

Universidad de Sevilla

# **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NEUROTÓXICO DE CIANOTOXINAS EN LA LÍNEA CELULAR DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

**Laura Espinar López**

Trabajo Fin de Grado



Facultad de Farmacia





Universidad de Sevilla

**Trabajo Fin de Grado**  
Grado en Farmacia



Facultad de Farmacia

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NEUROTÓXICO DE  
CIANOTOXINAS EN LA LÍNEA CELULAR DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

Trabajo Experimental

**Laura Espinar López**

Facultad de Farmacia, Sevilla

26 de noviembre 2018

**Tutores**

Dra. Ana Isabel Prieto Ortega

Dr. Daniel Gutiérrez Praena

**Dpto. Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal**

**Área de Toxicología**



## RESUMEN

Las cianobacterias crecen principalmente en aguas dulces de zonas tropicales y subtropicales, aunque cada vez resulta más evidente su presencia en aguas de zonas templadas. Algunas especies de cianobacterias son capaces de producir cianotoxinas, siendo la microcistina-LR (MC-LR) y la cilindrospermopsina (CYN) dos de las que despiertan mayor interés desde el punto de vista toxicológico. Se ha descrito que MC-LR es hepatotóxica y CYN citotóxica. Sin embargo, existen algunos estudios que muestran la capacidad de ambas para inducir efectos neurotóxicos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el posible efecto que MC-LR y CYN pudieran tener, tanto de forma aislada como en combinación, sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Para ello se realizaron los ensayos de citotoxicidad basal de captación de rojo neutro y reducción de la sal de tetrazolio MTS. Tras exponer las células a 0-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de MC-LR y 0-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CYN durante 24 y 48 horas, se observó que ambas cianotoxinas producían efecto neurotóxico, resultando CYN más citotóxica que MC-LR. Para estudiar los efectos de su combinación se emplearon la concentración efectiva media de cada cianotoxina y fracciones de éstas. Así, este estudio mostró que a concentraciones elevadas, ésta resultaba más citotóxica que las cianotoxinas de manera individual. Además, para evaluar el tipo de interacción que se producía entre MC-LR y CYN, se empleó el método de isobogramas, por el que es posible determinar si una combinación es antagónica, aditiva o sinérgica. Tras analizar los resultados, se dedujo que la combinación de MC-LR y CYN era de tipo antagónico, si bien se observó una tendencia hacia aditividad a concentraciones elevadas. En base a estos resultados, se demostró que las cianotoxinas MC-LR y CYN presentan capacidad neurotóxica en la línea celular SH-SY5H, tanto aisladas como en combinación.

**Palabras clave:** cianotoxinas, microcistinas, cilindrospermopsina, citotoxicidad, neurotoxicidad

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Cianobacterias.....	3
1.2. Cianotoxinas.....	5
1.2.1. Vías de exposición.....	5
1.2.2. Microcistinas.....	6
1.2.3. Cilindrospermopsina.....	8
1.3. Neurotoxicidad.....	11
2. OBJETIVO.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Compuestos químicos.....	13
3.2. Modelo experimental.....	13
3.3. Soluciones de toxinas.....	14
3.4. Ensayos de citotoxicidad .....	14
3.5. Evaluación del efecto de la combinación de cianotoxinas mediante el método de isoblogramas.....	15
3.6. Cálculos y análisis estadístico.....	16
4. RESULTADOS.....	16
4.1. Ensayos de citotoxicidad.....	16
4.2. Evaluación del efecto de la combinación de MC-LR y CYN por el método de isoblogramas.....	19
5. DISCUSIÓN.....	21
6. CONCLUSIÓN.....	23
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24
ANEXO 1.....	33

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Cianobacterias

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos comúnmente conocidos como algas verde-azuladas, si bien actualmente se encuentran clasificadas como bacterias Gram negativas capaces de crecer en ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de agua salada (Woese, 2002).

Las cianobacterias se han adaptado a lo largo del tiempo hasta desarrollar una serie de características que les confieren ciertas ventajas y mayor resistencia (Rouco, 2011). Las condiciones óptimas para su crecimiento en cuanto a temperatura y pH son 20-30 °C y pH neutro o básico. Realizan fotosíntesis oxigénica, por lo que para crecer necesitan oxígeno y es por ello que se posicionan donde las condiciones de luz y oxígeno son óptimas (Walsby, 1994).

Se caracterizan por tener la capacidad de crear floraciones, crecimiento masivo de estos microorganismos, que se conocen como "*blooms*", dando lugar, en ocasiones, a un aspecto turbio y sucio del agua (Falconer, 1994) (Figura 1).



Figura 1. Floración masiva de cianobacterias vista desde satélite. Tomada de <http://lavallette-seaside.shorebeat.com>

Para que estas floraciones tengan lugar se deben reunir una serie de condiciones ambientales, principalmente la eutrofización del agua debida a la abundancia de nutrientes, como fósforo y nitrógeno, además de unas condiciones óptimas de temperatura, el pH y la luz (O'Neil y cols., 2012). La frecuencia de las floraciones de cianobacterias ha aumentado en los últimos años debido al cambio climático y a la actividad antropogénica, como son el uso y vertido descontrolado de fertilizantes y detergentes que contienen en su composición

nitrógeno o fósforo, así como el vertido de residuos agrícolas y ganaderos (Buratti y cols., 2017). Esto puede resultar perjudicial, ya que crecen expandiéndose por la superficie del agua hasta crear una capa, evitando que se produzca el recambio de oxígeno del agua, impidiendo la respiración de los organismos acuáticos, ocasionando su muerte por asfixia (Figura 2).



Figura 2. (A) Visualización de la capa superficial formada por cianobacterias. (Imagen tomada de <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/cyanotoxins-drinking-water>) (B) Muerte de pez por asfixia. (Imagen tomada de <https://www.ecowatch.com>)

Según diversos estudios, las condiciones ambientales más favorables para el crecimiento de estas cianobacterias son final del verano o principio del otoño (Gutiérrez-Praena y cols., 2013). Las grandes floraciones de cianobacterias suelen encontrarse principalmente en aguas de regiones tropicales y subtropicales (Hawkins y cols., 1985; Hayman, 1992). Sin embargo, se ha observado que pueden reproducirse en cualquier parte del mundo, limitándose cada vez menos a las zonas anteriormente citadas. De esta forma, en los últimos años se han descrito floraciones de cianobacterias en diversos países de zonas templadas (Falconer y Humpage, 2006).

La mayoría de cianobacterias producen diferentes compuestos químicos como metabolitos secundarios, un grupo muy diverso entre los que encontramos alcaloides, péptidos, polisacáridos, etc. (Pantelic y cols., 2013). Estos productos secundarios pueden ser beneficiosos y tener aplicación en la industria farmacéutica, sector alimentario, cosmética, agricultura y energía (Buratti y cols., 2017). Sin embargo, también son capaces de producir otros compuestos que resultan perjudiciales, entre los que se encuentran las cianotoxinas (Carmichael, 1992).

## 1.2. Cianotoxinas

Las cianotoxinas son, entre otros, los productos resultantes del metabolismo secundario de las cianobacterias, y son responsables de algunos de sus efectos tóxicos (Duy y cols., 2000). Se pueden clasificar según diversos criterios, tales como por su estructura química, su toxicidad, su órgano diana, etc. (Moreira y cols., 2013). El presente trabajo se va a centrar en su clasificación en función del órgano o tejido diana, tal y como establece la Comisión Europea (<http://publications.jrc.ec.europa.eu>):

- **Hepatotoxinas:** afectan principalmente al hígado. Algunos ejemplos de éstas son las **microcistinas**, producidas por diferentes géneros de cianobacterias como *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillaria*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Chrysoosporum*, y las **nodularinas**, producidas por los géneros *Nodularia*, *Nostoc*, etc. (Campos y cols., 2010).
- **Citotoxinas:** actúan principalmente dañando a las células o produciendo su muerte. En este grupo se encuentra la **cilindrospermopsina**, producida por los géneros *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Chrysoosporum*, entre otros (Moreira y cols., 2014).
- **Neurotoxinas:** actúan afectando al nervioso a través del bloqueo de los canales de sodio, uniéndose a los receptores de la acetilcolina, impidiendo la degradación de la acetilcolina, o produciendo la destrucción de células neuronales. Se trata de un grupo amplio en el que se encuentran la **anatoxina-a**, producida por algunos géneros como *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Microcystis* o *Cylindrospermopsis*, y las **saxitoxinas**, producidas por *Anabaena*, *Chrysoosporum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* o *Lyngbya* (Roset, 2001).
- **Dermatotoxinas:** producen daño a nivel dérmico. En este grupo podemos encontrar las **aplisiatoxinas**, producidas por los géneros *Lyngbya*, *Schizothrix*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Planktothrix*, *Microcystis* y *Oscillatoria*, entre otros. El contacto con éstas produce dermatitis severas e inflamación del tracto respiratorio (Arthur y cols., 2006).

### 1.2.1. Vías de exposición

Las cianotoxinas pueden encontrarse disueltas en el agua (por ejemplo la cilindrospermopsina), en el interior de las células (por ejemplo las microcistinas), o unidas externamente a ellas (lipopolisacáridos). Sin embargo, un porcentaje de éstas se encuentra en contacto con el agua, bien porque el envejecimiento de la floración haya inducido la liberación de las cianotoxinas por parte de las cianobacterias, o por rotura de las células (Buratti y cols., 2017). Por tanto, cualquier contacto de seres vivos con agua contaminada puede suponer el

inicio de una intoxicación, siendo las principales vías de entrada la vía dérmica por contacto directo con el agua, la vía oral por ingestión de agua o alimentos contaminados, la vía respiratoria a través de agua en spray, o incluso la vía parenteral (Funari y cols., 2008).

La vía oral es la vía más común de intoxicación en animales y humanos, principalmente por la contaminación de agua potable o la presencia de cianotoxinas en alimentos de consumo humano por bioacumulación de éstas a lo largo de la cadena trófica (Kinnear, 2010). La bioacumulación de cianotoxinas se ha demostrado en bivalvos y crustáceos (Gutiérrez-Praena y cols., 2013), los cuales pueden filtrar agua contaminada con toxinas, acumularlas en sus órganos y tejidos, y transferirlos a través de la cadena trófica a depredadores superiores (Saker y cols., 2005). De esta forma, los humanos pueden intoxicarse tras consumir bivalvos, crustáceos y peces contaminados (Ibelings y Chorus, 2007). Así mismo, las cianobacterias aparecen frecuentemente en sistemas acuáticos abiertos, como ríos, lagos u océanos, por lo que también pueden aparecer en aguas destinadas al regadío de plantas, por lo que las plantas pueden estar expuestas también a diferentes cianotoxinas y acumularlas en sus diferentes tejidos (Gutiérrez-Praena y cols., 2014; Pflugmacher y cols., 2006).

El presente trabajo se va a centrar en dos de las toxinas que mayor interés han despertado en los últimos años, las microcistinas, por ser una de las cianotoxinas más abundantes en la naturaleza, y la cilindrospermopsina, la cual ha despertado un gran interés debido a su elevada toxicidad.

### **1.2.2. Microcistinas**

Las microcistinas (MCs), tal y como se ha mencionado anteriormente, están producidas por diferentes géneros de cianobacterias, entre los que se encuentran *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Chrysothrix*, etc., destacando la especie *Microcystis aeruginosa* como una de las principales especies productoras (Prieto y cols., 2008).

Las MCs son moléculas con estructura de heptapéptido cíclico (Dawson, 1998). En ésta destaca la presencia de un aminoácido conocido como Adda (3-amino-9-metoxi-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoico) (Figura 3), el cual es clave para la actividad de las MCs, ya que es capaz de unirse covalentemente a los residuos de cisteína de las protein fosfatasas 1 y 2A (PP1 y PP2A), inhibiéndolas (Songs y cols., 2005). Además, según Nishiwaki-Matsushima y cols. (1991), la inhibición de estas proteínas podría conferirle a las MCs la capacidad de inducir tumores.

A día de hoy, hay descritos más de 240 congéneres de MCs (Spoof y Catherine, 2017). Esta diversidad de congéneres se debe a los diferentes aminoácidos que ocupan las posiciones 2 y 4 de la estructura molecular de las MCs (Figura 3).

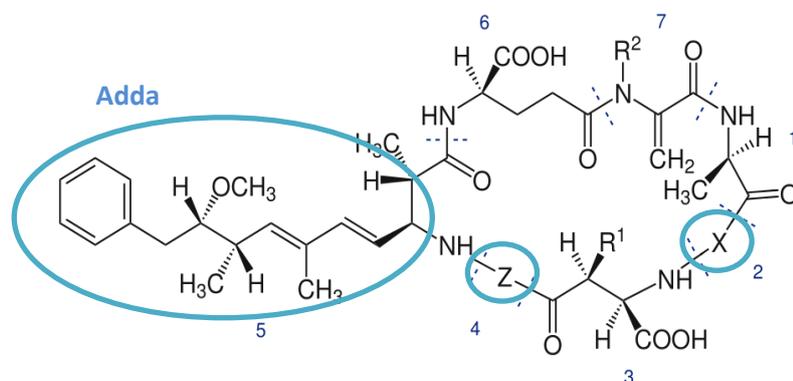


Figura 3. Estructura general de las microcistinas (MCs). Posición del resto Adda y posiciones 2 y 4 para la unión de aminoácidos. Adaptada de Chorus y Bratram, (1999).

Las MCs más comunes que se pueden encontrar en la naturaleza son MC-LR, MC-RR y MC-YR (Gupta y cols., 2003). MC-LR contiene en posición 2 una leucina (L) y en posición 4 arginina (R); MC-RR, contiene arginina en posición 2 y 4 (R); y MC-YR contiene en posición 2 tirosina (Y) y en posición 4 arginina (R). Según los aminoácidos que contenga la estructura, la toxicidad de las MCs va a variar, presentando MC-LR y MC-YR una toxicidad elevada, mientras que MC-RR presenta toxicidad más baja (Moreno y cols., 2003).

La MC-LR es una de las cianotoxinas que más comúnmente se puede encontrar en los "blooms", de ahí que sea una de las más estudiada (Bischoff, 2001), sin embargo, hay otras MCs, como MC-LF y MC-LW, más tóxicas que las anteriormente mencionadas, las cuales presentan una mayor lipofilia, pero que se encuentran en menor cantidad (Spoof y cols., 2003).

Algunos casos de intoxicación aguda por ingestión de agua contaminada se deben a un fallo en el sistema de depuración de aguas destinadas a consumo humano (Funari y Testai, 2008). Uno de los casos documentados más conocidos fue el que ocurrió en Caruaru, Brasil, donde 56 pacientes, de un total de 136, fallecieron tras someterse a un tratamiento de diálisis con agua contaminada por MCs (Azevedo y cols. 2002).

Los síntomas descritos tras la exposición oral a agua contaminada por MCs van desde gastroenteritis, dolor abdominal, hemorragias, malestar, daño hepático y renal, etc, mientras que la exposición dérmica produce irritación de la piel y erupciones cutáneas (Buratti y cols.,

2017). Además, Chen y cols. (2009) estudiaron la correlación entre el consumo de agua y alimentos contaminados con el aumento de marcadores séricos de hepatotoxicidad.

En respuesta al aumento de problemas relacionados con la salud a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido unos límites de seguridad para el agua potable a 1 µg/L MC-LR (Falconer y cols., 1999). Este valor se encuentra registrado en la legislación Española, RD 140/2003.

El mecanismo de acción más estudiado de las MCs es la inhibición de la proteína serina/treonina fosfatasa mediante la interacción con las subunidades catalíticas de éstas enzimas (Maynes y cols., 2006). Las MCs tienen gran afinidad por PP1 y PP2A, y en menor medida por PP2B (Yoshizawa y cols., 1990). La inhibición de dichas proteínas tiene como consecuencia la hiperfosforilación de diversas proteínas que forman parte del citoesqueleto de las células. Entre ellas encontramos la proteína Tau, una proteína que forma parte de los microtúbulos a nivel neuronal. Su excesiva fosforilación produce alteraciones que conducen a la agregación de la proteína y la consecuente alteración de la estructura celular, provocando finalmente la muerte por apoptosis de las células neuronales (Meng y cols., 2011).

La capacidad de MC-LR para producir especies reactivas de oxígeno (ERO) *in vivo* ha sido revisada por Amado y Monserrat (2010). Además, existen estudios *in vitro* que corroboran este hecho (Puerto y cols. 2009b, c, 2010), pudiéndose considerar la MC-LR como un potente inductor de estrés oxidativo. Bouaicha y cols. (2004) demostraron que MC-LR induce la formación de ERO y alteraciones intracelulares de glutatión (GSH) en cultivos primarios de hepatocitos de rata, produciéndose como consecuencia apoptosis de los hepatocitos y daño hepático. Por otra parte, las MCs están clasificadas en el grupo 2B de la Agencia Internacional de la Investigación sobre el Cáncer (IARC), como “posiblemente carcinogénica para humanos” ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)).

### 1.2.3. Cilindrospermopsina

La cilindrospermopsina (CYN), tal y como se ha mencionado anteriormente, es una cianotoxina producida por diversas especies de cianobacterias, destacando entre ellas *Cylindrospermopsis raciborskii* (Hawkings y cols., 1985). Otras especies productoras de CYN pueden ser *Anabaena bergii*, *Anabaena lapponica*, *Aphanizomenon flos-aquae* (Spoof y cols., 2006), *Aphanizomenon ovalisporum* (actualmente denominada *Chrysochloris ovalisporum*) (Zapomělová y cols., 2012), *Lyngbya wollei* (Seifert y cols., 2007), *Raphidiopsis curvata* (Li y cols., 2001) y *Umezakia natans* (Harada y cols., 1994), entre otras.

En cuanto a su estructura, la CYN es un alcaloide tricíclico compuesto por un resto de guanidina combinado con hidroximetiluracilo (Ohtani y cols., 1992) (Figura 4). El hecho de que en la molécula haya un grupo sulfato cargado negativamente y un grupo guanidinio cargado positivamente, hace que se convierta en un zwitterión, lo que le confiere una alta solubilidad en agua y gran estabilidad a temperaturas y pH extremos (Chiswell y cols., 1999). Debido a este hecho, aproximadamente el 90% de la CYN se encuentra fuera de la célula, disuelta en el agua (Rücker y cols., 2007). Esto hace que los humanos sean más susceptibles de sufrir una intoxicación por CYN, lo que le confiere una gran importancia desde el punto de vista sanitario.

A lo largo de los años se han descrito diferentes variantes de la CYN tales como 7-epi-CYN, 7-desoxi-CYN, 7-desoxi-desulfo-CYN y 7-deoxi-desulfo-12-acetil-CYN (Wimmer y cols., 2014) (Figura 5).

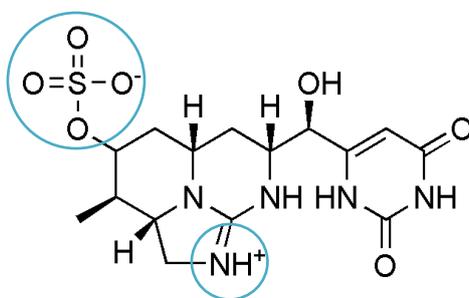


Figura 4. Estructura general de la cilindrospermopsina (CYN). Posición del grupo sulfato y el grupo guanidinio. Adaptada de Hiller y cols. (2007).

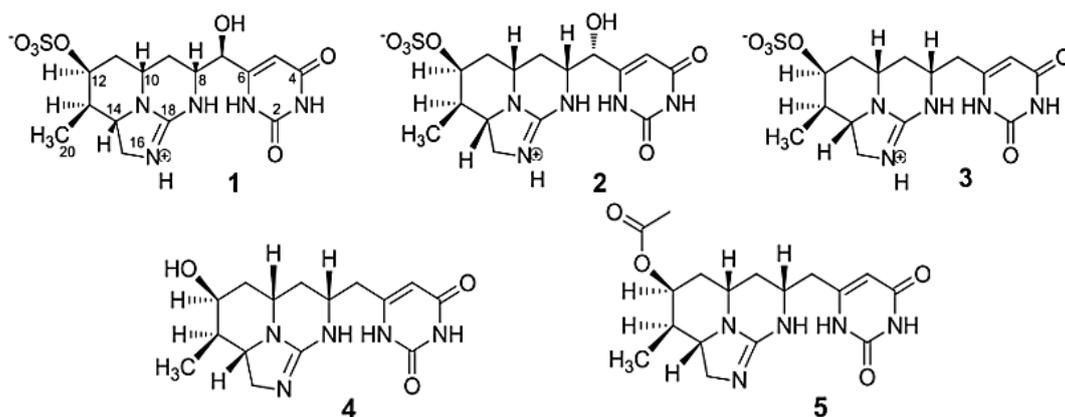


Figura 5. Variantes de cilindrospermopsina: (1) cilindrospermopsina; (2) 7-epi-cilindrospermopsina; (3) 7-desoxi-cilindrospermopsina; (4) 7-desoxi-desulfo-cilindrospermopsina; (5) 7-desoxi-desulfo-12-acetilcilindrospermopsina. Imagen tomada de Wimmer y cols. (2014).

Uno de los primeros casos de intoxicación por CYN fue en Palm Island (Queensland, Australia), en 1979. En este episodio, 138 niños de entre 2-16 años de edad y 10 adultos jóvenes presentaron malestar general, vómitos, anorexia y hepatomegalia que posteriormente progresó a diarrea sanguinolenta, con una duración de hasta 3 semanas, shock acidótico y hematuria. La posterior investigación reveló que los pacientes habían estado bebiendo agua de un contaminado con una floración de cianobacterias productoras de CYN. A esta sintomatología se le une la aparición de hemorragias, diarreas, dermatitis y neumonía, entre otras (Pouria y cols., 1998).

Diversos estudios en ratones han demostrado que el principal órgano diana de la CYN es el hígado. Sin embargo, también pueden verse afectados otros órganos como corazón, timo, bazo y riñón (Falconer y cols., 1999; Seawright y cols., 1999). La CYN actúa principalmente inhibiendo la síntesis de proteínas y de GSH (Terao y cols., 1994; Runnegar y cols., 1995). Además, se ha estudiado la capacidad de CYN de producir estrés oxidativo y, como consecuencia, peroxidación lipídica, debido a que es capaz de reducir la actividad de diferentes enzimas con acción antioxidante, como son la glutatión-S-transferasa y la glutatión peroxidasa (Gutiérrez-Praena y cols., 2013; Guzmán-Guillén y cols., 2015). Es por ello, que podría considerarse que el estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad de la CYN, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Hay evidencias de que se trata de una cianotoxina con actividad citotóxica, genotóxica y carcinogénica (Humpage y cols., 2005; Maire y cols., 2010; Bazin y cols., 2010). Si bien actualmente no hay muchos estudios sobre los mecanismos por los que produce genotoxicidad y carcinogenicidad, Shen y cols. (2002) establecieron la posibilidad de que CYN sea genotóxica por su capacidad de unirse covalentemente al ADN y producir la rotura del mismo. Por sus características, la molécula es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), lo cual ha sido propuesto por diferentes autores (Kagalou y cols., 2008; Papadimitriou y cols., 2012), y es por ello que podría actuar a nivel del sistema nervioso, produciendo neurotoxicidad, además la existencia de algunos estudios avalan esta teoría (Guzmán-Guillén y cols., 2015; Takser y cols., 2016).

### 1.3. Neurotoxicidad

Según el Interagency Committee on Neurotoxicology (ICON), se conoce como neurotoxicidad cualquier alteración sobre la estructura o la función central y/o periférica del sistema nervioso por un agente biológico, químico o físico, pudiendo ser estos efectos neurotóxicos reversibles o irreversibles, así como causa de acciones directas o indirectas sobre el sistema nervioso (Erinoff, 1995). En este sentido, se ha descrito que algunas cianotoxinas presentan efectos neurotóxicos, entre ellas la anatoxina-a y las saxitoxinas, de las cuales se conoce su mecanismo de acción (Carmichael, 1994; Roset, 2001).

La anatoxina-a es un agonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina (ACh) a nivel neuronal y muscular (Aróoz y cols., 2010). A diferencia de la ACh, la anatoxina-a no es degradada por la acetilcolinesterasa (AChE), por lo que la activación del receptor nicotínico es continuada, lo que conlleva a un flujo constante de iones sodio a las células y una despolarización de la membrana (Valério y cols., 2010) (Figura 6). De forma paralela, esta toxina produce un aumento de ACh en el espacio sináptico, ya que es capaz de inhibir irreversiblemente a la AChE (Molica y cols., 2005).

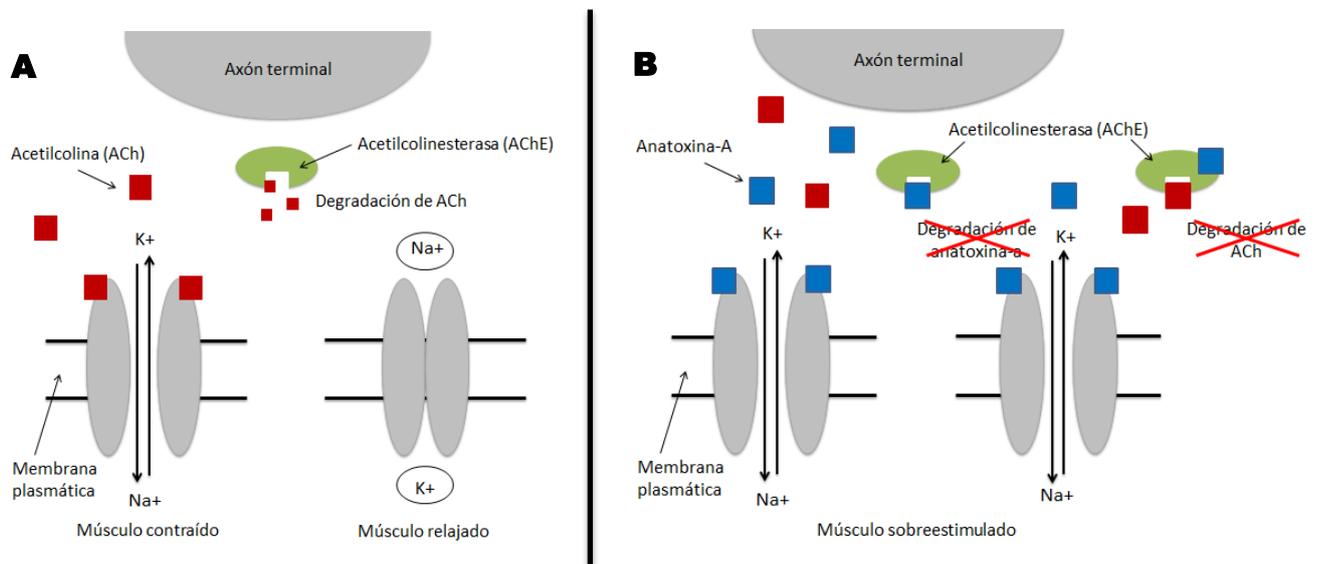


Figura 6. (A) Mecanismo de acción de la acetilcolina (ACh) en condiciones normales. (B) Mecanismo de acción de la anatoxina-a; estimulación constante de los receptores nicotínicos al no ser degradada por la acetilcolinesterasa (AChE) e inhibición de la degradación de ACh por unión irreversible de la anatoxina-a a la AChE. Imagen de creación propia.

Por otra parte, las saxitoxinas actúan bloqueando los canales de sodio y de calcio de la membrana celular del axón (Figura 7) (Van Apeldoorn y cols., 2007). Estos canales están implicados en la regulación de la transducción de señales, como la apoptosis o el ciclo celular, por lo que las saxitoxinas pueden afectar a los organismos a estos niveles, alterando el ciclo o produciendo la muerte celular (Belkacemi y cols., 2005). Además, se ha estudiado la acción de las saxitoxinas sobre los canales de potasio de las células del músculo cardíaco, alterando el flujo iónico, por lo que se produce una alteración de la homeostasis celular (Wang y cols., 2003).

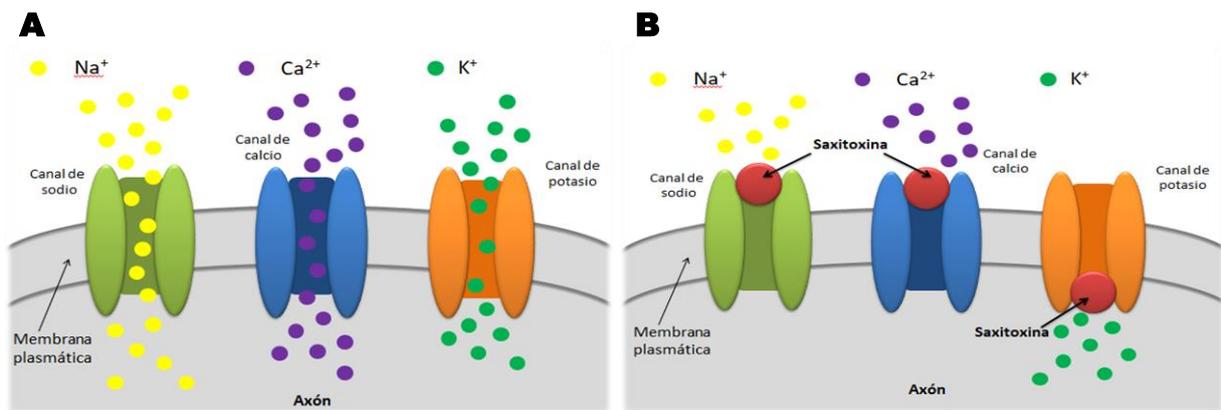


Figura 7. (A) Visualización de los canales de sodio, calcio y potasio en condiciones normales. (B) Mecanismo de acción de las saxitoxinas mediante el bloqueo de los canales. Imagen de creación propia.

En cuanto a MCs y CYN, son pocos los estudios que se han realizado hasta el momento y hay cierta controversia sobre su neurotoxicidad, por lo que el presente trabajo se va a centrar en investigar la posible neurotoxicidad de ambas cianotoxinas. Además, debido a que es muy común que ambas toxinas aparezcan en combinación en la naturaleza, el estudio de los efectos de ambas cianotoxinas en combinación también es de gran interés.

## 2. OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es demostrar la potencial neurotoxicidad inducida por MC-LR y CYN mediante el estudio de la citotoxicidad en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Además, también se ha realizado el estudio de la acción neurotóxica que ambas toxinas pudieran producir en combinación, con el fin de poder estudiar posibles efectos sinérgicos/antagonistas de ambas toxinas para investigar sus efectos en un escenario más real de exposición.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Compuestos químicos

Las toxinas MC-LR y CYN (ambas con una pureza >95% medida por HPLC) se adquirieron de Palex Medical (Barcelona, España). El medio mínimo esencial (MEM, por sus siglas en inglés), los reactivos de cultivo celular y el suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) se obtuvieron en Biomol (Sevilla, España). La mezcla de nutrientes F-12 Ham se obtuvo en Sigma-Aldrich (Madrid, España).

El MTS (sal de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolilo) Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay se obtuvo de Promega (Madrid, España). Los reactivos para el ensayo de rojo neutro (RN) se obtuvieron en Sigma-Aldrich (Madrid, España).

#### 3.2. Modelo experimental

Las células SH-SY5Y, derivadas de neuroblastoma humano (Figura 8), fueron suministradas por la American Type Culture Collection (ATCC; CRL-2266). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa (incubadora de CO<sub>2</sub>, NuAire®, España) en un medio consistente en MEM y F-12 (1:1) suplementado con 10% de FBS, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio, 1% de L-glutamina 200mM y 1% de solución de penicilina/estreptomicina. Las células se sembraron en frascos venteados de 75 cm<sup>2</sup> y subcultivadas 3 veces por semana con tripsina-EDTA (1X). Para el subcultivo y siembra de placas para los experimentos, las células se cuantificaron en una cámara de Neubauer.



Figura 8. Visualización de un cultivo de la línea celular SH-SY5Y en microscopio óptico. Fotografía propia.

### **3.3. Soluciones de toxinas**

Para los diferentes ensayos, se prepararon una solución madre de 4 mg/mL de MC-LR en etanol absoluto (EtOH) y otra de 1 mg/mL de CYN en agua milliQ. Ambas soluciones se mantuvieron a -20°C hasta su uso. Partiendo de dichas soluciones se realizaron diferentes diluciones seriadas en medio sin suero: 0-100 µg/mL para MC-LR y 0-10 µg/mL para CYN. Además, se preparó una dilución seriada de EtOH (0-3%).

### **3.4. Ensayos de citotoxicidad**

Las células SH-SY5Y se sembraron en placas de 96 pocillos para las pruebas de citotoxicidad basal y se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de la exposición. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio de crecimiento y las células se expusieron a las diferentes concentraciones de cianotoxinas. También se incluyeron el control del vehículo (EtOH) para MC-LR y un control negativo (células no tratadas) para ambas toxinas. Nuevamente, las placas se incubaron a 37°C durante 24 y 48 horas. Los biomarcadores de citotoxicidad basal evaluados fueron la captación celular de rojo neutro (RN) y la reducción de sal de tetrazolio (MTS). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El ensayo de citotoxicidad de RN se basa en la capacidad que presentan las células vivas para absorber e incorporar este colorante. Se trata de un colorante de naturaleza débilmente catiónica que es capaz de penetrar en la membrana celular por difusión pasiva y concentrarse en los lisosomas. La absorción de colorante RN va a depender de la capacidad que tengan las células para mantener los gradientes de pH. A pH fisiológico, el colorante se encuentra con carga neta, por lo que puede penetrar fácilmente en la membrana de las células. Dentro de los lisosomas hay un gradiente de protones que mantiene un pH más bajo que el del citoplasma, por lo que cuando el colorante penetra en los lisosomas, se carga y queda retenido dentro de ellos (Borenfreund y Puerner, 1985). Para la evaluación de este biomarcador, se eliminó el medio de exposición transcurridas las 24 o 48 horas de exposición. A continuación se añadió un volumen por pocillo de la solución de trabajo de RN y se llevó de nuevo a la incubadora durante 3 horas para permitir la captación de RN por parte de los lisosomas de las células viables. Posteriormente, se retira el medio y se añade una solución de formaldehído-CaCl<sub>2</sub> para fijar las células, dejándola actuar durante 2 minutos. Se elimina esta solución y se añade una solución de ácido acético-etanol-agua (1:49:50) para extraer el RN de las células, dejándolo agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, se mide la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

El ensayo de la reducción de MTS se utiliza para medir o cuantificar la actividad mitocondrial de las células, ya que si las mitocondrias se encuentran en buen estado van a ser capaces de reducir este compuesto, apreciándose un cambio de color (Baltrop y cols., 1991). Para llevar a cabo el ensayo de este biomarcador, se añadió la solución de MTS a cada uno de los pocillos y seguidamente se incubaron las placas a 37°C durante, al menos, 2 horas. Posteriormente, se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro. Debido a que el MTS es fotosensible el ensayo se realizó en oscuridad.

A partir de los resultados obtenidos para ambos ensayos de citotoxicidad se calcularon las concentraciones efectivas media ( $CE_{50}$ ), de manera que pudiera establecerse cuál es el biomarcador más sensible tras 24 horas de exposición, además de las concentraciones de cianotoxinas a emplear en el experimento de combinación.

### **3.5. Evaluación del efecto de la combinación de cianotoxinas mediante el método de isobogramas**

Los valores de  $CE_{50}$  obtenidos para el punto final más sensible a las 24h se seleccionaron como las concentraciones de exposición más altas para los estudios de combinación, además de las fracciones  $CE_{50}/2$  y  $CE_{50}/4$ . Así, las células fueron expuestas durante 24 y 48 horas a combinaciones binarias de las cianotoxinas puras:  $CE_{50}$  MC-LR +  $CE_{50}$  CYN,  $CE_{50}/2$  MC-LR +  $CE_{50}/2$  CYN y  $CE_{50}/4$  MC-LR +  $CE_{50}/4$  CYN. Además, cada concentración utilizada en las combinaciones se evaluó para cada cianotoxina de manera individual, de manera que fuera posible realizar una comparación precisa. Al haber sido el MTS el biomarcador más sensible, fue este el seleccionado para llevar a cabo el presente ensayo.

Una vez realizadas las exposiciones y obtenidos los datos de absorbancia, se empleó el método de isobogramas para determinar el tipo de interacción que se produce cuando MC-LR y CYN están en combinación. Este método se llevó a cabo de acuerdo con Tatay y cols. (2014). El análisis de isobogramas se basa en trazar las curvas de concentración-efecto para cada compuesto y sus combinaciones en múltiples concentraciones diluidas (Chou y Talalay, 1984; Chou, 2006). Estos autores introdujeron el término de índice de combinación (IC) para la cuantificación de la sinergia, la aditividad o el antagonismo que pudiera existir entre dos compuestos. Cuando el  $IC < 1$ , indica sinergismo; cuando  $IC = 1$ , indica aditividad; y cuando  $IC > 1$ , indica antagonismo. Para el cálculo de estos valores de IC se empleó el programa CalcuSyn (versión 2.1) (Biosoft, Cambridge, Reino Unido, 1996-2007).

### 3.6. Cálculos y análisis estadístico

Los datos para los ensayos de citotoxicidad se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) con respecto al control. Para el análisis estadístico se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), seguido de las pruebas de comparación múltiple de Dunnett, en la que se comparan todas las concentraciones con respecto al grupo control, utilizando el programa GraphPad InStat 3 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EE.UU.). Las diferencias se consideraron significativas a partir de  $P < 0,05$ . Los valores de  $CE_{50}$  se derivaron por regresión lineal en las curvas de concentración-respuesta.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ensayos de citotoxicidad

Tras analizar los datos obtenidos con respecto a MC-LR, se observó una disminución significativa de la viabilidad de las células SH-SY5Y dependiente de la concentración y el tiempo de exposición después de su exposición a 0-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de MC-LR a las 24 y 48 horas. En el ensayo MTS, los resultados fueron significativos a partir de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tras 24 y 48 horas de exposición. Los valores de  $CE_{50}$  obtenidos para este parámetro fueron  $34,41 \pm 1,89 \mu\text{g}/\text{mL}$  y  $22,28 \pm 2,08 \mu\text{g}/\text{mL}$  tras 24 y 48 horas de exposición, respectivamente (Figura 9A). Por otro lado, en el ensayo de RN la diferencia significativa se observó a partir de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  después de 24 horas de exposición y de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tras 48 horas. Los valores de  $CE_{50}$  obtenidos fueron de  $41,80 \pm 1,65 \mu\text{g}/\text{mL}$  y  $24,21 \pm 0,45 \mu\text{g}/\text{mL}$  tras 24 y 48 horas de exposición, respectivamente (Figura 9B). En este caso también se realizó una prueba del disolvente, de manera que se realizaron los ensayos de manera similar exponiendo a las células a 0-3 % de EtOH. Sin embargo, no se observó una disminución significativa de la viabilidad celular (datos no mostrados).

Con respecto a CYN, también se observó una disminución de la viabilidad dependiente de la concentración y el tiempo tras la exposición a 0-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el ensayo MTS, se obtuvieron resultados significativos a partir de 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CYN en ambos períodos de exposición. Los valores de  $CE_{50}$  obtenidos fueron de  $0,68 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{mL}$  y  $0,32 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{mL}$  tras 24 y 48 horas de exposición, respectivamente (Figura 10A). Con respecto al ensayo de RN, la reducción significativa de la viabilidad se dio a partir de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para 24 horas y 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para 48 horas, siendo los valores de  $CE_{50}$  obtenidos de  $0,8 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{mL}$  y  $0,7 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{mL}$  después de 24 y 48 horas, respectivamente (Figura 10B).

Para ambas toxinas, el biomarcador más sensible resultó ser el MTS, el cual se empleó en los posteriores ensayos.

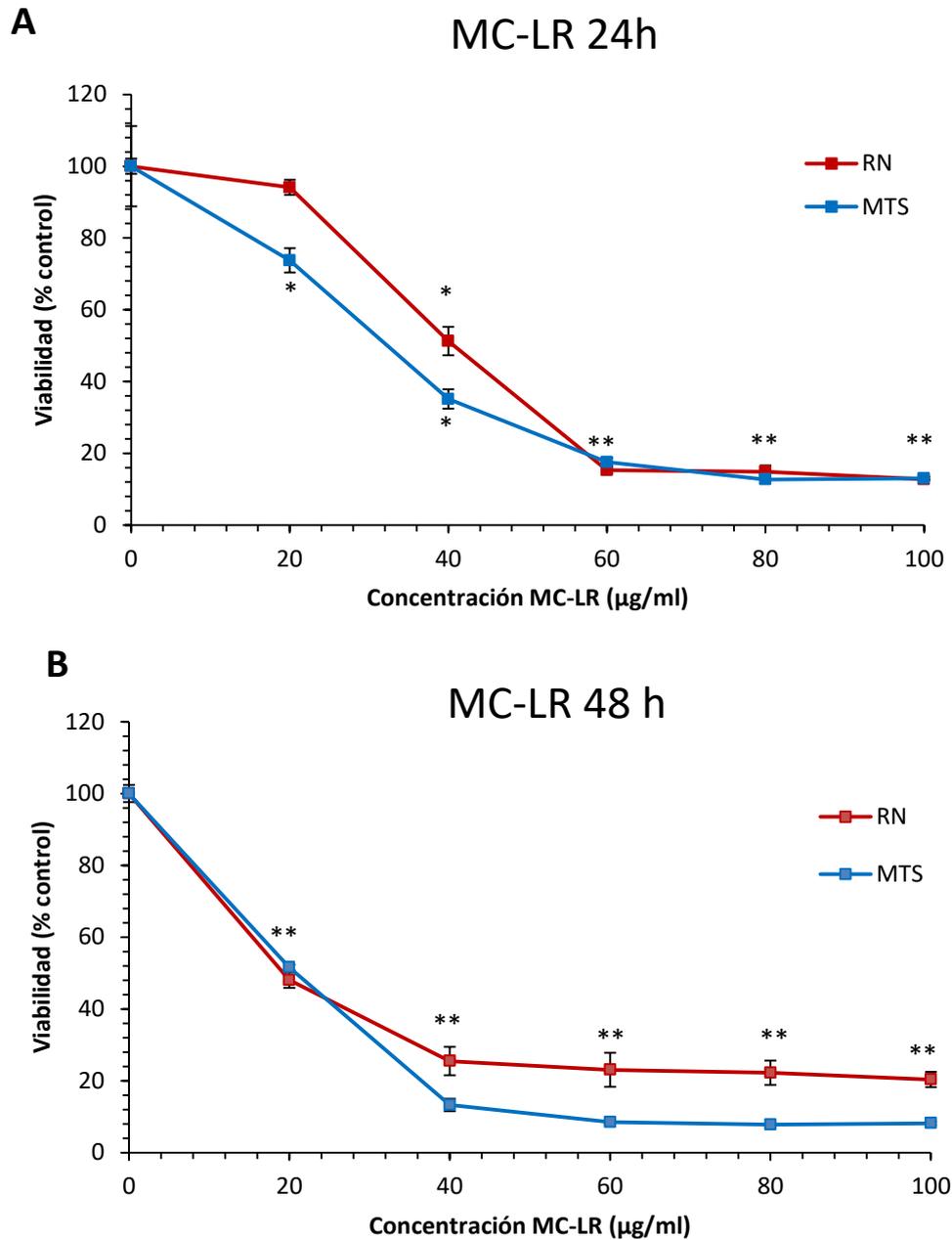


Figura 9. Ensayo de la reducción de la sal de tetrazolio (MTS) y captación de rojo neutro (RN) en células SH-SY5H tras 24 horas (A) y 48 horas (B) de exposición a 0–100 µg/mL de MC-LR. Resultados expresados como la media ± la desviación estándar. \* Diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ).

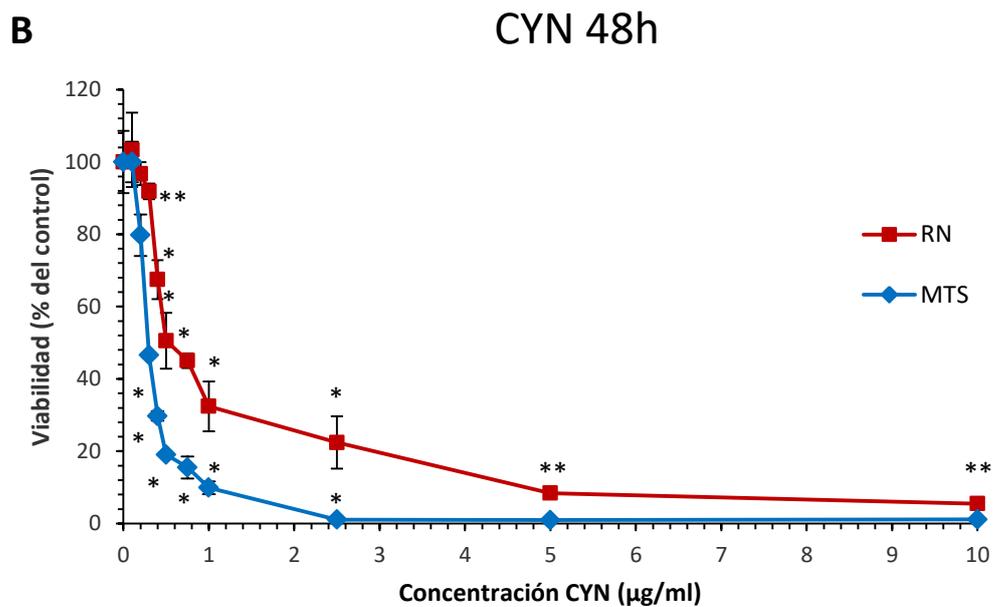
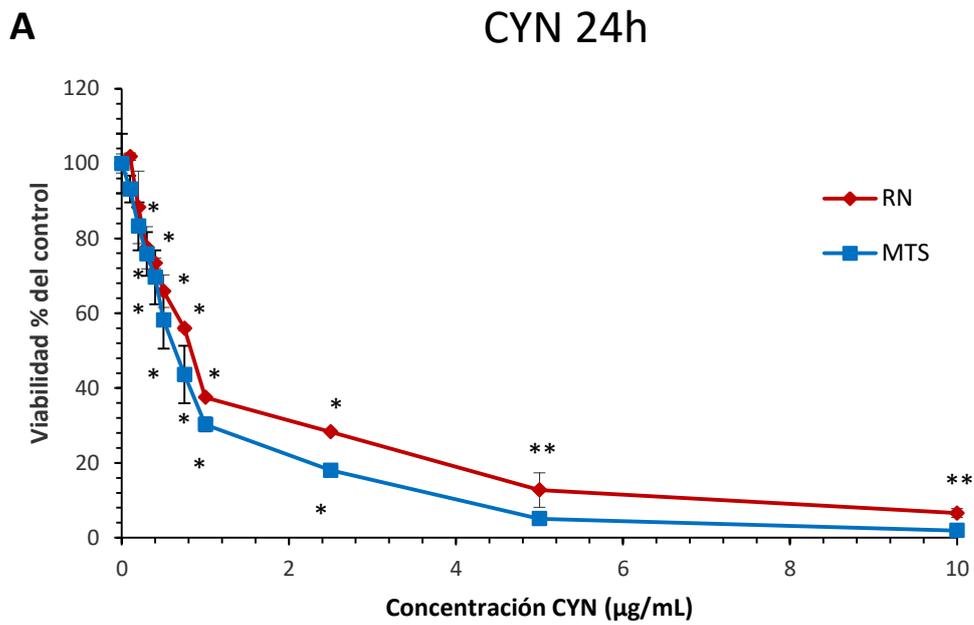
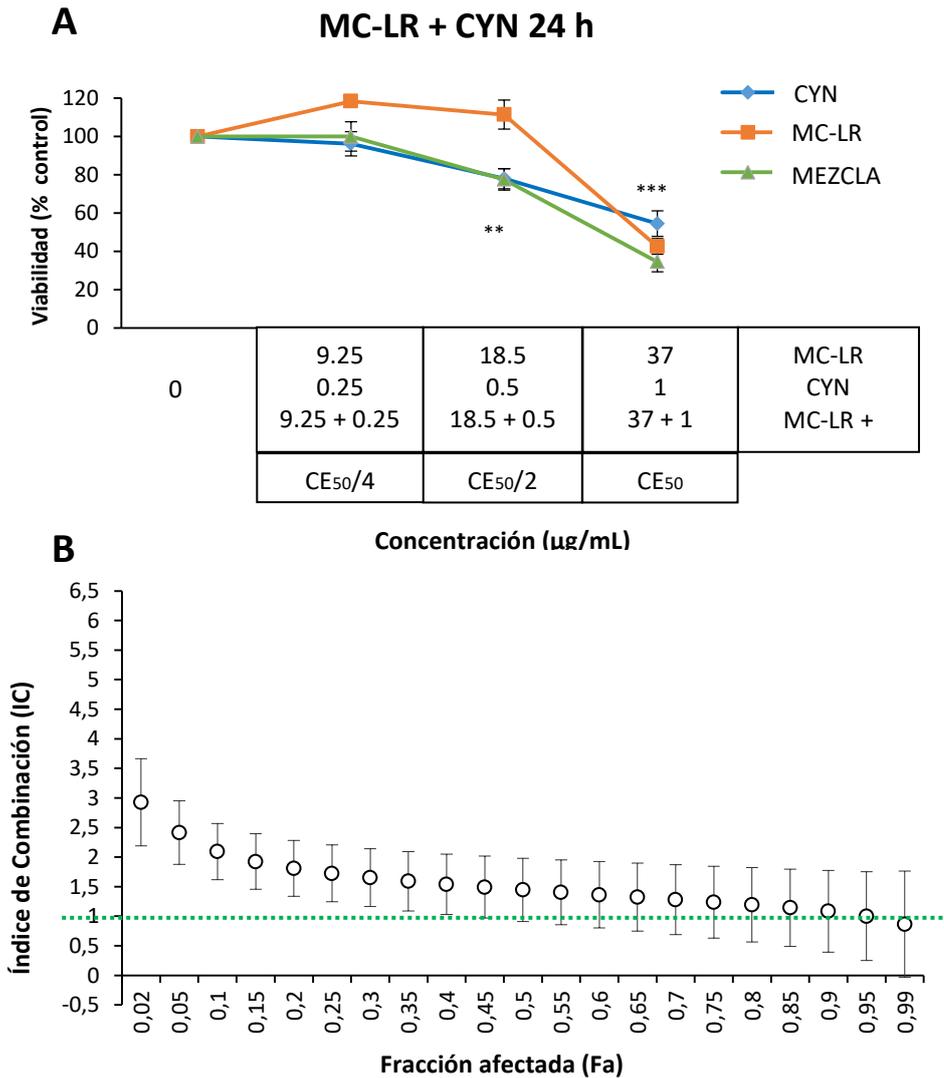


Figura 10. Ensayo de la reducción de la sal de tetrazolio (MTS) y captación de rojo neutro (RN) en células SH-SY5H tras 24 horas (A) y 48 horas (B) de exposición a 0–10 µg/mL de CYN. Resultados expresados como la media ± la desviación estándar. \* Diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Evaluación del efecto de la combinación de MC-LR y CYN por el método de isobologramas

En las figuras 11 y 12 se muestran las curvas de concentración-respuesta correspondientes a la combinación de MC-LR y CYN tras realizar el ensayo de MTS. La combinación resultó ser más citotóxica en comparación a las cianotoxinas individuales a la concentración más alta ensayada y tras 24 y 48 horas de exposición.



**Figura 11.** (A) Ensayo de la reducción de la sal de tetrazolio (MTS) y (B) curva del índice de combinación (IC)/fracción afectada (fa) en células SH-SY5Y tras 24 horas de exposición a diferentes concentración de la mezcla de MC-LR y CYN. La línea de puntos (IC=1) se corresponde con la aditividad, el área bajo la línea indica sinergia y el área sobre la línea indica antagonismo. Resultados expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. \* Diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ).

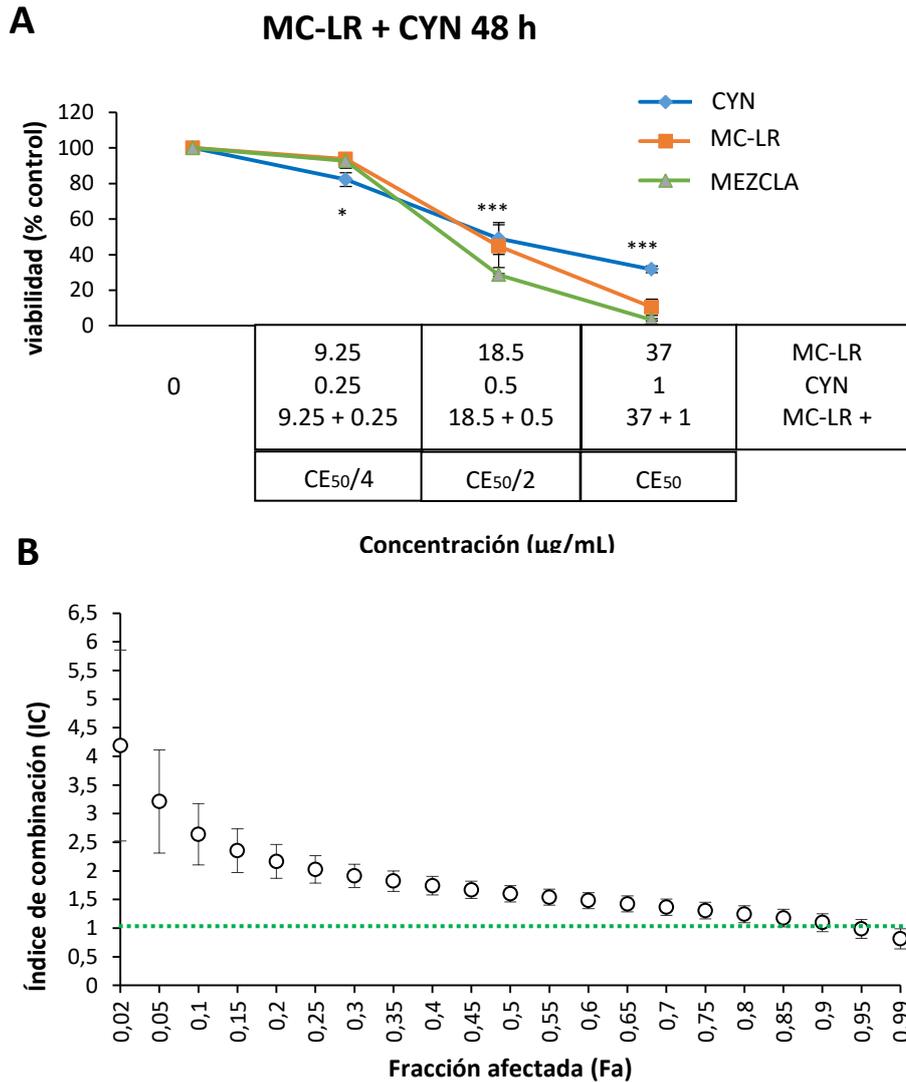


Figura 12. (A) Ensayo de la reducción de la sal de tetrazolio (MTS) y (B) curva del índice de combinación (IC)/fracción afectada (fa) en células SH-SY5Y tras 48 horas de exposición a diferentes concentración de la mezcla de MC-LR y CYN. La línea de puntos (IC=1) se corresponde con la aditividad, el área bajo la línea indica sinergia y el área sobre la línea indica antagonismo. Resultados expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. \* Diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ).

Tras la evaluación de la combinación de cianotoxinas a 24 horas se obtuvo un  $IC > 1$  a concentraciones bajas, lo que demuestra que estas toxinas en combinación presentan una acción antagonista. Sin embargo, con el aumento de la concentración se observó que los valores de IC se aproximaban a 1, pasando desde un efecto antagónico a un posible efecto aditivo. Este mismo patrón se observó cuando las células se expusieron a la combinación durante 48 horas, si bien se observaron efectos más marcados que a las 24 horas.

## 5. DISCUSIÓN

Los estudios realizados hasta el momento sobre la toxicidad de MC-LR y CYN *in vitro* se han centrado en líneas celulares renales y hepáticas (Chen y Xie, 2016; McLellan y Manderville, 2017; Pichardo y cols., 2017). Sin embargo, estos estudios son escasos en líneas celulares neuronales, aunque se ha observado que estas toxinas podrían inducir efectos neurotóxicos en algunos estudios *in vivo e in vitro* (Guzmán-Guillén y cols., 2015; Rozman y cols., 2017). El presente trabajo se centra en estudiar, por primera vez, los efectos inducidos por MC-LR, CYN y su combinación en la línea celular neuronal SH-SY5Y.

Respecto a la MC-LR, diversos estudios han descrito una disminución de la viabilidad celular en diferentes líneas celulares tras su exposición a MC-LR (Cai y cols., 2015; Li y cols., 2015; Rozman y cols., 2017). Estos autores utilizaron en su mayoría concentraciones de hasta 10  $\mu\text{M}$  de MC-LR durante 24, 48 o 72 horas de exposición. Solo Cai y cols. (2015) fueron capaces de establecer un valor de  $\text{CE}_{50}$  para MC-LR. Hay evidencias de que los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (Organic Anion Transporting Polypeptide, OATPs) son clave para la toxicidad de la MC-LR, siendo la subfamilia OATP1B un grupo de transportadores de MCs (Fischer y cols., 2005), si bien su presencia es escasa en el sistema nervioso (Rozman y cols., 2017). Además, Fischer y cols. (2005) sugirieron que los transportadores de OATP1A2 expresados en células endoteliales capilares del cerebro y en la membrana celular de las neuronas, podrían participar en el transporte de MC-LR a través de la BHE, mientras que Ding y cols. (2017) fueron capaces de demostrar que OATP1A5 actúa como transportador de la MC-LR a las células neuronales. En base a estos hechos es posible confirmar que la toxicidad de MC-LR a nivel del sistema nervioso solo evoluciona cuando ésta es transportada a través de OATPs, aunque también podrían intervenir otro tipo de transportadores (Feurstein y cols., 2009; 2011). Sin embargo, la neurotoxicidad de las MCs parece ser un proceso de múltiple vías. Cai y cols. (2015) demostraron que la MC-LR es capaz de alterar la homeostasis del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en las neuronas, produciendo un aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Así, Feurstein y cols. (2011) y Rozman y cols. (2017) demostraron que MC-LR indujo la muerte celular por apoptosis mediante la activación de proteínas caspasas en células primarias de CGN (neuronas granulares del cerebelo) y astrocitos primarios de rata, respectivamente. Estos hallazgos respaldan nuestros resultados, ya que nuestro biomarcador de citotoxicidad más sensible fue el ensayo MTS, que evalúa la viabilidad y actividad mitocondrial, relacionadas con la muerte celular (Tait y Green, 2013).

En cuanto a la CYN, los estudios referidos a su citotoxicidad a nivel del sistema nervioso son escasos. Es probable que debido a su pequeño tamaño y a su comportamiento como zwitterón sea capaz de atravesar la membrana celular por difusión pasiva, pudiendo atravesar de esa forma la BHE (Valério y cols., 2010). En uno de sus estudios, Takser y cols. (2016) obtuvieron un valor de  $CE_{50}$  para CYN entre 0,1-10  $\mu$ M en células N2a tras 24, 48 y 72 horas de exposición. Además, estos autores mostraron que la CYN indujo una muerte celular casi total en células RAW264.7 y Bv-2 a una concentración de 10  $\mu$ M. Kiss y cols. (2002) llevaron a cabo un estudio *in vivo* sobre dos especies de caracoles, exponiéndolos a CYN y demostrando una notable disminución de la respuesta neuronal a la ACh y, por tanto, alterando la actividad del sistema nervioso. Por otro lado, Guzmán-Guillén y cols. (2015) hicieron un estudio en peces tilapia (*Oreochromis niloticus*), expuestos a CYN, observando una inhibición de la AChE y aumento de peroxidación lipídica en el cerebro, demostrando su neurotoxicidad.

Dado que MC-LR y CYN pueden aparecer juntas en la naturaleza (Bittencourt Oliveira y cols., 2014; Oehrle y cols., 2010), resulta de interés estudiar el efecto que pudieran producir en combinación además de sus efectos de forma aislada. En el presente trabajo, la combinación de estas cianotoxinas resultó ser más citotóxica en comparación a la citotoxicidad de las cianotoxinas de forma aislada tras 24 y 48 horas de exposición en células SH-SY5Y. Como se ha descrito, aunque en el ensayo de citotoxicidad se observaba que la combinación de ambas toxinas producía un daño mayor a concentraciones elevadas, su posterior análisis mediante el método de isobogramas desveló que la combinación de MC-LR y CYN es de naturaleza antagónica con tendencia a la aditividad a altas concentraciones. Cabe decir que este método solo permite la determinación cuantitativa (matemática) de sinergismo, aditividad o antagonismo, sin tener en cuenta la absorción de las sustancias o los mecanismos de acción por los que éstas puedan actuar, haciendo algo más complicada la interpretación de los resultados. En relación a esto, Takser y cols. (2016) estudiaron la combinación de MC-LR, CYN y anatoxina-a en una proporción equimolar, observándose una reducción significativa de la viabilidad celular en células N2a después de 24, 48 y 72 horas de exposición. Estos autores observaron que la combinación era más tóxica en comparación con los compuestos individuales, sin embargo, sugirieron que la CYN podría ser la cianotoxina mayor responsable de esa toxicidad.

## **6. CONCLUSIÓN**

De esta forma, los resultados del presente estudio mostraron que MC-LR y CYN de forma individual inducían daños en la línea celular neuronal SH-SY5Y, demostrando con ello que ambas toxinas presentan efectos neurotóxicos. Además, la combinación de ambas cianotoxinas presentó mayor citotoxicidad, lo que resalta el papel que esta combinación podría jugar en la naturaleza, más teniendo en cuenta la cada vez más elevada frecuencia con la que ambas se encuentran en el mismo medio acuático. De cualquier forma, se hace necesaria la continuación de los estudios, de manera que puedan ampliarse los conocimientos de los efectos que MC-LR y CYN pudieran tener sobre el sistema nervioso y su posible relación con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Amado LL, Monserrat JM. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. *Environment International*. 2010; 36(2): 226–235
- Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*. 2010; 56(5): 813-898.
- Arthur KE, Limpus CJ, Roelfsema CM, Udy JW, Shaw GR. A bloom of *Lyngbya majuscula* in Shoalwater Bay, Queensland, Australia: an important feeding ground for the green turtle (*Chelonia mydas*). *Harmful Algae*. 2006; 5: 251–265.
- Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*. 2002; 181–182: 441–446.
- Bartrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic Med Chem Lett*. 1991; 1: 611–614.
- 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.
- Belkacemi L, Bédard I, Simoneau L, Lafond J. Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: A review. *Cell Calcium*. 2005; 37(1): 1-8.
- Bischoff K. The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment. *Veterinary and Human Toxicology*. 2001; 43(5): 294-297.
- Bittencourt-Oliveira MDC, Piccin-Santos V, Moura AN, Aragão-Tavares NKC, Cordeiro-Araújo MK. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *An Acad Bras Cienc*. 2014; 86(1): 297–309.
- Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*. 1985; 24(2-3): 119–24.
- Bouaicha N, Maatouk I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett*. 2004; 148(1-2): 53–63.

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; 91(3): 1049–130.

Cai F, Liu J, Li C, Wang J. Intracellular calcium plays a critical role in the microcystin-Lr elicited neurotoxicity through PLC/IP3 pathway. *Int J Toxicol.* 2015; 34: 551–8.

Campos A, Vasconcelos V. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11: 268-287.

Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology.* 1992; 72(6): 445-459.

Carmichael WW. The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American.* 1994; 270(1): 78-84.

Chen J, Xie P, Li L, Xu J. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicol.* 2009; 108(1): 81–89.

Chen L, Xie P. Mechanisms of Microcystin-induced Cytotoxicity and Apoptosis. *Mini Reviews. Med Chem.* 2016; 16(13): 1018–31.

Chiswell RK, Shaw GR, Eaglesham G, Smith MJ, Norris RL, Seawright AA, et al. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environ. Toxicol.* 1999; 14(1): 155–161.

Chorus I, Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* E & FN Spon, London, New York. 1999.

Chou T. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(3): 621–681.

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984; 22: 27–55.

Dawson RM. The toxicology of microcystins. *Toxicon.* 1998; 36: 953-962.

Ding J, Wang J, Xiang Z, Diao W, Su M, Shi W, Wan T, Han X. The organic anion transporting polypeptide 1a5 is a pivotal transporter for the uptake of microcystin-LR by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Aquat Toxicol.* 2017; 182: 1-10.

Duy TN, Lam PK, Shaw GR, Connell DW. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2000; 163: 113–185.

- Erinoff L. General considerations in assessing neurotoxicity using neuroanatomical methods. *Neurochemistry International*. 1995; 26(2): 111-114.
- Falconer IR. Health problems from exposure to cyanobacteria and proposed safety guidelines for drinking and recreational water. En: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E. Detection methods for cyanobacterial toxins. Royal Society of Chemistry. London: The Royal Society of Chemistry; 1994. P.3-10.
- Falconer IR, Hardy SJ, Humpage AR, Froscio SM, Tozer GJ, Hawkins PR. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss Albino mice. *Environmental Toxicology*. 1999; 14(1): 143–50.
- Falconer IR, Humpage AR. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environ Toxicol*. 2006; 21(4): 299–304.
- Feurstein D, Holst K, Fischer A, Dietrich DR. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 234(2): 247–55.
- Feurstein D, Stemmer K, Kleinteich J, Speicher T, Dietrich DR. Microcystin congener and-concentration-dependent induction of murine neuron apoptosis and neurite degeneration. *Toxicol Sci*. 2011; 124(2): 424–431.
- Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 203:257–63.
- Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol*. 2008; 38(2): 97–125.
- Gupta N, Pant SC, Vijayaraghavan R, Rao PVL. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*. 2003; 188(2-3): 285–296.
- Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Cameán AM. Oxidative stress responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a single dose of pure cylindrospermopsin under laboratory conditions: Influence of exposure route and time of sacrifice. *Aquat Toxicol*. 2011; 105(1-2): 100–106.
- Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Cameán AM. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 53: 139-152.

Gutiérrez-Praena D, Campos A, Azevedo J, Neves J, Freitas M, Guzmán-Guillén R, y cols. Exposure of *Lycopersicon esculentum* to Microcystin-LR: Effects in the Leaf Proteome and Toxin Translocation from Water to Leaves and Fruits. *Toxins*. 2014; 6(6): 1837-1854.

Guzmán-Guillén R, Manzano IL, Moreno IM, Ortega AIP, Moyano R, Blanco A, Cameán AM. Cylindrospermopsin induces neurotoxicity in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to *Aphanizomenon ovalisporum*. *Aquat Toxicol*. 2015; 161: 17–24.

Harada K, 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(1): 73–84.

Hawkins PR, Runnegar M T C, 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 supply reservoir. *Appl Environ Microbiol*. 1985; 50(5): 1292–1295.

Hayman J. Beyond the Barcoo--probable human tropical cyanobacterial poisoning in outback Australia. *Med J Aust*. 1992; 157(11–12): 794–6.

Hiller S, Krock B, Cembella A, Luckas B. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*. 2007; 42: 1238–1250.

Humpage AR, Fontaine F, Froschio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2005; 68(9): 739-753.

<http://lavallette-seaside.shorebeat.com>

<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/cyanotoxins-drinking-water>

<https://www.ecowatch.com>

<http://publications.jrc.ec.europa.eu>

Ibelings BW, Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environ Pollut*. 2007; 150(1): 177–92.

Kagalou I, Papadimitriou T, Bacopoulos V, Leonardos I. Assessment of microcystins in lake water and the omnivorous fish (*Carassius gibelio*, Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) containing dense cyanobacterial bloom. *Environ. Monit. Assess*. 2008; 137(1-3): 185–195.

- Kinnear S. Cylindrospermopsin: A Decade of Progress on Bioaccumulation Research. *Mar Drugs*. 2010; 8(3): 542–64.
- Kiss T, Vehovszky Á, Hiripi L, Kovács A, Vörös L. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol*. 2002; 131(2): 167–176.
- 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* (Cyanobacteria). *J Physiol*. 2001; 37(6): 1121–1126.
- Li X, Zhang X, Ju J, Li Y, Yin L, Pu Y. Maternal repeated oral exposure to microcystin-LR affects neurobehaviors in developing rats. *Environ Toxicol Chem*. 2015; 34: 64–9.
- Maire MA, Bazin E, Fessard V, Rast C, Humpage AR, Vasseur P. Morphological cell transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells by the cyanotoxin, cylindrospermopsin. *Toxicol*. 2010; 55(7): 1317–1322.
- Maynes JT, Luu HA, Cherney MM, Andersen RJ, Williams D, Holmes CF, et al. Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: Elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins. *J. Mol. Biol*. 2006; 356: 111–120.
- McLellan NL, Manderville RA. Toxic mechanisms of microcystins in mammals. *Toxicol Res (Camb)*. 2017; 6: 391–405.
- Meng G, Sun Y, Fu W, Guo Z, Xu L. Microcystin-LR induces cytoskeleton system reorganization through hyperphosphorylation of tau and HSP27 via PP2A inhibition and subsequent activation of the p38 MAPK signaling pathway in neuroendocrine (PC12) cells. *Toxicology*. 2011; 290(2-3): 218-229.
- Molica RJR, Oliveira EJA, Carvalho PVVC, Costa ANSF, Cunha MCC, Melo GL et al. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae*. 2005; 4(4): 743–753.
- Moreira C, Vasconcelos V, Antunes A. Phylogeny and Biogeography of Cyanobacteria and Their Produced Toxins. *Mar. drugs*. 2013; 11(11): 4350-4369.
- Moreira C, Ramos V, Azevedo J, Vasconcelos V. Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014; 98(19): 8073–8082.

- Moreno I, Repetto G, Cameán A. Interés toxicológico de las microcistinas. *Toxicol.* 2003; 20(3): 159-165.
- Nishiwaki-Matsushima R, Nishiwaki S, Ohta T, Yoshizawa S, Suganuma M, Harada K, y cols. Structure-Function Relationships of Microcystins, Liver Tumor Promoters, in Interaction with Protein Phosphatase. *Jpn. J. Cancer Res.* 1991; 82(9): 993-996.
- O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae.* 2012; 14: 313-334.
- Oehrle SA, Southwell B, Westrick J. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon.* 2010; 55(5): 965-72.
- Ohtani I, Moore RE, Runnegar MT. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green algae *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 1992; 114: 7941-7942.
- Pantelić D, Svirčev Z, Simeunović J, Vidović M, Trajković I. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere.* 2013; 91(4): 421-441.
- Papadimitriou T, Kagalou I, Stalikas C, Pilidis I, Leonardos ID. Assessment of microcystins distribution and biomagnifications in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health. *Ecotoxicology.* 2012; 21(4): 1155-1166.
- Pflugmacher S, Jung K, Lundvall L, Neumann S, Peuthert A. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environmental Toxicology.* 2006; 25(9): 2381-2387.
- Pichardo S, Cameán AM, Jos A. In vitro toxicological assessment of cylindrospermopsin: A review. *Toxins (Basel).* 2017; 9(12).
- Pouria S, de Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti R, Barreto V, Ward C, y cols. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet.* 1998; 352(9121): 21-26.
- Prieto AI, Jos A, Pichardo S, Moreno I, Cameán AM. Protective role of vitamin E on the microcystin-induced oxidative stress in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol and Chem.* 2008; 27(5): 1152-9.
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Cameán A. M. Oxidative stress induced by microcystin-LR on PLHC-1 fish cell line. *Toxicol Vitro.* 2009; 23(8): 1445-9.

- Puerto M, Prieto AI, Pichardo S, Moreno I, Jos A, Moyano R et al. Effects of dietary N-acetylcysteine on the oxidative stress induced in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Environ Toxicol Chem.* 2009; 28(8): 1679–86.
- Puerto M, Pichardo S, Jos A, Cameán. Microcystin-LR induces toxic effects in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Arch Toxicol.* 2010; 84(5): 405–410.
- Roset J, Aguayo S, Muñoz MJ. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Toxicol.* 2001; 18: 65-71.
- Rouco M, López-Rodas V, Flores-Moya A, Costas E. Evolutionary Changes in Growth Rate and Toxin Production in the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Under a Scenario of Eutrophication and Temperature Increase. 2011; 62(2): 265–273.
- Rozman KB, Jurič DM, Šuput D. Selective cytotoxicity of microcystins LR, LW and LF in rat astrocytes. *Toxicol Lett.* 2017; 265:1–8.
- Rucker J, Stuken A, Nixdorf B, Fastner J, Chorus I, Wiedner C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenon-dominated temperate lakes. *Toxicon.* 2007; 50(6): 800–809.
- Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Lu SC. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 1995; 49(2): 219–225.
- Saker ML, Jungblut A-D, Neilan BA, Rawn DFK, Vasconcelos VM. Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon.* 2005; 46(5): 555–62.
- Seawright AA, Nolan CC, Shaw GR, Chiswell RK, Norris RL, Moore MR, y cols. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environmental Toxicology.* 1999; 14(1): 135–42.
- 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* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae.* 2007; 6(1): 73–80.
- Shen X, Lam PK, Shaw G, Wickramasinghe W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon.* 2002; 40(10): 1499–1501.

Song W, Teshiba T, Rei, K, O'Shea KE. Ultrasonically induced degradation and detoxification of microcystin-LR (Cyanobacterial Toxin). *Environ Sci Technol* 2005; 39(16): 6300–6305.

Spoof L, Vesterkvist P, Lindholm T, Meriluoto J. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003; 1020(1): 105–119.

Spoof L, Berg KA, Rapala J, Lahti K, Lepistö L, Metcalf JS et al. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environ Toxicol*. 2006; 21(6): 552–560.

Spoof L, Catherine A. Tables of microcystins and nodularins. En: Meriluoto J, Spoof L, Codd GA. *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. 1<sup>st</sup> ed. Wiley; 2017. p.526–537.

Tait SWG, Green DR. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5:1-15.

Takser L, Benachour N, Husk B, Cabana H, Gris D. Cyanotoxins at low doses induce apoptosis and inflammatory effects in murine brain cells: Potential implications for neurodegenerative diseases. *Toxicol Reports*. 2016; 3: 180–9.

Tatay E, Meca G, Font G, Ruiz MJ. Interactive effects of zearalenone and its metabolites on cytotoxicity and metabolization in ovarian CHO-K1 cells. *Toxicol In Vitro*. 2014; 28:95–103.

Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada KI, y cols. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from bluegreen alga *Umezakia natans*. *Toxicon*. 1994; 32(7): 833–43.

Valério E, Chaves S, Tenreiro R. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review. *Toxins*. 2010; 2(10): 2359–2410.

Van Apeldoorn ME, Van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nut Food Res*. 2007; 51(1): 7-60.

Walsby A E. Gas vesicles. *Microbiol Rev*. 1994; 58(1): 94–144.

Wang J, Salata JJ, Bennett PB. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol*. 2003; 121(6): 583–598.

Wimmer KM, Strangman, WK, Wright JLC. 7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7- deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. Harmful Algae. 2014; 37: 203–206.

Woese CR. On the evolution of cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(13): 8742–8747.

[www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)

Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe M.F, Harada K, Ichihara A, Carmichael WW, y cols. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1990; 116(6): 609–614.

Zapomělová E, Skácelová O, Pumann P, Kopp R, Janeček E. Biogeographically interesting planktonic Nostocales (Cyanobacteria) in the Czech Republic and their polyphasic evaluation resulting in taxonomic revisions of *Anabaena bergii* Ostenfeld 1908 (*Chrysosporum* gen. nov.) and *A. tenericaulis* Nygaard 1949 (*Dolichospermum tenericaule* comb. nova). Hydrobiologia. 2012; 698: 353–365.



Volume XXX, X October 2018

ISSN 0378-4274  
XXX 1-438 (2018)

# Toxicology Letters



ABSTRACTS of the 54<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018)  
TOXICOLOGY OUT OF THE BOX  
Brussels, Belgium, 2<sup>nd</sup> – 5<sup>th</sup> of September, 2018

# Toxicology Letters

*An International Journal for the Rapid Publication of Short Reports on all Aspects of  
Toxicology Especially Mechanisms of Toxicity*

**Editor-in-Chief**  
Wolfgang Dekant

**Associate Editors**  
Scott Garrett, Yunbo Li and Angela Mally

**ABSTRACTS of the 54<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018)**  
**TOXICOLOGY OUT OF THE BOX**

Brussels, Belgium, 2<sup>nd</sup> – 5<sup>th</sup> of September, 2018



Amsterdam—Boston—London—New York—Oxford—Paris—Philadelphia—San Diego—St. Louis

While various guidelines detailing how to deal with the assessment of protein safety are available, no global consensus exists. Scientific advances and the evolution of risk assessment tools should be used to re-think the protein safety assessment strategy, upon which a global consensus could be achieved. Here we provide state-of-the-art considerations paving the road to do so.

**Methods:** The safety assessment of proteins relies on information of different nature providing the necessary weight-of-evidence to estimate risks. However, the current paradigm borrows the classical principles and methodologies developed for assessing “chemicals”, i.e. small molecules. But proteins are large and complex biological molecules, needing dedicated considerations for hazard and exposure assessments.

**Results:** the safety assessment of proteins could be streamlined. First, more informative tools for protein analysis and a clearer framing of exposure-scenarios are necessary to better inform the risk assessment strategy to follow. For example, improved *in silico* analysis approaches, coupled with thorough criteria to interpret outcomes should be pursued. Targeted *in vitro* testing tools should be further developed and validated in robustness and reliability to integrate and possibly replace animal models. A promising way forward is the development of more informative *in vitro* digestion tests. Second, other tools and in particular animal models should be used to obtain final decisive evidence on protein safety only when the initial protein and exposure assessment is not sufficient to conclude on the safety. Currently, well-established acute, 28-day, 90-day toxicity studies designed for “chemical; assessment are used, but their relevance for protein safety assessment is questioned. A deep revision of the use of animal models for protein safety is needed to establish when they are informative and what parameters should be considered. Finally, innovative ways to link the outcome of the protein assessments with post market realities are necessary to better inform and continuously improve the strategy used.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.722>

#### P10-08

##### ***In vitro* study of the cytotoxic effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and their mixture in the neuronal SH-SY5Y cell line**

M.G. Hinojosa, D. Gutierrez-Praena, A.I. Prieto, L. Espinar-López, A.M. Cameán, A. Jos\*

University of Sevilla, Area of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Sevilla, Spain

Anthropogenic activities and climate changes are contributing to the increase of the appearance of cyanobacterial blooms, capable of producing harmful secondary metabolites known as cyanotoxins, such as microcystin-LR (MC-LR) and cylindrospermopsin (CYN). Despite being mainly considered as a hepatotoxin and a cytotoxin, respectively, both toxins seem to be able of causing neurotoxicity in different experimental models, although studies concerning this aspect are still scarce, especially with CYN. In the present work, the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line was used to assess the cytotoxicity induced by MC-LR and CYN pure standards and their mixture, since their simultaneous occurrence is frequent in nature. For this purpose, cells were exposed to 0–100 µg/mL MC-LR and 0–5 µg/mL CYN for 24 and 48 h. Cytotoxicity was evaluated using the MTS tetrazolium salt reduction (MTS), the neutral red uptake (NR) and the total protein content (PC) assays. The MTS assay was performed to evaluate the mixture at EC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>/2 and EC<sub>50</sub>/4 concentrations for both periods of time. The results of this combination were also evaluated using the CalcuSyn software, in order to establish the type of interaction of the mixture (additive,

synergistic or antagonistic effect). In the MTS assay, an EC<sub>50</sub> value of 32.21 ± 1.89 µg/mL after 24 h of exposure and 20.8 ± 2.08 µg/mL after 48 h was obtained for MC-LR. In the case of CYN, the EC<sub>50</sub> values were 0.87 ± 0.13 µg/mL and 0.32 ± 0.08 µg/mL after 24 and 48 h, respectively. Regarding to the mixture, an antagonistic effect was observed at low concentrations at both exposure periods, although a synergistic trend was observed at the highest concentrations assayed after 24 and 48 h. Therefore, our results show the neurotoxic potential of both cyanotoxins, showing for the first time *in vitro*, the high sensitivity of neuronal cells to CYN and its combination with MC-LR.

#### **Acknowledgments**

Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2015-64558-R, MINECO/FEDER, UE).

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.723>

#### **P10-09**

##### **Health effects of red meat products containing phytochemicals and reduced levels of nitrite: the PHYTOME project**

S.G. van Breda\*

T.M. de Kok, on behalf of the PHYTOME consortium

Maastricht University Medical Center, GROW School for Oncology and Developmental Biology, Department of Toxicogenomics, Maastricht, Netherlands

**Purpose:** It has been proposed that endogenously formed N-nitroso compounds (NOCs) are partly responsible for the link between red meat consumption and colorectal cancer (CRC) risk. As nitrite has been indicated as one of the critical factors in the formation of endogenous NOCs, it is of high importance to reduce the nitrite levels in meat. Therefore, the PHYTOME project was initiated (Phytochemicals to reduce nitrite in meat products; [www.phytome.eu](http://www.phytome.eu)), a major EU funded research project aiming to develop innovative meat products in which the food additive nitrite has been replaced by natural compounds originating from fruits and vegetables.

**Methods:** A human dietary intervention study was conducted in which healthy subjects consumed 300 g of meat for two weeks, in subsequent order: normal processed red meat, white meat, and red processed meat with normal or reduced levels of nitrite and added phytochemicals (normal-nitrite or low-nitrite PHYTOME meat, respectively). Before and after each intervention period, colorectal biopsies, urine and faeces were collected for analyses of different markers of effect.

**Results:** Apparent total N-nitroso compounds (ATNC) in faecal water, as measure of total NOCs, were significantly higher following processed red meat intake when compared to intake of white meat, normal-nitrite - and low-nitrite PHYTOME meat. In addition, DNA strand breaks induced in *ex-vivo* faecal water exposed CACO-2 cells and O<sup>6</sup>-methyl-guanine adducts levels in colonic DNA were significantly higher after consumption of normal processed red meat as compared to white meat intake. Furthermore, normal-nitrite and reduced-nitrite PHYTOME meat intake resulted in reduced levels of these genotoxic markers; however, these effects were not statistically significant. Whole genome gene expression analyses identified differentially expressed genes and co-expressed genes which are related to molecular pathways which explain cancer risk initiation after intake of processed red meat and cancer risk prevention after intake of the PHYTOME meat. Together these results indicate that addition of natural extracts to conventional processed red meat products results in reduced formation of NOCs, and may