sistema de análisis de imagen (DP controller-DP manager) del Servicio de Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS). Se seleccionaron al menos 100 núcleos de manera aleatoria por concentración, y éstos fueron analizados con un Software de Análisis de Imagen (Comet Assay IV, Perceptive Instruments, UK).

- **Estadística**

Todos los experimentos fueron llevados a cabo al menos tres veces y en duplicado por concentración. El porcentaje de daño en el ADN se evaluó mediante el programa estadístico Graphpad instant[®]. El análisis estadístico se desarrolló utilizando el análisis de varianza ANOVA, seguido del test paramétrico Tukey-Kramer y el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron significativas a partir de un valor de $p < 0,05$.

Resultados

En el ensayo cometa estándar, los resultados obtenidos muestran que la CYN no produce rotura directa de la hebra de ADN en la línea celular humana Caco-2 a ninguna de las concentraciones ensayadas tras 24 o 48 h de exposición (Figura 5). Sin embargo, cuando las células fueron expuestas a 100 μM de H_2O_2 , se observaron diferencias significativas del % de rotura de las hebras de ADN con respecto al control negativo, revelando la efectividad y validez del ensayo.

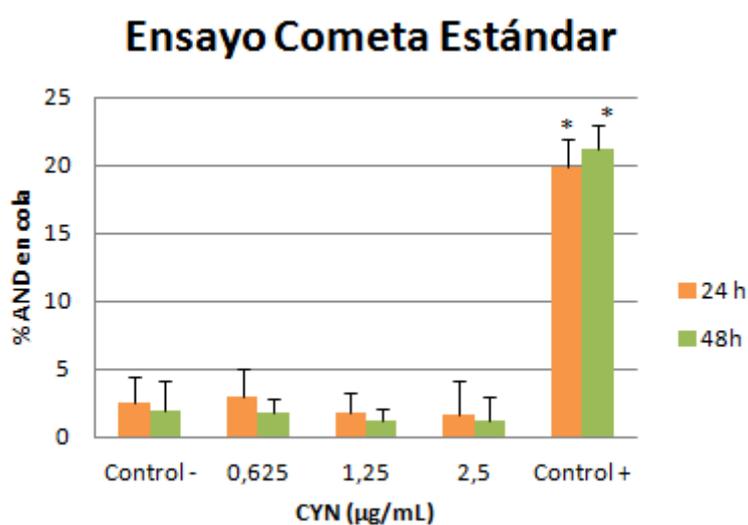


Figura 5. Daño genotóxico directo producido por CYN a concentraciones de 0,625, 1,25 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ tras 24 y 48 h de exposición. El marcador de genotoxicidad utilizado para evaluar las roturas del material genético fue el % de ADN en cola. Todos los valores se expresan como la media + s.d. * diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Con respecto al daño oxidativo que la CYN podría producir en las bases pirimidínicas tras la incubación con la enzima Endo III, los resultados obtenidos no mostraron incremento del daño en el ADN tras 24 y 48h de exposición con respecto al grupo expuesto solo con tampón F (columnas no mostradas) a 24 y 48 h de exposición (Figura 6). Si observamos en el tratamiento de las células Caco-2 con H₂O₂ y posterior incubación con Endo III, diferencias significativas son observables en ambos tiempos de exposición.

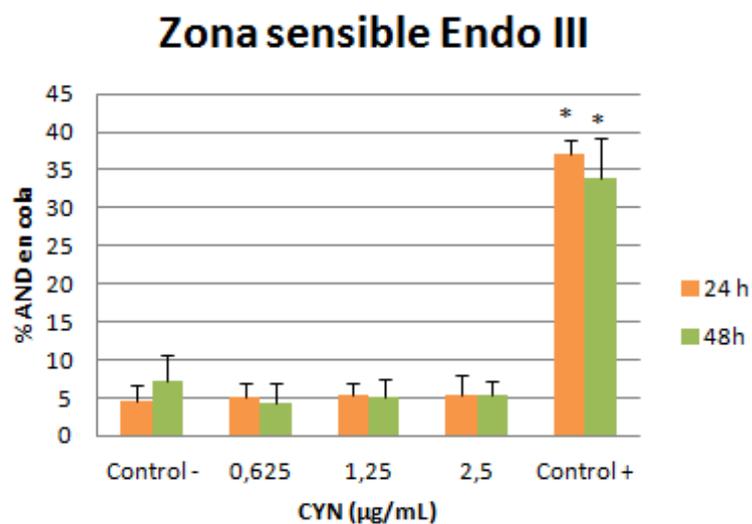


Figura 6. Daño genotóxico producido por el reconocimiento de las bases pirimidínicas oxidadas mediante la incubación con la enzima de restricción Endo III. Los niveles de oxidación de las bases pirimidínicas se expresaron como % de ADN en cola. Todos los valores se expresan como la media + s.d. * diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Con respecto a la oxidación de las bases púricas tras la exposición a CYN y posterior incubación con la enzima Fpg, los resultados muestran la ausencia del daño oxidativo de dichas bases nitrogenadas tras 24 y 48 h de exposición (Figura 7). Sin embargo, sí se aprecian estas diferencias cuando las células son tratadas con H₂O₂ e incubadas con FPG.

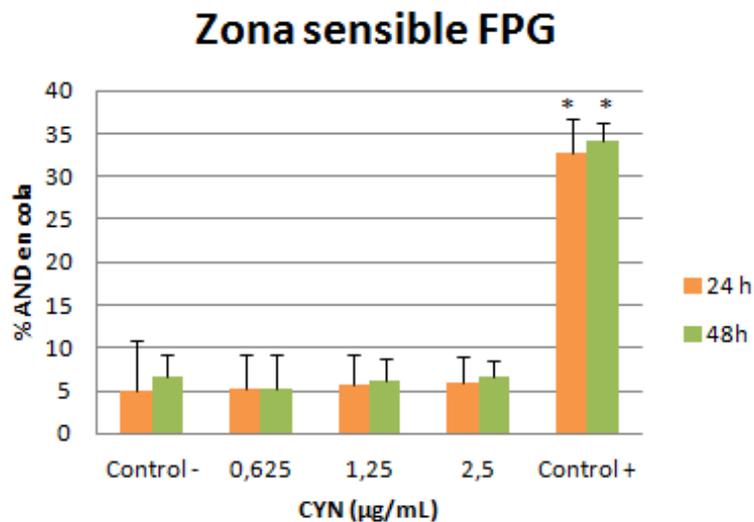


Figura 7. Daño genotóxico producido por el reconocimiento de las bases púricas oxidadas mediante la incubación con la enzima de restricción FPG. Los niveles de oxidación de las bases púricas se expresaron como % de ADN en cola. Todos los valores se expresan como la media + s.d. * diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Discusión

Los estudios que se centran en el mecanismo de acción genotóxica de la CYN y su consecuente repercusión potencial en la población son, hasta la fecha, escasos e inconcluyentes. Por tanto, en el presente trabajo se ha evaluado por primera vez la genotoxicidad directa y el daño oxidativo en la hebra de ADN que la CYN podría llegar a producir en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2, mediante el ensayo cometa estándar y modificado con las enzimas Fpg y Endo III, para así aportar información acerca del perfil toxicológico de esta cianotoxina y poder de esta forma realizar una mejor evaluación del riesgo para la población derivado de su exposición por vía oral.

Los resultados muestran que la exposición a CYN desde 0 µg/ml hasta 2,5 µg/ml no produce daño genotóxico directo en la hebra de ADN de las células Caco-2 a ninguna concentración ni tiempo de exposición, siendo éstos 24 y 48 h. Resultados similares fueron observados por Fessard y Bernard, (2003), quienes realizaron también el ensayo cometa en células de ovario de hámster chino (CHO K1) exponiendo a concentraciones de CYN de 0.5 y 1 µg/ml, a 24 h de exposición. Dichos investigadores concluyeron que, aunque las células sufrieron alteraciones morfológicas tras la exposición a la cianotoxina, no se generó daño genotóxico directo en la hebra de ADN. Dado que, según la bibliografía, la activación metabólica de CYN a través del CYP450 es necesaria para producir los efectos genotóxicos (Runnegar y cols., 1995; Norris y cols., 2001; Norris y cols., 2002), la ausencia de un sistema metabólico microsomal explicaría la falta del incremento del % ADN en la cola, en comparación con el grupo control negativo. En este sentido, a pesar que las células Caco-2 se caracterizan por su competencia metabólica, la expresión del sistema enzimático CYP450 es inferior si las equiparamos con otro tipos de células tales como los enterocitos humanos (Sambuy y cols., 2005).

Liebel y cols. (2011) también realizaron el ensayo cometa con hepatocitos de *Prochilodus lineatus*, exponiéndolos a concentraciones de CYN de 0,1 a 10 µg/ml

durante 72 h, y se concluyó que la exposición a CYN en este cultivo celular no producía daño en el ADN.

Estos resultados negativos podrían deberse al tipo de célula y a la toxicidad interespecífica de la cianotoxina (Humpage y cols., 2000; Lankoff y cols., 2007). Además, pueden influir los largos tiempos de exposición utilizados en el experimento, periodo en el cual las células podrían ser capaces de reparar el daño genotóxico (Browner y cols., 2004).

Sin embargo, Humpage y cols. (2005) observaron que, en células hepáticas de ratón, CYN produce daño en el ADN a todas las concentraciones ensayadas (0,05-0,5 μM) tras 18 h de exposición. De forma similar, cuando células de linfocitos de sangre periférica humana (HPBL) fueron expuestas a concentraciones de CYN de 0 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 4 y 24 h de exposición, se observó rotura de la hebra de ADN a 4 h, a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, y a 24 h, a 0,05 y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Zegura y cols., 2011). Los resultados positivos obtenidos tanto en células hepáticas como en sangre periférica se atribuyeron a la capacidad de ambas células de metabolizar la CYN a través del sistema enzimático CYP450 (Humpage y cols., 2005; Zegura y cols., 2011). También se evaluó el daño genotóxico que la CYN podría producir en la línea celular HepG2, células metabólicamente competentes dado su origen hepático. Dichas células se expusieron a concentraciones de la cianotoxina de 0 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 4, 12, 24 y 72 h. La rotura de las hebras del material genético se produjo a las dos concentraciones más altas ensayadas, a 12, 24 y 72 h de exposición. Se planteó la hipótesis de que la razón por la cual a las 4 h de exposición no se había producido daño en el ADN podría ser por la lenta absorción de la toxina por las células, la cual se produciría probablemente por difusión pasiva (Štraser y cols., 2011; Štraser y cols., 2013a, b). Las células HepG2 también fueron utilizadas para evaluar el daño genotóxico directo que podía llegar a producir un extracto de *Cylindrospermopsis raciborskii*, en el cual se confirmó la presencia de CYN. Dicho extracto provocó rotura en las hebras del material genético en las células HepG2 a 48 y 72 h de exposición (Fonseca y cols., 2012).

Otros ensayos de genotoxicidad, tales como el ensayo de micronúcleos, han sido utilizados para evaluar la capacidad de la CYN para producir efectos clastogénicos

y aneugénicos. La CYN ha incrementado la formación de células con micronúcleos en linfocitos WIL2-NS (Humpage y cols., 2000), Caco-2 (Bazin y cols., 2010), HepG2 (Štraser y cols., 2011) y células de pescado CLC (Sieroslawska y Rymuszka, 2014). Por el contrario, en otras líneas celulares se han obtenido resultados negativos, tales como CHO K1 (Lankoff y cols., 2007) y HepaRG (Bazin y cols., 2010).

Una de las principales vías de toxicidad postulada de CYN es el incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO), mecanismo del cual se han realizado diversos estudios *in vitro* (Gutiérrez-Praena y cols., 2012a; Gutiérrez-Praena y cols., 2012b; López-Alonso y cols., 2013; Liebel y cols., 2015; Poniedziątek y cols., 2015). Las ERO son especies químicas que contienen en su configuración uno o más electrones desapareados, lo que los convierte en compuestos altamente inestables, y por ello necesitan ceder o tomar un electrón de una molécula contigua para así ser capaces de estabilizarse (Sierra-Vargas y cols., 2004). Entre las ERO más comunes se incluyen iones de oxígeno y radicales libres, tales como superóxido e hidroxilo. El estrés celular puede conducir a niveles elevados de ROS y, debido a su naturaleza altamente reactiva, pueden inducir modificaciones en moléculas proteicas y lipídicas, un fenómeno conocido como estrés oxidativo (Martínez-Sánchez, 2005). Un exceso de ERO puede provocar necrosis celular y daño en el ADN y, en consecuencia, apoptosis (Roos y Kaina, 2006). Además, es sabido que las reacciones enzimáticas del CYP450 son una fuente significativa de la formación de ERO (Olinski y cols., 2002). Debido a la necesaria activación metabólica de CYN por parte del CYP450, estas reacciones pueden ser otra vía de formación de ERO tras la exposición a CYN (Humpage y cols., 2005; Bazin y cols., 2010; Straser y cols., 2011). Sin embargo, aún se desconoce si dichas ERO son capaces de oxidar las hebras de ADN, y a largo plazo, pueden originar efectos cancerígenos. Por ello, con la finalidad de dilucidar la implicación de las ERO sobre un posible daño oxidativo en las bases nitrogenadas del ADN, hemos incluido en nuestro experimento la versión del ensayo cometa modificada con las enzimas Fpg y Endo III. Dichas enzimas detectan y escinden las bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas oxidadas, respectivamente (Gunasekarana y cols., 2015).

En nuestro ensayo cometa modificado, la incubación con las enzimas de restricción no produjo un incremento en la cantidad de roturas en la hebra de ADN

que se corresponderían con bases nitrogenadas oxidadas. Debido a la escasez de estudios centrados en el daño oxidativo de CYN sobre el material genético, los resultados con los que poder comparar nuestro experimento son muy limitados. Humpage y cols. (2005) evaluaron el daño genotóxico en hepatocitos de ratón, y pusieron de manifiesto que, a la concentración más alta ensayada (5 μ M), los niveles de estrés oxidativo no se vieron aumentados. Ante estos resultados, los autores manifestaron la posibilidad de que el daño oxidativo producido por CYN en la hebra de ADN no se debía al incremento de ERO, sino que la toxina era capaz de oxidar las bases nitrogenadas per se. Además, el daño oxidativo en el material genético fue estudiado en la línea celular HepG2 por medio del ensayo cometa modificado tras la incubación con Fpg. Los resultados tras la digestión con Fpg se podían comparar con los del grupo control, por lo que el daño oxidativo producido no era considerable. Además, los autores concluyeron que, a concentraciones no citotóxicas de CYN, el estrés oxidativo no juega un papel sustancial en su genotoxicidad indirecta (Straser y cols., 2013a). Sin embargo, Sieroslawska y Rymuska (2014) estudiaron el daño oxidativo tras la exposición a CYN en células de pescado CLC por medio de un ensayo fluorimétrico de oxidación del ADN, viéndose aumentados los niveles de 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoxiguanosina, producto de la oxidación de la guanina.

Nuestros resultados mostraron que la CYN no produce daño genotóxico directo ni daño oxidativo en las hebras de ADN de la línea celular intestinal humana Caco-2. Dichos resultados aportan información sobre el perfil toxicológico de esta cianotoxina, aunque sería necesario continuar con las investigaciones referentes a su genotoxicidad para esclarecer por completo su mecanismo de acción.

Conclusiones

Tras evaluar los resultados obtenidos en nuestro trabajo, podemos concluir diciendo que la CYN no induce daño genotóxico en la línea celular intestinal humana Caco-2 en las condiciones ensayadas (concentraciones de 0-2,5 µg/ml y 24 y 48h de exposición) en el ensayo cometa estándar. Igualmente, no se detecta daño oxidativo en las bases púricas y pirimidínicas del material genético de las células. Tales conclusiones resultan relevantes con el fin de dilucidar con exactitud el mecanismo de acción de esta cianotoxina emergente y caracterizar su peligrosidad. Sin embargo, sería fundamental continuar con su evaluación toxicológica con ensayos de genotoxicidad complementarios basados en fundamentos diferentes tal y como recomiendan los organismos evaluadores.

Agradecimientos

Las investigaciones llevadas a cabo en este Trabajo de Fin de Grado se han podido realizar gracias a la financiación concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto AGL2015-64558-R, MINECO/FEDER, UE). Se agradece igualmente al Servicio de Microscopía del CITIUS la utilización de sus equipos.

Bibliografía

Agrawal SC, Singh V. Vegetative survival, akinete formation and germination in three blue green algae and one green alga in relation to light intensity, temperature, heat shock and UV exposure. *Folia Microbiol.* 2000; 45(5): 439-446.

Andersson MA, Hellman BE. Different roles of Fpg and Endo III on catechol-induced DNA damage in extended-term cultures of human lymphocytes and L5178Y mouse lymphoma cells. *Toxicol in vitro.* 2005; 19(6): 779-786.

Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res.* 2009; 674: 101–1086

Azqueta A, Slyskova J, Langie SA, O'Neill Gaivão I, Collins A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front Genet.* 2014; 5: 288.

Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* isolated from Lake Kinneret, Israel. *J Phycol.* 1997; 33: 613–616.

Bain P, Shaw G, Patel B. Induction of p53-regulated gene expression in human cell lines exposed to the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Toxicol Environ Health Part A.* 2007; 70(19): 1687-1693.

Bazin E, Mourot A, Humpage AR, Fessard V. Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. *Environ Mol Mutagen.* 2010; 51(3): 251-259.

Browner WS, Kahn AJ, Ziv E, Reiner AP, Oshima J, Cawthon RM. et al. The genetics of human longevity. *Am J Med.* 2004; 117 (11): 851-60.

Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E. et al. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch Toxicol.* 2017; 1-82.

Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. Human fatalities from cyanobacteria, chemical and biological evidence for cyanotoxins. *EHP Toxicogenomics*. 2001; 109: 663-668.

Carmichael WW, Li RH. Cyanobacterial toxins in the Salton Sea. *Saline systems*. 2006; 2(1): 5.

Chiswell RK, Shaw GR, Eaglesham GK, Smith MJ, Norris RL, Seawright AA, Moore MR. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environ Toxicol*. 1999; 14: 155–165.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol*. 2004; 26(3): 249.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 2008; 23: 143-15.

De la Cruz AA, Hiskia A, Kaloudis T, Chernoff N, Hill D, Antoniou, MG et al. A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environ Sci Process Impacts*. 2013; 15(11): 1979-2003.

EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*. 2011; 9 2379: 1-69.

EPA, 2001. Creating a Cyanotoxin Target List for the Unregulated Contaminant Monitoring Rule, U.S. Environmental Protection Agency, Technical Service Center, Cincinnati, OH, http://www.epa.gov/safewater/ucmr/ucmr1/pdfs/meeting_ucmr1_may2001.pdf accessed September 28, 2010 (2001).

Fathaili A, Jenhani ABR, Moreira C, Saker M, Romdhane M, Vasconcelos V. First observation of the potentially toxic and invasive cyanobacterium species *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) in Tunisian freshwaters: toxicity assessment and molecular characterization. *Fresenius Environ Bull*. 2010; 19: 1074–1083.

Fessard V, Bernard C. Cell alterations but no DNA strand breaks induced in vitro by cylindrospermopsin in CHO K1 cells. *Environ Toxicol.* 2012; 18(5): 353

Fonseca AL, Lankoff A, Azevedo SM, Soares RM. Effects on DNA and cell viability of treated water contaminated with *Cylindrospermopsis raciborskii* extract including cylindrospermopsin. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012; 8(1): 135-141.

Froschio SM, Humpage AR, Bucham PC, Falconer IR. Cylindrospermopsin induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol.* 2003; 18: 243-251.

Gunasekarana V, Raj GV, Chand P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *JCDR.* 2015; 9(3): GE01.

Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos Á, Cameán, AM. Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011; 74(6): 1567-1572.

Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos A, Moreno FJ, Cameán AM. Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin Cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2. *Water Res.* 2012a; 46(5): 1566–1575.

Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos Á, Moreno FJ, Cameán AM. Alterations observed in the endothelial HUVEC cell line exposed to pure cylindrospermopsin. *Chemosphere.* 2012b; 89(9): 1151–1160.

Harada KI, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M et al. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon.* 1994; 32: 73–84.

Hawkins PR, Runnegar MTC, Jackson ARB, Falconer IR. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water reservoir. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 50: 1292-1295.

Humpage AR, Fenech M, Thomas P, Falconer IR. 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.* 2000; 472(1): 155-161.

Humpage AR, Fontaine F, Froschio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A.* 2005; 68: 739-753.

Kuiper-Goodman T, Falconer I, Fitzgerald J. Human health aspects. *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* 1999; 1: 113-153.

Lankoff A, Wojcik A, Lisowska H, Bialczyk J, Dziga D, Carmichael WW. No induction of structural chromosomal aberrations in cylindrospermopsin treated CHO-K1 cells without and with metabolic activation. *Toxicol.* 2007; 50: 1105– 1115.

Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Liu Y et al. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata*. *J Phycol.* 2001a; 37: 1121–1126.

Liebel S, de Oliveira Ribeiro CA, de Magalhães VF, da Silva RDC, Rossi SC, Randi MAF et al. Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). *Toxicol in vitro.* 2015; 29(3): 479-488.

Llana-Ruiz-Cabello M, Maisanaba S, Puerto M, Prieto AI, Pichardo S, Jos Á. Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames Salmonella test and alkaline, Endo III-and FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2. *Food Chem Toxicol.* 2014; 72: 122-128.

López Alonso H, Rubiolo JA, Vega F, Vieytes MR, Botana LM. Protein synthesis inhibition and oxidative stress induced by cylindrospermopsin elicit apoptosis in primary rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* 2013; 26(2): 203-212.

Maatouk I, Bouaïcha N, Plessis MJ, Périn F. Detection by 32 P-postlabelling of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA as biomarker of microcystin-LR and

nodularin induced DNA damage in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2004; 564(1): 9-20.

Martínez-Sánchez, G. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm [Internet]*. 2005; 39(3).

Mellado-García P, Maisanaba S, Puerto M, Llana-Ruiz-Cabello M, Prieto AI, Marcos R et al. Genotoxicity assessment of propyl thiosulfinate oxide, an organosulfur compound from *Allium* extract, intended to food active packaging. *Food Chem Toxicol*. 2015; 86: 365-373.

Messineo V, Melchiorre S, Di Corcia A, Gallo P, Bruno M. Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic Lake Albano, Central Italy. *Environ Toxicol*. 2010; 25(1): 18-27.

Moreira C, Azevedo J, Antunes A, Vasconcelos V. Cylindrospermopsin: Occurrence, methods of detection and toxicology. *J Appl Microbiol*. 2012; 114(3): 605-620.

Norris RL, Seawright AA, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, Moore MR. Distribution of ¹⁴C cylindrospermopsin in vivo in the mouse. *Environ Toxicol*. 2001; 16: 498–505.

Norris RLG, Seawright AA, Shaw GR, Senogles P, Eaglesham GK, Smith MJ, Chiswell RK, Moore MR. Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin in vivo in the mouse. *Toxicol*. 2002; 40: 471–476.

Ohtani I, Moore RE, Runnegar, MT. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc*. 1992; 114(20): 7941-7942.

Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33: 192–200.

Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123: 291–298.

Poniedziałek B, Rzymiski P, Kokociński M, Karczewski J. Toxic potencies of metabolite(s) of non-cylindrospermopsin producing *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from temperate zone in human white cells. *Chemosphere.* 2015; 120: 608-614.

Preußel K, Steuken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon.* 2006; 47: 156–162.

Quesada A, Moreno E, Carrasco D, Paniagua T, Wormer L, De Hoyos C. et al. Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur J Phycol.* 2006; 41: 39-45.

Řezanka T, Dembitsky VM. Metabolites produced by cyanobacteria belonging to several species of the family Nostocaceae. *Folia microbiol.* 2006; 51(3): 159-182.

Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* 2006; 12: 440–450.

Runnegar MT, Kong S, Zhong YA, Lu SC. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 1995; 49: 219-225.

Runnegar MT, Xie C, Snider BB, Wallace GA, Weinreb SM, Kuhlenkamp J. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicol Sci.* 2002; 67: 81-87.

Rzymiski P, Poniedziałek B. In search of environmental role of cylindrospermopsin: a review on global distribution and ecology of its producers. *Water Res.* 2014; 66: 320-337.

Salaün P, Le Breton M, Morales J, Bellé R, Boulben S, Mulner-Lorillon O. et al. Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. *Exp Cell Res.* 2004; 296: 347–357.

Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005; 21(1): 1-26.

Schembri MA, Neilan BA, Saint CP. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol.* 2001; 16: 413–421.

Schopf JW. Solution to Darwin's dilemma: Discovery of the missing Precambrian record of life. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(13): 6947-6953.

Seifert M, McGregor G, Eaglesham G, Wickramasinghe W, Shaw G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei*. *Harmful Algae.* 2007; 6: 73–80.

Sieroslawska A, Rymuszka, A. Cylindrospermopsin induces oxidative stress and genotoxic effects in the fish CLC cell line. *J Appl Toxicol.* 2015; 35(4): 426-433.

Sierra-Vargas MP, Grenfell G, Martín A, Olivares Corichi IVONNE, Torres-Ramos YD, Hicks-Gómez, JJ. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2004; 17(2): 135-148.

Smith JL, Boyer GL, Zimba PV. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture.* 2008; 280(1): 5-20.

Spoof L, Berg KA, Rapala J, Lahti K, Lepisteo L, Metcalf JS et al. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the Boreal Environment (Finland). *Environ Toxicol.* 2006; 21: 552–560.

Stewart I, Seawright AA, Schluter PJ, Shaw GR. Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium

Cylindrospermopsis raciborskii and its associated toxin cylindrospermopsin. BMC dermatology. 2006; 6: 1-5.

Štraser A, Filipic M, Žegura B. Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. Arch. Toxicol. 2011; 85: 1617–1626.

Štraser A, Filipič M, Gorenc I, Žegura B. The influence of cylindrospermopsin on oxidative DNA damage and apoptosis induction in HepG2 cells. Chemosphere. 2013a; 92(1) 24-30.

Štraser A, Filipič M, Novak M, Žegura B. Double strand breaks and cell-cycle arrest induced by the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in HepG2 cells. Mar drugs. 2013b; 11(8): 3077-3090.

Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol. 2001; 21: 3B:A.3B.1eA.3B.2, Appendix 3: Appendix 3B.

Testai E, Buratti FM, Funari E, Manganelli M, Vichi S, Arnich N, Biré R, Fessard V, Sialehaamo A. Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. EFSA Supporting publication. 2016; 13(2).

Thomas AD, Saker ML, Norton JH, Olsen RD. Cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii as a probable cause of death in cattle in northern Queensland. Aust Vet J. 1998; 76: 592-594.

Tornaletti S, Pfeiffer GP. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. Bioessays. 1996; 18: 221–228.

Welker M, Von Döhren H. Cyanobacterial peptides nature's own combinatorial biosynthesis. FEMS microbiology reviews. 2006; 30(4): 530-563.

Wörmer L, Huerta-Fontela M, Cirés S, Carrasco D, Quesada A. Natural photodegradation of the cyanobacterial toxins microcystin and cylindrospermopsin. Environ Sci Technol. 2010; 44(8): 3002-3007.

Xie SH, Liu AL, Chen YY, Zhang L, Zhang HJ, Jin BX et al. DNA damage and oxidative stress in human liver cell L-02 caused by surface water extracts during

drinking water treatment in a waterworks in China. *Environ Mol Mutagen.* 2010; 51(3): 229-235.

Žegura B, Gajski G, Štraser A, Garaj-Vrhovac V. Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. *Toxicon.* 2011; 58(6): 471-479.

Anexo I

Comunicaciones derivadas de este trabajo:

- **Comunicación tipo póster** que se presentará en el XXII Congreso Español de Toxicología y VI Iberoamericano, organizado por la Asociación Española de Toxicología (AETOX), que se celebrará en Valencia entre el 28 y el 30 de Junio de 2017.



Estimada Sra. Puerto M le comunico que la comunicación “**DETERMINACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO Y OXIDACIÓN DE LAS BASES NITROGENADAS DEL ADN TRAS LA EXPOSICIÓN A CYN DE CÉLULAS CACO-2.** *Puerto M, López-Gil L, Maisanaba S, Jos A, Cameán AM*” ha sido aceptada para su presentación en forma de cartel en el XXII Congreso Español de Toxicología y VI Iberoamericano que tendrá lugar en Valencia entre el 28-30 Junio de 2017, siempre que su inscripción este regularizada en función de los plazos.

Y para que así conste firma la presente en Valencia a 17 de Mayo de 2017

Fdo.: María José Ruiz
Presidenta del Comité Científico

