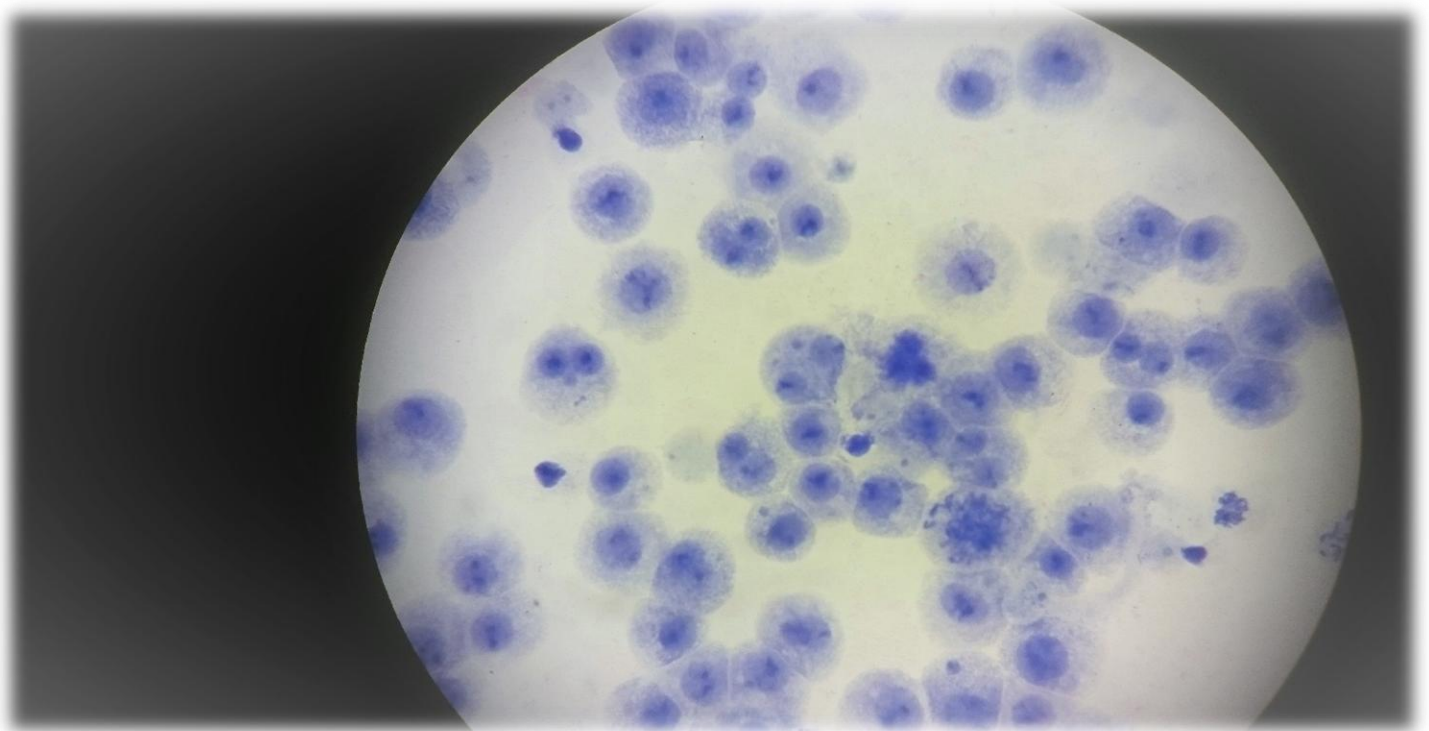


EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE CYN EN CÉLULAS L5178Y MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS



María Gracia Hinojosa Hidalgo

Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla





Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

Trabajo Fin de Grado Experimental

**EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE CYN EN CÉLULAS L5178Y
MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**

María Gracia Hinojosa Hidalgo

Grado en Farmacia

Departamento de Nutrición, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Tutoras: Dra. Ana Isabel Prieto Ortega y Dra. Sara Maisanaba Hernández

Sevilla, 5 de Julio de 2017

ABSTRACT

The cylindrospermopsin (CYN) is one of the most important emerging cyanotoxins in fresh water due to its ubiquity, frequency and severity of the impacts causes in animal and human health. The liver seems to be its main target organ, but other several such as kidneys, lungs, heart, bone marrow, thymus, adrenal glands, immune system, intestinal tract and nervous system can also be affected. Different toxicity mechanisms of CYN have been described, but the most important are the inhibition of protein and glutathione synthesis, oxidative stress and, although genotoxicity has not been elucidated yet, there are some evidences about it. The aim of this work was to study the genotoxic potential of CYN for the first time in the cell line L5178Y/*Tk*^{+/-} through the micronucleus (MN) assay in absence and presence of the metabolic fraction S9 mix. Our results showed a significant increase in the frequency of MN in binucleated cells in the presence of S9 (0,25 – 2 µg CYN/mL), while there were not significant differences in absence of the metabolic fraction (0,08 – 1,35 µg CYN/mL) compared to their respective control groups. For this reason, CYN does not seem to have genotoxic activity *per se* in the cell line L5178Y *Tk*^{+/-} although its metabolites seem to cause clastogenic and/or aneugenic effects. Further research is required to progress in the knowledge of the genotoxic and carcinogenic potential of this cyanotoxin in order to avoid those risks resulting in animal and humans from its exposure.

Keywords: Cylindrospermopsin, L5178Y/*Tk*^{+/-}, micronucleus test, genotoxicity, risk assessment.

ÍNDICE

| | |
|--|---------|
| 1. Introducción..... | Pag. 6 |
| 1.1 Cianobacterias..... | Pag. 6 |
| 1.2 Clasificación de cianotoxinas..... | Pag. 6 |
| 1.3 Cilindrospermopsina (CYN): producción y estructura..... | Pag. 7 |
| 1.4 Vías de exposición y mecanismos de toxicidad..... | Pag. 8 |
| 1.4.1 Vías de exposición a la CYN..... | Pag. 8 |
| 1.4.2 Mecanismos de toxicidad de la CYN..... | Pag. 8 |
| 1.5 Efectos tóxicos de la CYN..... | Pag. 11 |
| 1.5.1 Efectos tóxicos en humanos..... | Pag. 11 |
| 1.5.2 Efectos tóxicos en estudios experimentales..... | Pag. 12 |
| 1.6 Reglamentación y valores guía..... | Pag. 14 |
| 2 Objetivo y justificación del trabajo..... | Pag. 15 |
| 3 Materiales y métodos..... | Pag. 16 |
| 3.1 Compuestos químicos..... | Pag. 16 |
| 3.2 Mantenimiento de la línea celular L5178Y/ <i>Tk</i> ^{+/-} | Pag. 16 |
| 3.3 Preparación de la fracción microsomal s9 | Pag. 17 |
| 3.4 Ensayo de viabilidad..... | Pag. 17 |
| 3.5 Ensayo de micronúcleos (MN)..... | Pag. 18 |
| 3.5.1 Ensayo de MN con S9..... | Pag. 19 |
| 3.5.2 Ensayo de MN sin S9..... | Pag. 21 |
| 3.5.3 Análisis estadístico de los datos..... | Pag. 21 |
| 4 RESULTADOS..... | Pag.22 |
| 4.1 Ensayo de viabilidad celular en la línea celular L5178Y <i>Tk</i> ^{+/-} | Pag. 22 |
| 4.2 Ensayo de MN..... | Pag. 23 |
| 5 DISCUSIÓN..... | Pag. 25 |
| 6 CONCLUSIÓN..... | Pag. 27 |
| 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | Pag. 31 |
| 8 ANEXO..... | Pag.36 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cianobacterias

Las cianobacterias, también conocidas como “algas verdeazuladas”, forman parte de un grupo primitivo de microorganismos que, según los registros fósiles, ha existido desde hace aproximadamente 3500 millones de años (Tomitani y cols., 2006). Son organismos sin núcleo, que carecen tanto de orgánulos unidos a la membrana como de reproducción sexual (Anagnostidis y Komárek, 1988). Se caracterizan por su capacidad de sintetizar clorofila-a, y por su poder adaptativo, contribuyendo con éxito a la fotosíntesis global y a la fijación de nitrógeno (Skulberg, 2005). Las cianobacterias están presentes en todos los ecosistemas acuáticos y terrestres, desde desiertos hasta bosques pluviales tropicales, desde zonas alpinas hasta superficies embarradas y desde océanos abiertos hasta lagos eutróficos (Rastogi y cols., 2014). Aunque normalmente no se encuentran en aguas profundas donde no penetra la luz, incluso allí en determinadas ocasiones se ha encontrado presencia de acinetos, pudiendo permanecer viables durante largos períodos de tiempo (Agrawal y Singh, 2000). Las cianobacterias son conocidas por producir un amplio rango de metabolitos bioactivos incluyendo péptidos cíclicos y no cíclicos, alcaloides, fenoles y compuestos aromáticos clorados (Leão y cols., 2009) siendo una fuente inmensa de productos naturales secundarios con aplicaciones en muchos sectores, como son el farmacéutico, alimentario, cosmético, agricultor y energético (Kim y cols., 2015; Vijayakumar y Menakha, 2015). Las especies capaces de formar floraciones tóxicas tienen una especial trascendencia económica, humana y medioambiental, debido a su capacidad de disminuir la calidad del agua liberando metabolitos secundarios denominados cianotoxinas (Carmichael, 1992), confiriéndoles un sabor no deseado y un aspecto de suciedad en la superficie (Ibelings y Chorus, 2007). En los últimos años, la extensión de los brotes de cianobacterias y su frecuencia han aumentado considerablemente como consecuencia del aumento de las actividades antropogénicas y del cambio climático (Funari y cols., 2012), siendo detectadas estas toxinas en los cinco continentes (Buratti y cols., 2017).

1.2 Clasificación de cianotoxinas

Atendiendo a su estructura química, las cianotoxinas se clasifican en tres grupos: péptidos cíclicos (Microcistinas (MCs) y nodularina), alcaloides (anatoxina, saxitoxina, Cilindrospermopsina (CYN), aplisiatoxina, lingbiatoxina) y lipopolisacáridos (Kaebernick y Neilan, 2001). Además, las cianotoxinas también han sido clasificadas atendiendo a los efectos tóxicos que producen en: hepatoxinas (MCs y nodularinas), neurotoxinas (anatoxinas y

saxitoxinas), citotoxinas (CYN), endotoxinas y dermatotoxinas (Carmichael y Li, 2006) tal y como se muestra en la **Fig. 1**.

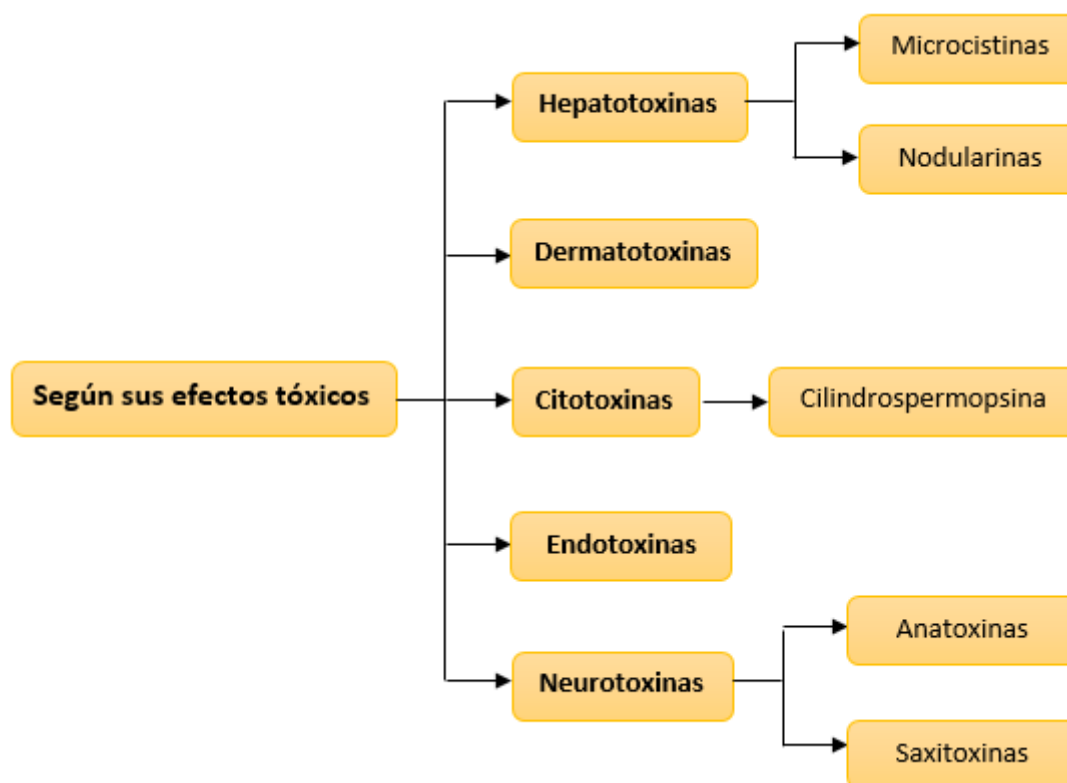


Figura 1. Esquema de la clasificación de las cianotoxinas según los efectos tóxicos que producen en el organismo.

1.3 Cilindrospermopsina (CYN): producción y estructura

La CYN es una de las toxinas emergentes más importantes en agua dulce alrededor del mundo debido a sus múltiples mecanismos de toxicidad, a la severidad de los impactos en la salud que causa y a la frecuencia de su ocurrencia (Poniedzialek y cols., 2012) (**Fig.2**). A pesar de que *Cylindrospermopsis raciborskii* fue la primera especie declarada como productora de CYN, otras especies de cianobacterias han sido identificadas: *Umezakia natans* en Japón (Harada y cols., 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* en Israel, Australia, EEUU y España (Banker y cols., 1997; Shaw y cols., 1999; Wörmer y cols., 2008; Yilmaz y cols., 2008), *Anabaena bergii* en Australia (Schembri y cols., 2001), *Raphidiopsis curvata* en China (Sinha 2014), *Aphanizomenon flos-aquae* en Alemania (Preußel y cols., 2006), *Anabaena lapponica* en Finlandia (Spoof y cols., 2006), *Lyngbya wollei* en Australia (Seifert y cols., 2007), *Aphanizomenon gracile* en Alemania (Rücker y cols., 2007), *Oscillatoria sp.* En EEUU (Mazmouz y cols., 2010), *Aphanizomenon sp.* en Alemania (Stuken y Jakobsen, 2010), *Raphidiopsis mediterránea*, *Dolichospermum mendotae* y *Chrysoosporum ovalisporum* en Turquía (Akcaalan y cols., 2014).

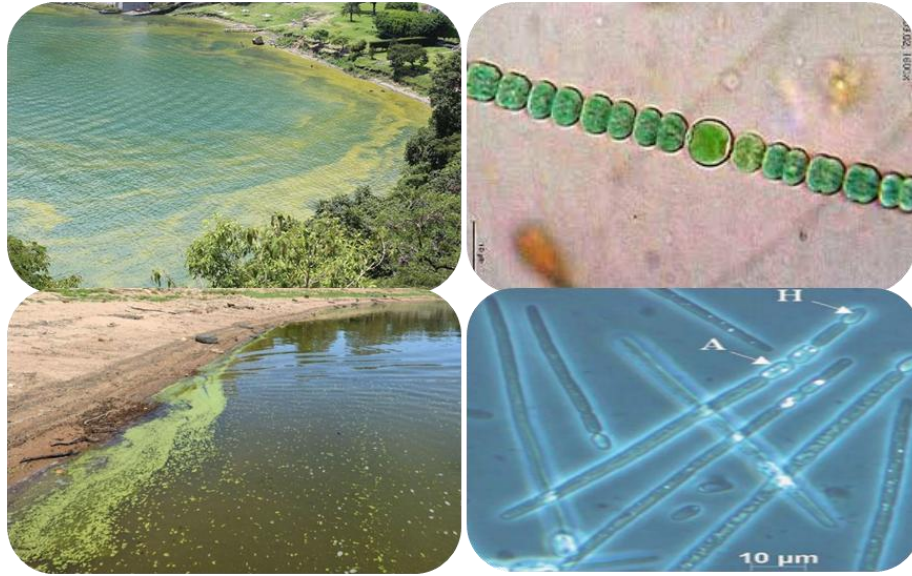


Figura 2. Lagos contaminados con cianobacterias, *Anabaena* sp. y *C. raciborskii* (AFSSA, 2006).

Estructuralmente, la CYN fue caracterizada por primera vez en 1992 por Ohtani y cols. (1992), describiéndola como un alcaloide tricíclico estable de peso molecular 415Da ($C_{15}H_{21}N_5O_7S$) consistente en un grupo guanidino tricíclico combinado por su C7 con un grupo hidroximetil uracilo por un puente hidroxilo (**Fig. 3**). Debido a la carga negativa del grupo sulfato, y la carga positiva del grupo guanidino, la molécula es un zwitterión altamente soluble en agua (Falconer y Humpage, 2006). El tamaño molecular y la naturaleza hidrofílica de esta molécula hacen poco probable que permanezca en el interior la célula, por lo que, comparada con otras cianotoxinas, la CYN se produce mayormente como una toxina extracelular, estando presente en una gran cantidad de muestras medioambientales (van Apeldoorn y cols., 2007).

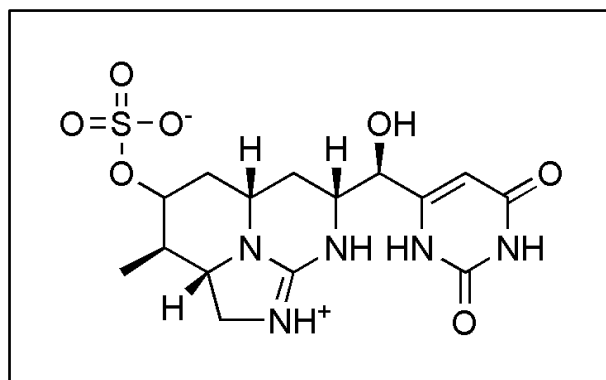


Figura 3. Estructura química de Cilindrospermopsina.

En la actualidad, se han identificado diferentes variantes estructurales de la CYN como 7-epi-CYN, 7-deoxy-CYN (Norris y cols., 1999), 7-deoxy-desulfo-CYN y 7-deoxy-desulfo-12-acetil-CYN (Wimmer y cols., 2014). No obstante, estos autores no pudieron concluir su naturaleza de

congéneres, precursores o productos de degradación.

1.4 Vías de exposición y mecanismos de toxicidad

1.4.1 Vías de exposición a la CYN

Los seres humanos pueden estar expuestos a la CYN por diversas vías: parenteral de forma accidental, dérmica e inhalatoria por el uso recreativo de las aguas (deportes acuáticos), profesional (pesca) o doméstica (duchas con aguas contaminadas) (Funari y Testai, 2008). En relación a la frecuencia de exposición humana, la vía más importante es la oral, que ocurre por ingestión de agua y alimentos contaminados (Funari y Testai, 2008). El problema de las cianobacterias tóxicas parece ser extremadamente relevante en países áridos y desarrollados, donde la gente depende más de agua de bebida almacenada (en algunos casos desalinizada) en reservorios, y donde se ha encontrado producción de cianotoxinas en aguas recreativas, para beber y para riego, contenida en presas y depósitos, en pozos subterráneos, aguas termales y piscinas con agua de lluvia (Mohamed y Al Shehri, 2009; Chatziefthimiou y cols., 2016). Otra fuente potencial de exposición humana, que no debe pasar desapercibida, es por suplementos dietéticos vendidos como suplementos de algas verdeazuladas (Dietrich y Hoeger, 2005). Esos suplementos son muy populares en los países occidentales debido a sus presuntos efectos beneficiosos para la salud humana: pérdida de peso, aumento del estado de alerta y energía, antidepresivo y tratamiento del déficit de atención y desorden de hiperactividad en niños (Funari y Testai, 2008). La mayoría son producidos a partir de las cianobacterias *Spirulina sp.* y *Aphanizomenon flos-aquae*, que crecen en estanques artificiales o que son recogidas de ambientes naturales directamente (Funari y Testai, 2008), donde puede haber otros contaminantes cianobacteriales (Saker y cols., 2005).

1.4.2 Mecanismo de toxicidad de la CYN

Se ha demostrado que el principal órgano diana de la CYN es el hígado, no obstante, otros órganos tales como riñones, pulmones, timo, médula, glándulas adrenales, tracto intestinal, sistema inmune, sistema nervioso y corazón también pueden verse afectados (Hawkins y cols., 1985; Terao y cols., 1994; Falconer y cols., 1999; Humpage y cols., 2000; Guzmán-Guillén y cols., 2015), por lo que se clasifica como una cianotoxina citotóxica. Uno de los mecanismos de acción más conocidos de CYN es la inhibición de la síntesis proteica. Se ha observado que inhibe la traducción de ARNm en sistemas *in vivo* e *in vitro* (Terao y cols., 1994; Froscio y cols., 2003) lo que es considerado como un claro indicador de exposición a la CYN. Esto ocurre a concentraciones subtóxicas y mucho antes del comienzo de la toxicidad a mayores concentraciones (Froscio y cols., 2003). Además, esta toxina ha demostrado interrupción del

crecimiento y citotoxicidad en diferentes líneas celulares de mamíferos como células hepáticas HepG2 e intestinales Caco-2 (Bazin y cols., 2010), de ovario de hámster CHO-K1 (Fessard y Bernard, 2003), derivadas de las ya comentadas HepG2, la línea celular C3A (Neumann y cols., 2007) y células renales como Vero (Froschio y cols., 2009 a,b), evidenciándose que la CYN puede penetrar en una gran variedad de tipos de células y causar efectos tóxicos (Froschio y cols., 2009a). Otra de las principales rutas postuladas de la toxicidad de la CYN es a través de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), tal y como ha sido demostrado en ensayos *in vitro* (Gutiérrez-Praena y cols., 2011, 2012a,b) e *in vivo* (Puerto y cols., 2011; Gutiérrez-Praena y cols., 2011a; Guzmán-Guillén y cols., 2013). Éstas incluyen iones de oxígeno, radicales libres (superóxido y radicales hidroxilo) y peróxidos (peróxido de hidrógeno), lo que puede dar lugar a necrosis celular o a daño en el ADN y, consecuentemente, a la apoptosis (Roos y Kaina, 2006). También se ha observado una reducción sustancial de glutatión (GSH) tras la administración oral de CYN en ratas, lo que sugiere que esta toxina podría ser metabolizada posteriormente por conjugación con GSH o, alternativamente, que CYN inhibe la síntesis de éste antioxidante endógeno (Runnegar y cols., 1995).

Aunque existen evidencias de la capacidad genotóxica de CYN aún no se han dilucidado por completo los mecanismos implicados en la misma. Algunos estudios demuestran que la CYN es progenotóxica, siendo necesaria su previa activación metabólica por CYP450 para que sea genotóxica. Un esquema resumen de los principales mecanismos de toxicidad de la CYN se muestran en la **Fig. 4**.

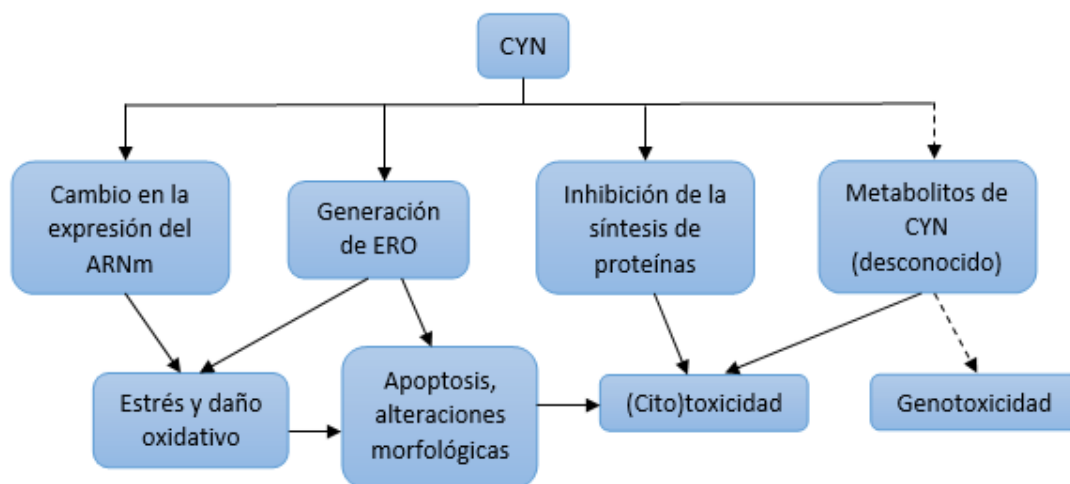


Figura 4. Esquema del mecanismo de toxicidad de la CYN.

1.5 Efectos tóxicos de la CYN

La CYN ha mostrado ser tóxica para muchas especies de bacterias, protozoos, plantas, invertebrados y vertebrados, incluyendo los seres humanos (de la Cruz y cols., 2013).

1.5.1 Efectos tóxicos en humanos

Se han descrito numerosos casos de envenenamiento letales asociados a la ingestión de la CYN. Concretamente, el primer episodio fue descrito en Palm Island, al norte de Queensland, Australia, en 1979, y fue conocido como “la enfermedad misteriosa de Palm Island” (Byth, 1980), cuando 138 niños y 10 jóvenes adultos acudieron a una clínica local con malestar, vómitos, anorexia y hepatomegalia. Esta situación progresó a diarrea sanguinolenta que persistió por tres semanas, además de presentar shock acidótico y hematuria. Posteriormente, un informe epidemiológico reveló que todos los pacientes habían bebido agua del mismo reservorio (Solomon Dam), que previamente había experimentado un gran brote de algas (Bourke y cols., 1983). Además, Hawkins y cols. (1985) concluyeron que dicho reservorio experimentó un brote dañino intermitente de cianobacterias, y que las principales especies fueron *Anabaena circinalis* y *C. raciborskii*, sin embargo, ésta última fue la única especie que resultó estar implicada en la producción de compuestos tóxicos, según bioensayos de ratón. No obstante, se ha demostrado que no todas las cepas aisladas de *C. raciborskii* producen CYN, y algunas evidencias apuntan a que la toxicidad puede ser inducida por alguna toxina adicional no conocida (de la Cruz y cols., 2013). Cuatro años más tarde en Caruaru, Brasil, un centro de diálisis tuvo un brote de lo que fue conocido como *síndrome de Caruaru*, y se pensó que era debido a la contaminación de los abastecimientos de agua por microcistinas (Azevedo y cols., 2002). Sin embargo, aunque la CYN también fue identificada en las fuentes de agua de Brasil en ese momento, al no haber evidencia directa, los datos que relacionaban a la CYN no fueron concluyentes (Azevedo y cols., 2002). En los años siguientes al incidente de Palm Island, se sugirió que el “Barcoo”, una enfermedad común de la época que tendía a ocurrir tras las lluvias primaverales y de verano en el interior de Australia, caracterizada por vómitos, estreñimiento, diarrea y fiebre, podía ser una forma media de intoxicación por CYN (Hayman, 1992). Aunque la intoxicación humana aguda con las cianotoxinas no es muy común, es de gran preocupación para la salud humana debido a su potencial para provocar efectos adversos a largo plazo, ya sea a exposiciones crónicas o a concentraciones relevantes bajas y medioambientales (Žegura y cols., 2011).

1.5.2 Efectos tóxicos en estudios experimentales

Aunque son escasos los estudios experimentales realizados con CYN, se ha demostrado una gran variabilidad de sus efectos tóxicos entre los diferentes modelos animales, e incluso entre los diferentes individuos de una misma especie (Kinneer, 2010).

En relación a los estudios *in vitro* realizados con la CYN en diferentes líneas celulares, han sido descritos una gran variedad de resultados. Concretamente, respecto a su genotoxicidad, los estudios realizados hasta la fecha se resumen en la siguiente tabla (**tabla 1**):

| Autores | Línea celular | Dosis y tiempo de exposición a CYN | Ensayo | Resultados |
|--------------------------------|---|-------------------------------------|--|---|
| Humpage y cols., 2000 | WIL2-NS (células linfoblastoides humanas) | 6 y 10 µg/mL 24 horas | Ensayo de Micronúcleos (MN) | Aumento significativo en la frecuencia de MN. Da lugar a daño citogenético por rotura de las hebras de ADN y por pérdida de cromosomas enteros (aneuploidía). |
| Fessard y Bernard, 2003 | CHO K1 (células de ovario de hámster chino) | 0,5 y 1 µg/mL 24 horas | Ensayo cometa | No detectaron daño en el ADN, pero sí alteración del citoesqueleto celular, leve aumento de la apoptosis y disminución de la mitosis. |
| Lankoff y cols., 2007 | CHO-K1 con y sin activación metabólica | 0,05 – 2 µg/mL 3, 16 y 21 horas. | Análisis de aberraciones cromosómicas e índices mitóticos. Análisis de apoptosis por citometría de flujo | CYN no es clastogénica en CHO-K1 con y sin activación metabólica, pero disminuye la frecuencia de divisiones mitóticas. Aumenta la necrosis celular. |
| Bazin y cols., 2010 | Caco-2 (células de adenocarcinoma colorrectal humano) | 0,5 – 2 µg/mL 24 horas | Ensayo de MN | Aumento significativo del porcentaje de MN. En presencia de ketoconazole redujo la citotoxicidad al 50%. |

| | | | | |
|--------------------------------------|---|-------------------------------|---|---|
| Bazin y cols., 2010 | HepaRG (células hepáticas humanas) | 0,5 – 2 µg/mL 24 horas | Ensayo de MN | Aumento significativo del porcentaje de MN. En presencia de ketoconazol no se produjeron MN. Protección frente a la citotoxicidad de CYN, sugiriendo que es progenotóxica. |
| Štraser y cols., 2011 | HepG2 (células de cáncer hepático humano) | 0,005 – 0,5 µg/mL 24 horas | Ensayo cometa y ensayo de MN | Rotura de la doble cadena de ADN, formación de MN y aumento en la expresión de ARNm de CYP1A1 y CYP1A2 (genotóxica indirectamente). |
| Sieroslawska y Rymuszka, 2015 | Línea celular CLC de peces | 0,1; 0,5; 1 µg/mL 24 horas | Ensayo de citotoxicidad y proliferación celular. Ensayo de producción de EROs: ensayo de la superóxido dismutasa (SOD); determinación de GSH y ensayo de MN. | Se detectó actividad genotóxica de CYN por daño oxidativo del ADN y un elevado número de MN. |

Tabla 1. Estudios genotóxicos de ensayos realizados con la CYN *in vitro*.

En ensayos *in vivo*, concretamente en roedores, la CYN ha demostrado producir afectación en distintos órganos, incluyendo las glándulas adrenales (Hawkins y cols., 1985), timo, corazón (Terao y cols., 1994), y pulmones (Oliveira y cols., 2012), además de actuar como agente inductor de dermatitis (Torokne y cols., 2001). Respecto a su genotoxicidad, la CYN indujo rotura de la hebra de ADN en ratones expuestos a la cianotoxina por vía intraperitoneal a nivel renal, y a nivel de la médula ósea y el colon por vía oral (Bazin y cols., 2010). Sin embargo, es importante tener en cuenta que las dosis fueron demasiado altas induciendo altos niveles de citotoxicidad, que siempre están asociados con daño en el ADN, de forma que esto limitaba la validez del estudio. La genotoxicidad de la CYN y/o sus metabolitos es algo que todavía causa

controversia (Buratti y cols., 2017). Más recientemente, en animales acuáticos efectos tóxicos de la CYN fueron observados en tilapias expuestas de forma aguda a CYN pura (200 y 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pez), induciendo efectos histopatológicos y dependientes de la dosis (Gutiérrez-Praena y cols., 2011, 2012; Puerto y cols., 2011). Los resultados obtenidos confirmaron que el hígado y el riñón fueron los principales órganos afectados, pero también se observaron cambios histopatológicos en el corazón, el intestino y las branquias. Además, se ha demostrado que tilapias expuestas a CYN por vía oral experimentan un aumento de lipoperoxidación (LPO), de enzima glutatión-S-transferasa (GST), una disminución de los niveles de GSH, así como un aumento de la oxidación de proteínas y una disminución de los niveles de GSH en hígado y riñón (Gutiérrez y cols., 2011; Puerto y cols., 2011, 2012; Guzmán-Guillén y cols., 2013). Renacuajos del anfibio *Bufo marinus* expuestos a cultivos de *C. raciborskii* (productores de CYN) mostraron lesiones en múltiples órganos, siendo graves en el hígado, intestino, conductos nefríticos y epitelio de las branquias (Kinneer y cols., 2007). Además, daño oxidativo del ADN en hígado y riñón de tilapias expuestas de forma subcrónica mediante inmersión (10 μg CYN/mL cada 2 días durante 14 días) ha sido documentado por Guzmán-Guillén y cols. (2014).

1.6 Reglamentación y valores guía

Actualmente en España no está contemplada la CYN en la legislación. No obstante, se han propuesto unos niveles guías provisionales de $1\mu\text{gCYN}/\text{L}$ en aguas de bebida (Humpage y Falconer, 2003). Países europeos como Francia han desarrollado regulaciones más estrictas considerando un límite de $0,24\mu\text{g CYN}/\text{L}$ (AFSSA, 2006). Otros países, como Brasil establecen unos niveles de $15\mu\text{g CYN}/\text{L}$, mientras que en Nueva Zelanda es menos permisivo, estableciendo el nivel en $1\mu\text{g CYN}/\text{L}$. A pesar de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó a la CYN en la revisión de “Guías para la calidad del agua de bebida, peligros químicos en agua de bebida” todavía no hay información suficiente para la clasificación de la CYN como carcinogénico por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC). Además, debido a sus efectos adversos, la Agencia de Protección Medioambiental Americana (EPA), clasificó a la CYN en la lista de componentes con mayor prioridad para la caracterización del peligro (EPA, 2010).

2. OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Basándonos en la bibliografía consultada y en la necesidad manifiesta por parte de los diferentes autores y expertos en el tema de profundizar en la capacidad genotóxica de la CYN, el presente Trabajo Fin de Grado tiene como objetivo principal estudiar el potencial genotóxico de esta cianotoxina en la línea celular de origen linfoide de roedores L5178Y/*Tk*^{+/-} mediante la realización del ensayo de micronúcleos (MN) en ausencia y en presencia de la fracción de activación metabólica S9 de acuerdo con el protocolo número 487: “Ensayo de Micronúcleos *in vitro* en Células de Mamífero”, descrito por la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo de la Unión Europea (OCDE).

A pesar de existir diferentes ensayos de MN *in vitro* realizados en diferentes líneas celulares expuestas a la CYN (**tabla 1**), la realización del presente trabajo queda justificada por la elección, siendo la primera vez, de una línea celular (L5178Y/*Tk*^{+/-}) recomendada por el protocolo de la OCDE 487 llevando así a cabo uno de los ensayos propuestos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Compuestos químicos

Los reactivos KCl (CAS No. 7447-40-7), el tinte Giemsa (CAS No. 51,811-82-6), la solución de azul tripán 0.4% (CAS No. 72-57-1), el formaldehído (CAS No. 50-00-0), la mitomicina C (Myt-C)(CAS No. 50-07-7), la ciclofosfamida (CAS No. 6055-19-2) y la citocalasina B (Cyt-B) (98%, CAS No. 14,930-96-2) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Alemania). El medio RPMI 1640, el suero de caballo, la solución de l-glutamina (CAS No. 56-85-9), la solución de penicilina/estreptomicina, la solución de piruvato sódico (CAS No. 113-24-6) y la solución de anfotericina B (CAS No. 1397-89-3) fueron proporcionados por Gibco (Biomol, Sevilla, España). El metanol (CAS: 67-56-1), el ácido acético (CAS 64-19-7) y el entellán (1.07961.0100) fueron suministrados por VWR (España). La CYN fue suministrada por Alexis Corporation (Lausen, Suiza) y, el aceite de inmersión (CAS No. 12-624-66A) de Carl Zeiss. La fracción S9 fue suministrada por Moltox, Trinova, Biochem, Alemania.

3.2. Mantenimiento de la línea celular L5178Y/ $Tk^{+/-}$

Este trabajo experimental fue llevado a cabo usando células de linfoma de ratón L5178Y/ $Tk^{+/-}$, puesto que no hay datos de estudios de genotoxicidad en dicha línea con CYN, siendo ésta una de las líneas celulares propuestas por la OCDE para la realización de este ensayo por la demostrada validez de sus resultados.

La línea celular L5178Y/ $Tk^{+/-}$ (**Fig.5**) fue proporcionada por Dr. Olivier Gillardeux (Safoni-Synthélabo, Paris, Francia). Son células de linfoma de ratón que se mantienen y crecen en un medio RPMI 1640 suplementado (**tabla 2**).



Figura 5. Visualización de cultivo de la línea celular L5178Y/ $Tk^{+/-}$ en microscopio óptico.

| Medio RPMI suplementado | Cantidad |
|---|----------|
| Medio RPMI 85% 1640 con HEPES | 500 mL |
| Suero de caballo 10% (calentado al baño maría a 37°C previamente) | 50 mL |
| Piruvato de sodio 2% | 10 mL |
| L-glutamina 1% | 5 mL |
| Penicilina-estreptomicina 1% | 5 mL |

Tabla 2. Composición del medio celular para L5178Y/Tk^{+/+}.

Las células son mantenidas a $1 \cdot 10^5$ céls/mL y 24 horas antes del inicio del ensayo se siembran a $2 \cdot 10^5$ céls/mL. Las células se mantuvieron a unas condiciones de cultivo de 37°C y 5% CO₂ en atmósfera humidificada (Water-Jacketed, US Autoflow Automatic CO₂ Incubator).

3.3 Preparación de la fracción microsomal s9

La mezcla de S9 es una fracción enzimática encargada de mimetizar la metabolización de una sustancia simulando lo que ocurriría *in vivo*, realizando las funciones necesarias tanto de las reacciones de fase I como de fase II de biotransformación. Es un sistema que ha demostrado aportar la misma calidad de datos que los hepatocitos, pero de una forma más eficiente y económica (Richardson y cols., 2016). La mezcla está compuesta por los siguientes reactivos (tabla 3):

| Componente | Cantidad |
|-------------------------|----------|
| H ₂ O | 316 µL |
| Tampón fosfato | 400 µL |
| NADPH | 32 µL |
| Glucosa | 4 µL |
| MgCl ₂ – KCl | 16 µL |
| Hígado de rata inducido | 32 µL |

Tabla 3: composición de la mezcla S9.

3.4 Ensayo de viabilidad

Para la realización del ensayo de viabilidad celular se eligieron diferentes concentraciones de CYN basándonos en los resultados de estudios previos realizados por Bazin y cols. (2010) en

dos líneas celulares humanas, Caco-2 y HepaRG, de origen intestinal y hepático, respectivamente.

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se expusieron a las distintas concentraciones de CYN en presencia y ausencia de S9 por triplicado (4,0-0,05 µg CYN/mL). Éstas fueron incubadas durante 4 y 24 horas respectivamente, periodo tras el cual se realizó el recuento de viabilidad celular mediante la cámara de Neubauer añadiendo previamente azul tripán. La dosis efectiva media (EC₅₀) fue calculada mediante una regresión lineal utilizando el programa Microsoft Office Excel.

3.5 Ensayo de MN

Desde hace años, se ha observado que la exposición a radiación ionizada o a compuestos químicos carcinogénicos pueden causar alteraciones en el material genético de células eucariotas (Evans, 1977). Hay evidencias que sugieren que las anomalías cromosómicas son una consecuencia directa de daño a nivel del ADN. Una forma de comprobar ese daño genético es mediante el ensayo de MN.

Los MN son corpúsculos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y con las mismas características morfológicas que el núcleo celular; se originan por fragmentos cromosómicos acéntricos (por ejemplo, carencia de centrómeros) o cromosomas enteros durante la etapa de anafase de la división nuclear y tienen valor en el diagnóstico de genotoxicidad (Castillo y cols., 2011; OECD 487, 2014). Estos MN aparecen en células que han completado una división nuclear y se encuentran en la fase binucleada del ciclo celular (Fenech y Morley, 1985 a,b).

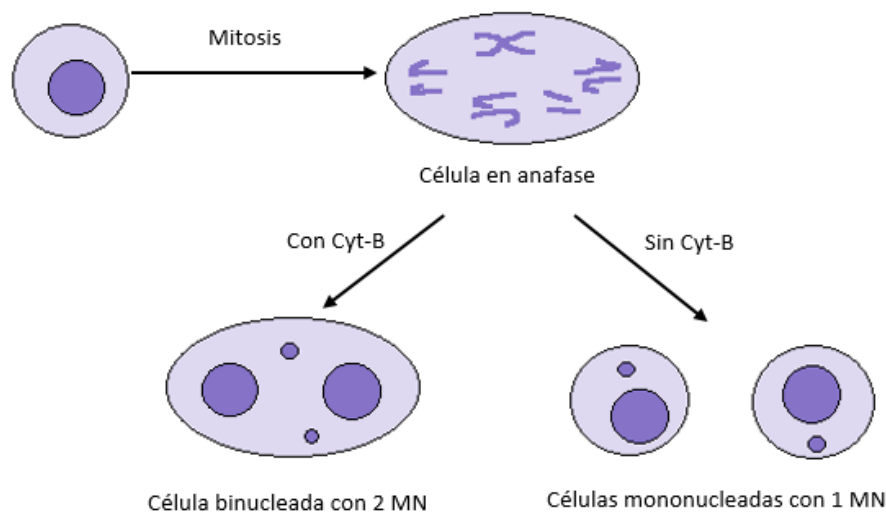


Figura 6. Formación de MN debido a la pérdida de un cromosoma entero y fragmentos cromosómicos en fase mitótica (Zalacain y cols., 2005).

En el ensayo de MN, las células han completado una división nuclear y son bloqueadas para formar la citocinesis usando Cyt-B, siendo identificadas por su aspecto binucleado, tal y como se muestra en la **Fig. 6**. Cyt-B es un inhibidor de la polimerización de actina que se requiere para la formación de anillos de microfilamentos que restringen el citoplasma entre los núcleos hijos durante la citocinesis (Carter, 1967).

Los MN sólo se contabilizan en células binucleadas, lo que permite una comparación fiable del daño en el cromosoma en la población celular que puede interferir en la cinética de división celular. Las condiciones de cultivo óptimas deben dar lugar a 35-60% o más binucleadas como proporción de células viables. Tras la realización del ensayo (detallado a continuación), la información que debe obtenerse por cada porta es:

1. El número de MN en al menos 1000 células binucleadas
2. La distribución de células binucleadas con 0 o más MN
3. La frecuencia de MN en al menos 1000 células binucleadas
4. La proporción de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas por cada 500 células contadas.

Con estos datos se calcula el índice de división nuclear (IDN) según el método de Eastmond y Tucker (1989) usando la siguiente fórmula:

$$\text{NDI} = (M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)) / N$$

Y el porcentaje de MN presentes en células binucleadas:

$$\%MN = n^{\circ} \text{ MN} * 100 / N$$

siendo M1-M4 el número de células con 1-4 núcleos, y N el número total de células viables contadas.

3.5.1 Ensayo de MN con S9

Este ensayo ha sido realizado según el protocolo de la OCDE 487 (2016) y Fenech (2000).

Se sembraron 14 frascos de exposición con 5 mL de L5178Y *Tk*^{+/−} cada uno y una densidad celular de $2 \cdot 10^5$ céls/mL. Tras 24 horas de crecimiento, las células se expusieron a las concentraciones de CYN seleccionadas (por duplicado) en función de la EC₅₀ calculada en el ensayo de viabilidad (0,125 μL/mL, 0,25 μL/mL, 0,5μL/mL, 1μL/mL y 2μL/mL). Se adicionaron a todos los frascos 50 μL/mL de la fracción microsomal S9 y 50 μL de CYN por frasco en concentración adecuada, 50 μL de medio (para el control negativo) o 50 μL de ciclofosfamida 8

$\mu\text{g/mL}$ (para el control positivo), quedando una proporción final de la concentración de exposición y la fracción metabólica del 1% (**Fig. 7**).



Figura 7. Células expuestas a distintas concentraciones de CYN.

Tras 4 horas de exposición en el incubador a 37°C , se procedió a quitar el medio con la toxina mediante centrifugado del contenido de los frascos en tubos de ensayo a 600rpm durante 6 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante mediante aspirado y se resuspendió el pellet con 5mL de medio nuevo suplementado con $10\ \mu\text{L}$ de Cyt-B ($3\ \text{mg/mL}$) por muestra (frasco). Se volvió a incubar a 37°C durante 20 horas, momento en el cual se procedió al choque hipotónico y posterior fijación de las células.

Choque hipotónico y fijación celular: tras pasar el contenido de los frascos a tubos de ensayo (**Fig.8**), éstos se centrifugan para poder eliminar el sobrenadante (igual al procedimiento anterior). Se añadieron 5 mL de KCl ($0,051\text{M}$) al pellet para resuspenderlo y tras 20 minutos, se volvieron a centrifugar, aspirar y resuspender en 5 mL de CARNOY (metanol: acético, 3:1) y 3 gotas de formaldehido 37% por cada muestra para su fijación. Se centrifugó, se aspiró y se resuspendió una vez más para limpiar las células añadiendo 5 mL de CARNOY. Finalmente, se centrifugó para concentrar el pellet en un volumen de 0,5 mL por muestra.



Figura 8. Traspaso de las células a tubos para proceder a su centrifugación.

Se procedió al goteo de la muestra en los portaobjetos por duplicado, su secado y posterior tinción con giemsa al 10%. Se les puso un cubre con ayuda del entellán. Una vez preparadas las muestras en los portaobjetos, se procedió al recuento celular en el microscopio óptico de campo claro a 100X con aceite de inmersión.

3.5.2 Ensayo de MN sin S9

Se siguió el mismo protocolo anteriormente descrito, pero sin añadir S9 mix y usando las concentraciones siguientes de CYN: 0,08 μ L/mL; 0,16 μ L/mL; 0,33 μ L/mL; 0,67 μ L/mL y 1,35 μ L/mL, elegidas según los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad. Se usó Myt-C (0,0625 μ g/mL) como control positivo y las células se mantuvieron con el tóxico durante 24 horas.

3.5.3 Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron procesados mediante un test de ANOVA seguido de Chisquare test para el %MN en células binucleadas. Las diferencias significativas entre IDN de las muestras expuestas a CYN y el control negativo fueron calculadas mediante Kruskal–Wallis test.

4. RESULTADOS

4.1 Ensayo de viabilidad celular en la línea celular L5178Y $Tk^{+/-}$

La EC_{50} de la CYN para la viabilidad en la línea celular L5178Y $Tk^{+/-}$ fue $2\mu\text{g CYN/mL}$ en presencia de S9 y $1,35\mu\text{g CYN/mL}$ en ausencia de S9 (Fig. 9 y 10, respectivamente).

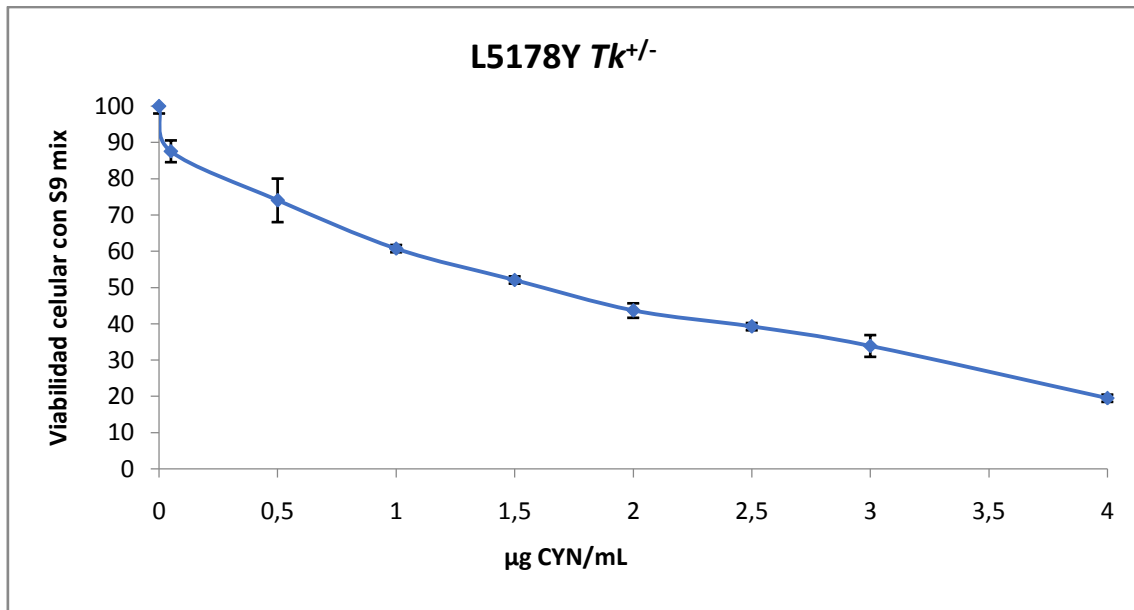


Figura 9. Ensayo de viabilidad de CYN con S9.

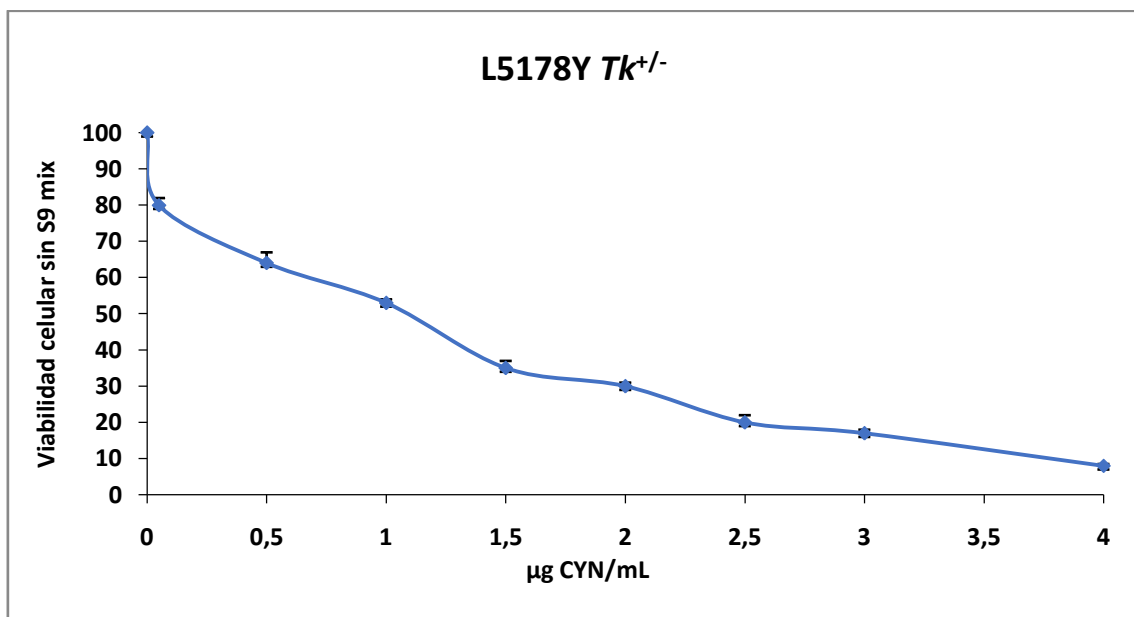


Figura 10. Ensayo de viabilidad de CYN sin S9.

4.2 Ensayo de MN

Los rangos de concentración de CYN elegidos para la realización del ensayo de MN *in vitro*, fueron seleccionados tomando como concentración más alta la EC₅₀ obtenida en los ensayos previos de viabilidad celular y dividiendo esta concentración por un factor de 2 tal y como está indicado en el protocolo de la OCDE 487 (2016).

Los resultados mostraron un aumento significativo en la frecuencia de las células binucleadas con MN en presencia de S9 en un rango de concentraciones entre 0,25 – 2,0 µg CYN/mL ($p < 0,01$; $p < 0,001$) en comparación con el grupo de control; sin embargo, no se observaron variaciones significativas en el porcentaje de MN en las células tratadas con la menor concentración (0,13µg CYN/mL) ni en ausencia de la fracción metabólica (en un rango de 0,08 - 1,35 µg CYN/mL) en comparación con sus respectivos grupos de control. En cuanto al IDN, no se observaron variaciones significativas en presencia de S9 en ninguna concentración ensayada en comparación con el grupo de control. Por el contrario, en ausencia de S9 se observó una disminución significativa en el IDN en las células tratadas con 0,67 y 1,35 µg CYN/mL ($p < 0,05$; $p < 0,001$). Como era de esperar, los controles positivos indujeron un aumento significativo en la frecuencia de MN tanto en presencia como en ausencia de la fracción metabólica S9 ($p < 0,01$; $p < 0,001$; ciclofosfamida y mitomicina C, respectivamente). Los resultados se muestran en las **tablas 4 y5**.

| Compuesto | Tiempo de tratamiento (h) | Concentraciones | Células binucleadas con MN (%)±DE | IDN ±DE |
|------------------|---------------------------|-----------------|-----------------------------------|----------|
| Control negativo | 24 | - | 0,4±0,0 | 1,9±0,0 |
| Ciclofosfamida | 24 | 8 µg/mL | 1,3±0,3** | 1,8±0,0* |
| CYN | 24 | 0,13 µg/mL | 0,8±0,3 | 1,8±0,1 |
| | 24 | 0,25 µg/mL | 1,3±0,2** | 1,8±0,0 |
| | 24 | 0,5 µg/mL | 1,5±0,1*** | 1,8±0,1 |
| | 24 | 1,0 µg/mL | 2,1±0,4*** | 1,9±0,1 |
| | 24 | 2,0 µg/mL | 2,0±0,9*** | 1,8±0,1 |

Tabla 4. Frecuencia de MN (%) e IDN en el cultivo celular de células de linfoma de ratón línea L5178Y *Tk*^{+/-} tratadas con CYN. El ensayo de genotoxicidad fue llevado a cabo en presencia de la fracción metabólica S9. Los valores están expresados como media ±DE. Los niveles de significación observados

fueron * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparación a los valores del grupo control (control negativo).

| Compuesto | Tiempo de tratamiento (h) | Concentraciones | Células binucleadas con MN (%)±DE | IDN ±DE |
|------------------|---------------------------|-----------------|-----------------------------------|------------|
| Control negativo | 24 | - | 0,5±0,1 | 1,9±0,1 |
| Mitomicina C | 24 | 0,0625 µg/mL | 7,6±1,1*** | 1,7±0,0* |
| CYN | 24 | 0,08 µg/mL | 0,4±0,2 | 1,8±0,0 |
| | 24 | 0,16 µg/mL | 0,1±0,2 | 1,6±0,2 |
| | 24 | 0,33 µg/mL | 0,4±0,6 | 1,8±0,1 |
| | 24 | 0,67 µg/mL | 0,2±0,2 | 1,6±0,2* |
| | 24 | 1,35 µg/mL | 0,4±0,2 | 1,4±0,1*** |

Tabla 5. Frecuencia de MN (%) e IDN en el cultivo celular de células de linfoma de ratón línea L5178Y $Tk^{+/-}$ tratadas con CYN. El ensayo de genotoxicidad fue llevado a cabo en ausencia de la fracción metabólica S9. Los valores están expresados como media ±DE. Los niveles de significación observados fueron * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ en comparación a los valores del grupo control (control negativo).

5. DISCUSIÓN

La CYN ha demostrado tener una alta estabilidad frente a la luz visible y ultravioleta, bajo condiciones anóxicas y sobre un gran rango de cambios de pH y temperaturas (Chiswell y cols., 1999; Wörmer y cols., 2008). Es una toxina emergente con una expansión global que tiene efectos citotóxicos y puede acumularse en organismos destinados al consumo humano (de la Cruz y cols., 2013; Buratti y cols., 2017). Teniendo en cuenta todas estas circunstancias, el riesgo de exposición humana a CYN puede ser potencialmente mucho más alto que para cualquier otra citotoxina.

En relación al potencial genotóxico de CYN contamos con un número reducido de trabajos en la bibliografía científica tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

En presencia de la fracción microsomal S9, nuestros resultados mostraron un aumento significativo en la frecuencia de las células binucleadas con MN en la línea celular L5178Y *Tk*^{+/-} expuesta a un rango de concentraciones de 0,25-2,0 µg CYN/mL durante un periodo de 4 horas. Concentraciones similares de CYN han mostrado un aumento significativo de MN en diferentes líneas celulares como Caco-2 diferenciadas (0,5-2,0 µg/mL) y HepaRG diferenciadas (0,04-0,3 µg/mL) (Bazin y cols., 2010). De forma similar a nuestro estudio, en presencia de S9, dichas células tienen actividad metabólica, por lo que es probable que dicho daño genotóxico fuera debido a los posibles metabolitos y no a la cianotoxina pura sin metabolizar. Además, estos autores llevaron a cabo el mismo ensayo en ambas líneas celulares añadiendo ketoconazol (conocido inhibidor del complejo enzimático CYP450) y obtuvieron una citotoxicidad un 50% más baja que sin dicho componente, reforzando así la teoría de que es el metabolito el que produce el daño y no la CYN *per se*. En este sentido, existen numerosos estudios que observan que la rápida toxicidad de CYN parece estar mediada por metabolitos generados por las enzimas del complejo CYP450 (Runnegar y cols., 1995; Froschio y cols., 2003) sugiriéndose una posible bioactivación de CYN (Funari y Testai, 2008). Esta hipótesis es apoyada, además, por la localización de la toxicidad hepática en la región periacinar, donde ocurre mayoritariamente la metabolización de xenobióticos mediada por CYP450, y por los efectos evidenciados *in vitro* e *in vivo* de inductores e inhibidores de CYP450 en la toxicidad de CYN (Froschio y cols., 2003; Bazin y cols., 2010). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron variaciones significativas en el porcentaje de MN en las células tratadas con la menor concentración de CYN (0,13 µg/mL) en presencia de S9. De forma contraria, Štraser y cols. (2011) demostraron que bajas concentraciones de CYN (0,05-0,5 µg/mL) en células HepG2 (línea celular con actividad metabólica propia) producían una actividad genotóxica por parte del metabolito de

la CYN evidenciado mediante el ensayo cometa y el test de MN. Estas diferencias en los resultados podrían ser debidas a dos factores: al tiempo de exposición, ya que ellos expusieron las células durante 24 horas y nosotros durante 4 horas; o a diferencias derivadas de líneas celulares distintas (HepG2 *versus* L5178Y $Tk^{+/-}$).

Por otra parte, en ausencia de la fracción metabólica S9 (en un rango de 0,08- 1,35µg CYN/mL) no se observó un aumento significativo de la frecuencia de MN en comparación con el grupo control. Estos resultados concuerdan con el estudio de genotoxicidad realizado por Humpage y cols. (2000), que también realizaron un ensayo de MN, donde no se detectó un aumento significativo de la frecuencia de MN en la línea celular WIL2-NS (línea celular de linfoblastoides B humanos) en ausencia de S9 en un rango similar de concentraciones (1-3 µg CYN/mL) durante 48 h. No obstante, a concentraciones mayores (6-10 µg CYN/mL) observaron un incremento significativo en la frecuencia de MN, evidenciando así un efecto genotóxico por parte de la cianotoxina. Las diferencias obtenidas podrían deberse no sólo a las diferencias en el modelo *in vitro* elegido, sino a las concentraciones de la toxina y al tiempo de exposición, siendo superiores en comparación con los utilizados en nuestro estudio. Por el contrario, Sieroslawska y Rymuszka (2014) obtuvieron un incremento de MN en la línea celular leucocitaria CLC de la carpa (*Cyprinus carpio L.*) tras una exposición a concentraciones similares a las utilizadas en nuestro estudio (1 µg CYN/mL) durante el mismo periodo (24 horas) y también en ausencia de S9. Los resultados sobre los aspectos genotóxicos de CYN realizados en células CHO-K1 mediante el ensayo cometa concuerdan con los nuestros en ausencia de S9, ya que tampoco se detectaron genotoxicidad de CYN (Fessard y Bernard, 2003). En la misma línea celular (CHO-K1), Lankoff y cols. (2007) demostraron que CYN carecía de actividad clastogénica en ausencia y presencia de S9 lo que difiere con los resultados obtenidos en L5178Y $Tk^{+/-}$ respecto al metabolito de la toxina.

6. CONCLUSIÓN

En general y tal como muestran nuestros resultados, la CYN no parece tener capacidad genotóxica *per se* en la línea celular L5178Y $Tk^{+/-}$, aunque sí muestra efectos clastogénicos y aneugénicos en presencia de la fracción microsomal S9, evidenciado por un aumento significativo en la frecuencia de MN en células binucleadas. Estos resultados aportan nuevos datos que fundamentan aún más la teoría valorada por algunos autores, que deducen que es el metabolito de CYN el que presenta actividad genotóxica. No obstante, son necesarias más investigaciones al respecto que nos ayuden a profundizar en el estudio del mecanismo de acción genotóxica de CYN. Es muy importante el avance en el conocimiento en relación a la capacidad genotóxica y potencial carcinógeno de esta toxina, para poder ser clasificada por la IARC e incluirla en la legislación reguladora con el fin de evitar riesgos derivados de su exposición para la salud humana.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSSA, 2006. Rapport sur l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives pp. 300

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 (Praha)*. 2000; 45(5): 439–46.

Akcaalan R, Köker L, Oğuz A, Spooß L, Meriluoto J, Albay M. First report of cylindrospermopsin production by two cyanobacteria (*Dolichospermum mendotae* and *Chrysosporum ovalisporum*) in Lake Iznik, Turkey. *Toxins (Basel)*. 2014; 6(11): 3173–86.

Anagnostidis K, Komárek J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales. *Algol Stud für Hydrobiol Suppl Vol*. 1988; 327–472.

Azevedo SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*. 2002; 181–182: 441–6.

Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel. *J Phycol*. 1997; 33(4): 613–6.

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*. 2009; NA-NA.

Bourke ATC, Hawes RB, Neilson A, Stallman ND. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon*. 1983; 21: 45–8.

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.

Byth S. Palm Island mystery disease. *Med J Aust*. 1980; 2(1): 40, 42.

Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins. *J Appl Bacteriol*. 1992; 72(6): 445–59.

Carmichael WW, Li R. Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. *Saline Systems*. 2006; 2: 5.

- Carter SB. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*. 1967; 213(5073): 261–4.
- Castillo E. Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradiente y frotis Improving the micronuclei test in cultured lymphocytes by gradient and. *Rev Peru Biol*. 2011; 18(2): 261–3.
- Chatziefthimiou AD, Metcalf JS, Glover WB, Banack SA, Dargham SR, Richer RA. Cyanobacteria and cyanotoxins are present in drinking water impoundments and groundwater wells in desert environments. *Toxicon*. 2016; 114: 75–84.
- Chiswell RK, Shaw GR, Eaglesham G, Smith MJ, Norris RL, Seawright AA and Moore MR, *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; 1999; p. 416
- 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.
- Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 203(3): 273–89.
- Eastmond DA, Tucker JD (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody, *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1989; 13(1): 34-43.
- Evans HJ. Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations, in: D. Scott, B.A. Bridges, F.H. Sobels (Eds.), *Progress in Genetic Toxicology*, Elsevier North Holland Biomedical Press, 1977; p. 57–74.
- 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. *Environ Toxicol*. 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.
- Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res*. 1986a; 161(2): 193–8.

Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1986b; 147(1–2): 29–36.

Fenech M. The in vitro micronucleus test. 2000; 455: 81–95.

Fessard V, Bernard C. Cell alterations but no DNA strand breaks induced in vitro by cylindrospermopsin in CHO K1 cells. *Environ Toxicol.* 2003; 18(5): 353–9.

Froschio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol.* 2003; 18(4): 243–51.

Froschio SM, Fanok S, Humpage AR. Cytotoxicity Screening for the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin. *J Toxicol Environ Heal Part A.* 2009a; 72(5): 345–9.

Froschio SM, Cannon E, Lau HM, Humpage AR. Limited uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin by Vero cells. *Toxicol.* 2009b; 54(6): 862–8.

Funari E, Testai E. Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure. *Crit Rev Toxicol.* 2008; 38(2): 97–125.

Funari E, Manganelli M, Sinisi L. Impact of climate change on waterborne diseases. *Ann Ist Super Sanita.* 2012; 48(4): 473–87.

Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos Á, María Cameán A. 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): 1567–72.

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): 1566–75.

Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos Ángeles, Moreno FJ, Cameán AM. Alterations observed in the endothelial HUVEC cell line exposed to pure Cylindrospermopsin. *Chemosphere.* 2012b; 89(9): 1151–60.

Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Vasconcelos VM, Cameán AM. Cyanobacterium producing cylindrospermopsin cause oxidative stress at environmentally relevant concentrations in sub-chronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere.* 2013; 90(3): 1184–94.

Guzmán-Guillén R, Gutiérrez-Praena D, de los Ángeles Risalde M, Moyano R, Prieto A, Pichardo S, et al. Immunohistochemical Approach to Study Cylindrospermopsin Distribution in Tilapia

(*Oreochromis niloticus*) under Different Exposure Conditions. *Toxins (Basel)*. 2014; 6(1): 283–303.

Guzmán-Guillén R, Manzano IL, Moreno IM, Ortega AIP, Moyano R, Blanco A, et al. 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 MT, Jackson AR, 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): 1292–5.

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

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(1–2): 155–61.

Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ Toxicol*. 2003; 18(2): 94–103.

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.

Kaebernick M, Neilan BA. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol Ecol*. 2001; 35(1): 1–9.

Kim JK, Kottuparambil S, Moh SH, Lee TK, Kim Y-J, Rhee J-S, et al. Potential applications of nuisance microalgae blooms. *J Appl Phycol*. 2015; 27(3): 1223–34.

Kinnear SHW, Fabbro LD, Duivenvoorden LJ, Hibberd EMA. Multiple-organ toxicity resulting from cylindrospermopsin exposure in tadpoles of the cane toad (*Bufo marinus*). *Environ Toxicol*. 2007; 22(6): 550–8.

Kinnear S. *Cylindrospermopsin: A Decade of Progress on Bioaccumulation Research*. *Mar Drugs*. 2010; 8(3): 542–64.

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(8): 1105–15.

Leão PN, Vasconcelos MTSD, Vasconcelos VM. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2009; 35(4): 271–82.

Mazmouz R, Chapuis-Hugon F, Mann S, Pichon V, Méjean A, Ploux O. Biosynthesis of *cylindrospermopsin* and 7-epi*cylindrospermopsin* in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76(15): 4943–9.

Mohamed ZA, Al Shehri AM. Microcystin-producing blooms of *Anabaenopsis arnoldi* in a potable mountain lake in Saudi Arabia. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009; 69(1): 98–105.

Neumann C, Bain P, Shaw G. Studies of the comparative in vitro toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycylindrospermopsin. *J Toxicol Environ Health A*. 2007; 70(19): 1679–86.

Norris RL, Eaglesham GK, Pierens G, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, et al. Deoxycylindrospermopsin, an analog of *cylindrospermopsin* from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol*. 1999; 14(1): 163–5.

OECD. OECD TG487 - In-vitro mammalian cell micronucleus test. *Organ Econ Co-operation Dev Publ*. 2014;(September): 1–26.

Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC. *Cylindrospermopsin*: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc*. 1992; 114(20): 7941–2.

Oliveira VR, Carvalho GMC, Avila MB, Soares RM, Azevedo SMFO, Ferreira TS, et al. Time-dependence of lung injury in mice acutely exposed to *cylindrospermopsin*. *Toxicol*. 2012; 60(5): 764–72.

Poniedziałek B, Rzymiski P, Kokociński M. *Cylindrospermopsin*: Water-linked potential threat to human health in Europe. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012; 34(3): 651–60.

- Preußel K, Stüken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon*. 2006; 47(2): 156–62.
- Puerto M, Jos A, Pichardo S, Gutiérrez-Praena D, Cameán AM. Acute effects of pure cylindrospermopsin on the activity and transcription of antioxidant enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed by gavage. *Ecotoxicology*. 2011; 20(8): 1852–60.
- Rastogi RP, Sinha RP. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnol Adv*. 2009; 27(4): 521–39.
- Richardson SJ, Bai A, Kulkarni AA, Moghaddam MF. Efficiency in Drug Discovery: Liver S9 Fraction Assay As a Screen for Metabolic Stability. *Drug Metab Lett*. 2016; 10(2): 83–90.
- Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*. 2006; 12(9): 440–50.
- Rücker J, Stüken 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): 800–9.
- Runnegar MT, Kong S-M, Zhong Y-Z, Lu SC. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 1995; 49(2): 219–25.
- 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.
- Schembri MA, Neilan BA, Saint CP. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol*. 2001; 16(5): 413–21.
- Shaw GR, Sukenik A, Livne A, Chiswell RK, Smith MJ, Seawright AA, et al. Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia. *Environ Toxicol*. 1999; 14(1): 167–77.
- Sieroslawska A, Rymuszka A. Cylindrospermopsin induces oxidative stress and genotoxic effects in the fish CLC cell line. *J Appl Toxicol*. 2015; 35(4): 426–33.

- Sinha R, Pearson LA, Davis TW, Muenchhoff J, Pratama R, Jex A, et al. Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BMC Genomics*. 2014; 15(1): 83.
- Skulberg OM. Cyanobacteria/cyanotoxin research—Looking back for the future: The opening lecture of the 6th ICTC, Bergen, Norway. *Environ Toxicol*. 2005; 20(3): 220–8.
- 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): 552–60.
- Štraser A, Filipič M, Žegura B. Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Arch Toxicol*. 2011; 85(12): 1617–26.
- Stuken A, Jakobsen KS. The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: organization and recombination. *Microbiology*. 2010; 156(8): 2438–51.
- Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada KI, et al. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon*. 1994; 32(7): 833–43.
- Tomitani A, Knoll AH, Cavanaugh CM, Ohno T. The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(14): 5442–7.
- Torokne A, Palovics A, Bankine M. Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria—experimental evidence. *Environ Toxicol*. 2001; 16(6): 512–6.
- Van Apeldoorn ME, Van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51(1): 7–60.
- Vijayakumar S, Menakha M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria—A review. *J Acute Med*. 2015; 5(1): 15–23.
- 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: 203–6.
- Wörmer L, Cirés S, Carrasco D, Quesada A. Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40-day study. *Harmful Algae*. 2008; 7(2): 206–13.

Yilmaz M, Philips EJ, Szabo NJ, Badylak S. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicon*. 2008; 51(1): 130–9.

Zalacain M, Sierrasesúмага L, Patiño A. Anales del Sistema Sanitario de Navarra El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. 2005; 227–36.

Žegura B, Štraser A, Filipič M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2011; 727(1–2): 16–41.