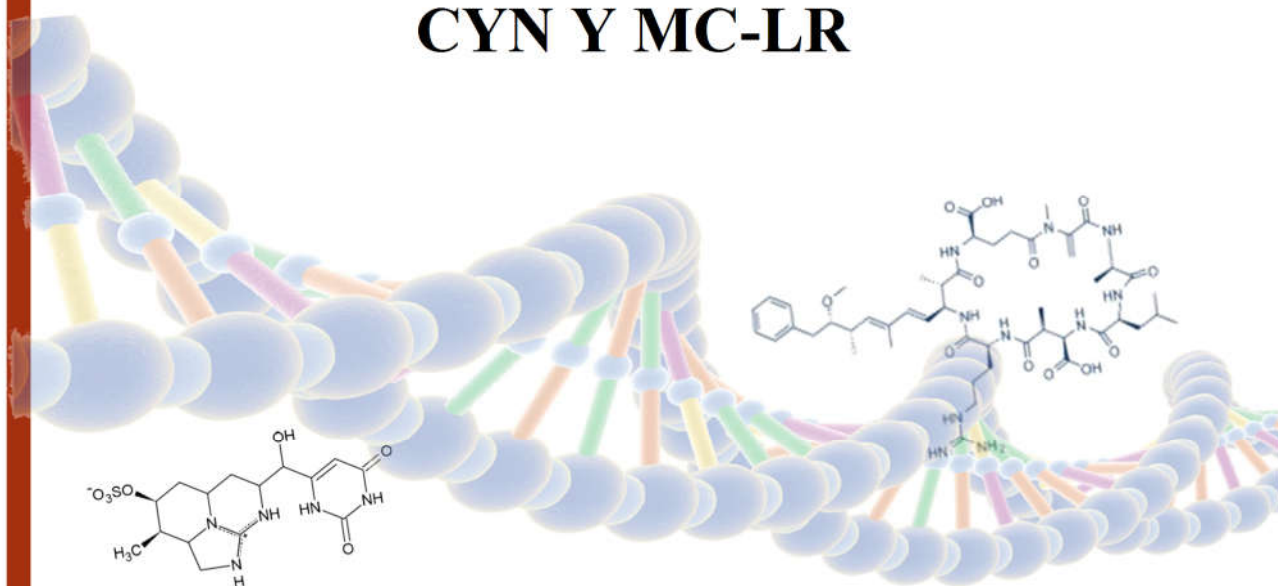


DETERMINACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO Y OXIDATIVO DE CÉLULAS CACO-2 TRAS LA EXPOSICIÓN A LA MEZCLA DE CYN Y MC-LR



Sara Aliseda Diez-Madroño

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla





Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia. Grado en Farmacia

TRABAJO FIN DE GRADO

Trabajo experimental

DETERMINACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO Y OXIDATIVO DE CÉLULAS CACO-2 TRAS LA EXPOSICIÓN A LA MEZCLA DE CYN Y MC-LR

Sara Aliseda Diez-Madroño

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

Tutoras: Dra. María Puerto Rodríguez y Dra. Sara Maisanaba Hernández

Lugar de presentación: Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

Fecha de presentación: 5 de Julio de 2017

RESUMEN

Las floraciones de cianobacterias en agua dulce están asociadas con la producción de cianotoxinas, sustancias perjudiciales para los animales, las plantas y los seres humanos. De todas ellas, las más abundantes en la naturaleza y por tanto las más estudiadas de forma individual son la cilindrospermopsina (CYN) y la microcistina-LR (MC-LR). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda el estudio las mezclas de cianotoxinas, ya que es frecuente encontrar en estas floraciones de cianobacterias varias cianotoxinas juntas, y es importante conocer si existe alguna variación en los efectos tóxicos que producen, respecto a los producidos por separado.

En el presente trabajo se estudia la genotoxicidad producida por la mezcla de CYN y MC-LR en células de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 mediante el ensayo cometa estándar y modificado con las enzimas endonucleasa III (Endo III) y formamidopiridina ADN glicosilasa (FPG) con el fin de determinar el potencial genotóxico y posible daño oxidativo en el ADN producido por la oxidación de las bases pirimidínicas y púricas, respectivamente. Se evaluó la mezcla de ambas cianotoxinas en un rango de diferentes concentraciones preservando siempre la ratio 1:10, siendo así para la CYN 0.6, 1.5, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ y para MC-LR 6, 12.5 y 25 $\mu\text{g/ml}$, durante 24 y 48 h de exposición. De forma general se observó una ausencia de genotoxicidad así como daño oxidativo del ADN bajo las condiciones ensayadas. Serían necesarios más estudios para poder contar con un conocimiento más amplio sobre el efecto genotóxico producido por la combinación de las diferentes cianotoxinas.

PALABRAS CLAVES: Cilindrospermopsina, Microcistina-LR, células Caco-2, ensayo cometa, genotoxicidad.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 6
1.1. Cianobacterias y cianotoxinas.....	Pág. 6
1.2. Clasificación de las cianotoxinas.....	Pág. 7
1.3. Microcistinas.....	Pág. 8
1.4. Cilindrospermopsina.....	Pág. 11
1.5. Vías de exposición.....	Pag. 12
1.6. Efectos producidos por exposición a cianotoxinas.....	Pag. 13
1.7. Genotoxicidad.....	Pag. 13
1.7.1. Efectos genotóxicos descritos por exposición a MCs y CYN de forma individual y en mezcla.....	Pag. 13
1.7.2. Métodos para la evaluación de la genotoxicidad.....	Pag. 14
2. OBJETIVO.....	Pag. 17
3. MATERIALES Y MÉTODO.....	Pag. 18
3.1. Productos químicos.....	Pag. 18
3.2. Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	Pag. 18
3.3. Exposición de las células al tóxico.....	Pag. 18
3.4. Ensayo cometa estándar.....	Pag. 19
3.5. Ensayo cometa modificado con enzimas.....	Pag. 21
3.6. Tratamiento de los resultados y análisis estadístico.....	Pag. 22
4. RESULTADOS	Pag. 23
5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	Pag. 26
6. CONCLUSIÓN.....	Pag. 30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	Pag. 31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cianobacterias y cianotoxinas

Las cianobacterias son microorganismos procariotas unicelulares que han existido desde hace aproximadamente 3500 millones de años (Tomitani et al., 2006). Estos organismos están distribuidos de una forma muy amplia en la naturaleza tanto en hábitats terrestres como de agua dulce y marinos. Además, suelen tolerar ambientes extremos mejor que otros organismos pudiendo ser halladas también en manantiales termales, lagos salinos, en la superficie del suelo o rocas y, ocasionalmente, en el interior de las mismas (Madigan et al., 2008).

El crecimiento exponencial de las cianobacterias es diferente según el hábitat donde residan. En suelos desérticos sometidos a luz solar intensa, las cianobacterias crecen formando cortezas de gran tamaño sobre la superficie. Estas cortezas crecen durante el invierno o durante las lluvias de primavera, el resto del año se mantienen latentes. Por otro lado, cuando se trata de bahías marinas poco profundas y con una temperatura relativamente templada, las cianobacterias crecen formando tapices de un grosor considerable. En el caso de lagos de agua dulce y con gran cantidad de nutrientes se pueden producir explosiones poblacionales o floraciones masivas de cianobacterias, conocidas como “blooms”, consistentes en un crecimiento desmedido de estos microorganismos (Chorus et al., 2000).

Las floraciones masivas o “blooms” de cianobacterias producen un impacto importante en la calidad de agua, ya que aumenta la turbidez y produce depleción del oxígeno, provocando serios riesgos para otros organismos acuáticos (O’Neil et al., 2012). Además, se estima que el 25 - 75% de las floraciones de cianobacterias son tóxicas debido a su capacidad de producir una amplia gama de toxinas, llamadas cianotoxinas (Carmichael et al., 2001; Chorus, 2001). Esto supone una gran preocupación ya que son un riesgo tanto para los seres humanos y animales que los consumen, como para el medio ambiente en general (O’Neil et al., 2012; Quesada et al., 2006).

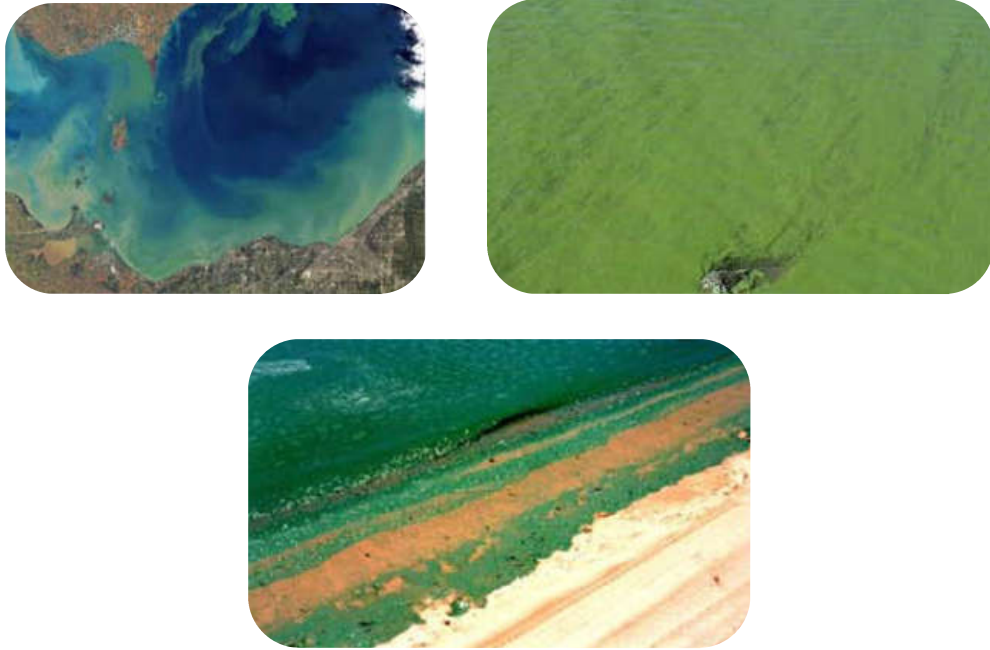


Figura 1. Floraciones de cianobacterias en diversas partes del mundo. (1) Lago Erie, Canadá y EEUU (2) Reserva La Pinilla, Madrid, España (3) Matilda Bay (Australia) (tomado de Sola, 2013).

Las cianotoxinas son compuestos bioactivos fruto del metabolismo secundario de algunas cianobacterias. Estas toxinas son utilizadas por las cianobacterias como agentes anticancerígenos, antivirales o como protectores frente a la luz ultravioleta (Sivonen y Jones, 1999). Algunos de estos compuestos son útiles en algunos sectores socioeconómicos, como por ejemplo la agricultura (Prasanna et al., 2010) y la industria farmacéutica (Chlipala et al., 2011). Sin embargo, muchos de estos productos bioactivos son nocivos para la salud de otros organismos vivos, incluyendo al ser humano, por los efectos tóxicos que producen (Sivonen y Jones, 1999). Se han descrito numerosos casos de envenenamientos mortales en animales salvajes que han sido asociados a la ingestión de cianotoxinas, especialmente por beber agua contaminada con cianobacterias productoras de estas toxinas. En cuanto a casos de intoxicación producidos en seres humanos, se han documentado intoxicaciones producidas por diferentes vías de exposición tales como la vía oral, dérmica o en algún tratamiento médico como la diálisis (Funari y Testai, 2008).

1.2. Clasificación de la cianotoxinas

Hay gran variedad de cianotoxinas producidas por diferentes cianobacterias. Se diferencian entre sí por su estructura química y su toxicidad, pudiéndose clasificar en

función del órgano o sistema al que afectan preferentemente (Falconer y Humpage, 2005; Pearson et al., 2010; Wood, 2016) (Tabla 1).

Principal efecto tóxico	Cianotoxina
Hepatotoxicidad	Microcistinas
	Nodularinas
Citotoxicidad	Cilindrospermopsina
Neurotoxicidad	Saxitoxina
	Anatoxin-a
	Anatoxin-a (S)
	β -metilamino-L-alanina (BMAA)
Dermatotoxicidad	Aplisiatoxinas
	Lyngbyatoxina A
Irritantes	Lipopolisacáridos

Tabla 1. Clasificación de algunas cianotoxinas en función de su potencial toxicidad.

De todas las cianotoxinas, y dado que son las únicas que han causado fenómenos masivos de intoxicación en poblaciones humanas, merecen especial atención las Microcistinas (MCs) y la Cilindrospermopsina (CYN), constituyendo ambas el principal objeto de estudio de este Trabajo Fin de Grado.

1.3. Microcistinas

La MCs son las cianotoxinas más ampliamente detectadas en agua dulce conociéndose hoy en día unas 100 variantes en función del grado de metilación, hidroxilación, epimerización, secuencia del péptido y toxicidad (Wu et al., 2014). Las MCs son térmicamente estables y solubles en agua, y están generalmente contenidas en las células vivas, pero son liberadas al medio cuando éstas mueren o se lisan, como, por ejemplo, tras el tratamiento de las aguas con sulfato de cobre. Estas pueden ser producidas por floraciones de cianobacterias de diferentes géneros tales como *Microcystis*, *Dolichospermum*, *Plankothrix*, *Nostoc* y *Snowella* (Botes et al., 1982; Falconer y Humpage, 2005) (Figura 2).

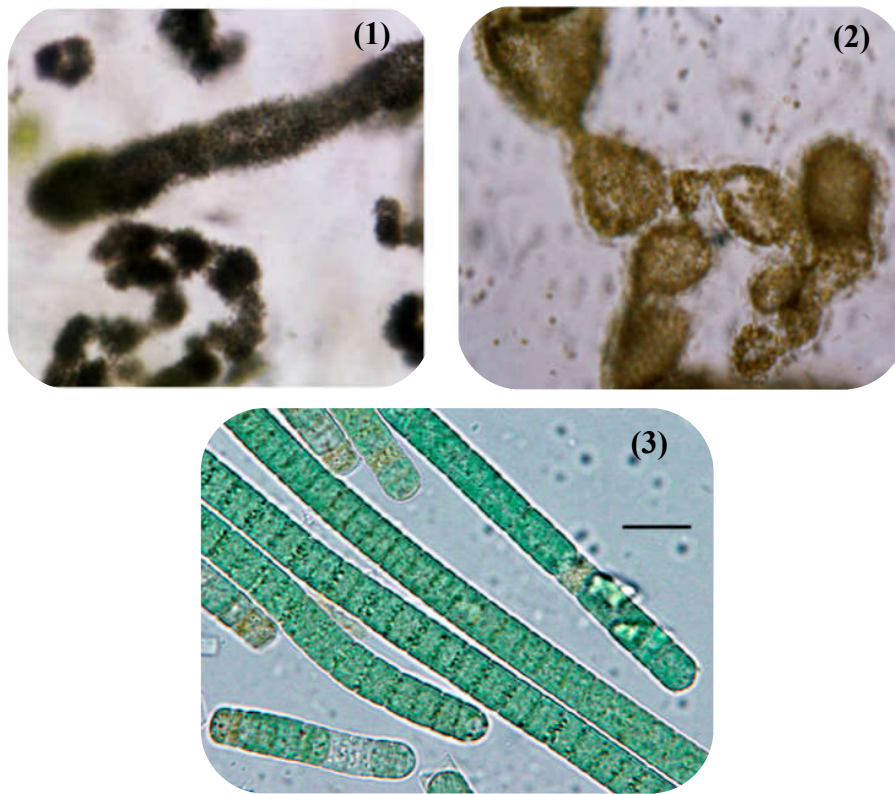


Figura 2. (1) *Microcystis aeruginosa*, (2) *Microcystis wesenbergii* (ambas tomadas de CEDEX, Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino), (3) *Planktothrix* sp. (tomado de Wood et al., 2010).

La estructura química general del grupo de las MCs es un cicloheptapéptido como se muestra en la Figura 3. A esta estructura se le nombra MC-XZ, donde X y Z son dos variables que pueden ser L-aminoácidos diferentes. X normalmente corresponde a residuos de leucina (L), arginina (R) o tirosina (Y), mientras que Z suele ser arginina (R) o alanina (A). Su estructura también es característica por la presencia del ácido 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimeti-deca-4,6-ácido dienoico, también conocido como ADDA, atribuyéndole a éste la responsabilidad de su toxicidad (Carmichael, 1997; Carmichael et al., 2001; Kaloudis et al., 2013). Así, los congéneres más comúnmente encontrados en la naturaleza son la microcistina-LR (MC-LR) con leucina (L) y arginina (R), microcistina-RR (MC-RR) con dos residuos de arginina (R), y MC-YR con tirosina (Y) y arginina (R), todos ellos en las posiciones 2 y 4, respectivamente (Carmichael 1988).

Fundamentalmente, las MCs son conocidas por ser potentes hepatotoxinas, pero algunas MCs específicas han dado lugar a efectos neurotóxicos (Feurstein et al., 2011;

Li et al., 2012, 2014). Más recientemente, se ha descubierto que también puede verse afectados otros órganos como tiroides y pulmón (Buratti et al., 2017).

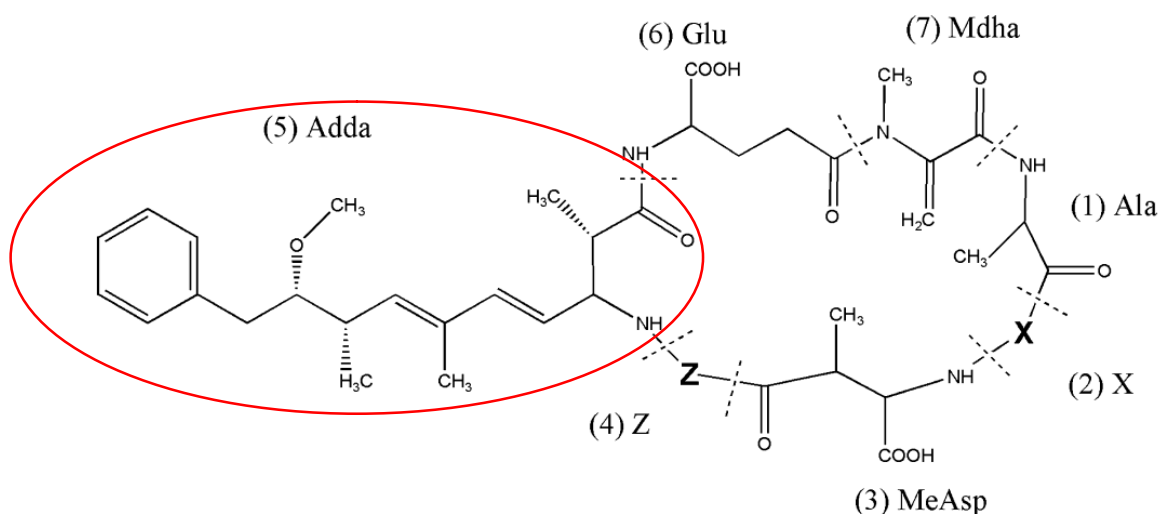


Figura 3. Estructura general de las MCs (MC-XZ). Marcado en rojo el aminoácido responsable de la toxicidad (tomado de Kaloudis et al., 2013).

Uno de los principales mecanismos de acción de las MCs está asociado con la inhibición específica de fosfatasa de las proteínas serina/treonina (PP1 y PP2A), dando lugar a una alteración en la fosforilación de las proteínas celulares implicadas en la transducción de señales (Gehringer, 2004). Otro mecanismo descrito por diversos autores es el estrés oxidativo, produciéndose un desequilibrio entre la presencia de radicales libres y sustancias antioxidantes debido al incremento de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y a una depleción de glutatión (GSH) por exposición a MCs. El estrés oxidativo producido por las MCs ha sido demostrado tanto en diversos modelos experimentales *in vitro* (Nong et al., 2007; Pichardo et al., 2007; Zhang et al., 2008; Puerto et al., 2009a; Puerto et al., 2009b) como en diferentes sistemas *in vivo* (Ding et al., 1998; Jos et al., 2005; Atencio et al., 2008). Además, también pueden actuar como promotores tumorales (Li et al., 2009; Wang et al., 2013; Liu et al., 2006). De hecho, la MC-LR ha sido clasificada como “posible carcinogénica para los seres humanos” (grupo 2B) por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC,2010) (<http://www.iarc.fr/>).

En 1998 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció que el valor de MC-LR en el agua potable no debe ser superior a 1 µg/L (WHO, 1998). Actualmente,

España es uno de los pocos países que cuenta con legislación concreta para los niveles de MCs, regulados por el RD140/2003, no permitiéndose valores superiores a 1 µg/L de MCs en el agua, tal como recomienda la OMS.

1.4. Cilindrospermopsina

La CYN proviene del producto secundario del metabolismo de *Cylindrospermopsis raciborskii* y otras cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Umezakia* y *Aphanizomenon* (Falconer, 2004), siendo la primera la mayor productora (Bouvy et al., 2000; Briand et al., 2004). Es considerada una citotoxina, ya que produce efectos tanto hepatotóxicos como nefrotóxicos, aunque otros órganos tales como son bazo, intestino, timo y corazón entre otros, también pueden resultar dañados tras la exposición a la misma (Terao et al., 1994; Falconer et al., 1999; Seawright et al., 1999). Recientemente en estudios *in vivo* han demostrado también su efecto neurotóxico (Guzmán-Guillén et al., 2015)

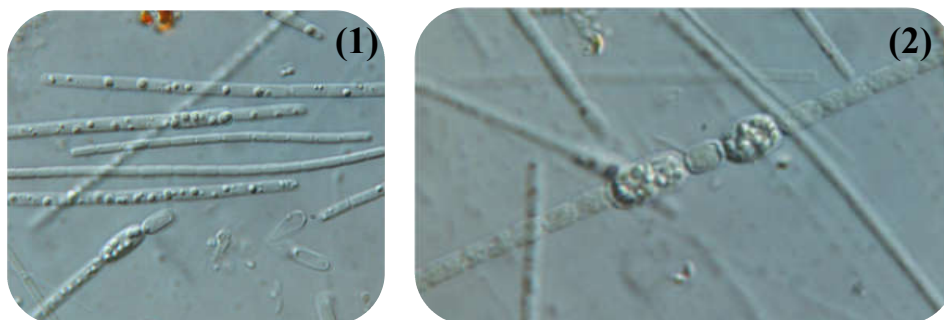


Figura 4. (1) *Cylindrospermopsis raciborskii*, (2) *Aphanizomenon aphanizomenoides* (tomado de CEDEX, Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino)

La CYN tiene estructura química de alcaloide formado por un anillo tricíclico de guanidina y combinado con un grupo hidroximetiluracilo (Ohtani et al., 1992) (Figura 5). Hasta la fecha se han descubierto 5 variantes: la CYN, 7-epicilindrospermopsina, 7-desoxicilindrospermopsina, 7-desoxi-desulfo-cilindrospermopsina, 7-desoxi-desulfo-12-acetilcilindrospermopsina (Wimmer et al., 2014). La CYN es una molécula soluble en agua y muy estable, siendo resistente a diferentes condiciones de acidez, temperatura, luz solar y a la degradación biológica (Wormer et al., 2008).

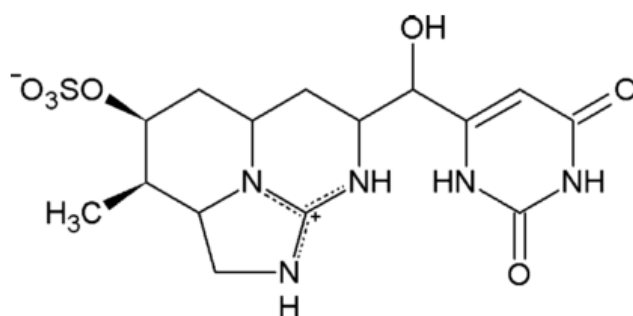


Figura 5. Estructura general de la CYN (tomado de Štraser et al., 2011)

Aunque el mecanismo de acción tóxica de la CYN aún no ha sido totalmente esclarecido y sus dianas moleculares específicas no están caracterizadas (Campos et al., 2013), se considera que su toxicidad está mediada por el citocromo P450 (CYP450) (Humpage et al., 2005). Los principales mecanismos de toxicidad conocidos de la CYN son la inhibición irreversible de la síntesis de proteínas (Runnegar et al., 2002; Froscio et al., 2003) y GSH (Runnegar et al., 1994, 1995; Humpage et al., 2005), la fragmentación del ADN resultado de la genotoxicidad mediada por la toxina (Žegura et al., 2011b), así como el estrés oxidativo, la peroxidación de los lípidos y oxidación proteica demostrados en estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en peces (Gutiérrez-Praena et al., 2011a,b; Puerto et al., 2011; Guzmán-Guillén et al., 2013).

Debido a la toxicidad y ubicuidad de la CYN, la OMS está estudiando establecer como valor guía en aguas de consumo el propuesto por Humpage y Falconer (2003) de 1 µg CYN/l. Del mismo modo, no se ha adoptado todavía ningún valor guía para la CYN en aguas recreativas y de baño. En cuanto a los límites de consumo de la CYN, la ingesta diaria tolerable (IDT) es 0,03 µg/kg de peso corporal (p.c.). En nuestro país, a diferencia de las MCs, carece de legislación al respecto.

1.5. Vías de exposición a cianotoxinas

La exposición a cianotoxinas puede ser directa o indirecta. Las vías de exposición directas incluyen la vía oral tras consumo agua contaminada; la vía dérmica sobre todo en ambientes recreativos tras un baño en aguas afectadas; la vía inhalatoria a través de partículas de aerosol durante la ducha, o al realizar deportes acuáticos; y la vía intravenosa mediante intervenciones médicas. Las vías de exposición indirectas pueden darse por ingestión de animales o plantas que han sido expuestos a cianotoxinas, así

como por ingesta de suplementos alimenticios a base de cianobacterias. De todas ellas la vía oral es la más común (Wood, 2016).

1.6. Efectos tóxicos generales producidos por exposición a las cianotoxinas

Tras la exposición a cianotoxinas, los síntomas más característicos descritos son aquellos relacionados con alteraciones digestivas como vómitos, diarrea y dolor abdominal y/o, alteraciones dérmicas o de mucosas como irritación de la piel, debilidad y dolor de garganta, así como palidez en la membrana mucosa (Chorus y Bartram, 1999). A concentraciones elevadas, estas toxinas podrían causar la muerte en un corto periodo de tiempo por parada respiratoria o insuficiencia hepática. Uno de los casos más conocidos de intoxicación por MCs en humanos ocurrió en Caruaru (Brasil), donde 130 pacientes sometidos a hemodiálisis fueron tratados accidentalmente con agua contaminada con MCs, de los cuales murieron 56 (Azevedo et al., 2002). En cuanto a la CYN, cabe destacar el primer caso de intoxicación de 100 niños en la Isla de Palma (Australia) en 1979. Los niños intoxicados fueron ingresados en el hospital con varios síntomas gastrointestinales tras haber ingerido agua contaminada que contenía CYN (Griffiths y Saker, 2003).

Además, la exposición crónica a dosis bajas de algunas hepatotoxinas también se ha asociado con la promoción de tumores (Chen et al., 2009).

1.7. Genotoxicidad

Genotoxicidad es un término muy amplio que hace referencia a los procesos que alteran la estructura, el contenido, la información o la segregación del ADN y no están necesariamente asociados a la mutagenicidad (EFSA, 2011).

1.7.1. Efectos genotóxicos descritos por exposición a MCs y CYN de forma individual y en mezcla

El potencial genotóxico de las MCs ha sido evaluado mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. De forma general, los estudios *in vitro* han dado resultados contradictorios. Ding et al. (1999) y Sieroslawska (2013) describen una ausencia de genotoxicidad por exposición a MCs en mediante el ensayo de Ames; sin embargo, otros autores han descrito efectos citotóxicos y capacidad aneugénica (Zhang et al., 2004; Žegura et al., 2008; Dias et al., 2014). En estudios *in vivo*, la inducción de la rotura del ADN parece

estar asociada a procesos de estrés oxidativo, o bien a una interferencia en la reparación del ADN (Funari y Testai, 2008; Žegura et al., 2011).

Del mismo modo, el potencial genotóxico de la CYN también ha sido descrito mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Principalmente, en estudios *in vitro* se observó la rotura de la hebra de ADN en líneas celulares de origen hepático mediante el ensayo cometa (Štraser et al., 2013a,b). Además, cabe destacar que se observó un incremento del daño del ADN en presencia de CYN que disminuye en presencia de inhibidores del CYP450 (Funari y Testai, 2008; Žegura et al., 2011a). Sin embargo, hasta el momento, no se han demostrado los efectos mutagénicos mediante el Test de Ames tras la exposición a la CYN (Sieroslawska, 2013). En estudios *in vivo*, se observó daño genotóxico en varios órganos, destacando entre ellos el hígado y el riñón (Terao et al., 1994; Falconer et al., 1999; Seawright et al., 1999).

Hasta la fecha no hay muchos ensayos realizados con la mezcla de MCs y CYN. Recientemente hay estudios que sugieren que las concentraciones de MCs y CYN sintetizadas por diferentes cianobacterias podrían variar por competencia entre ellas, y en función de la concentración de nitrógeno e incidencia de la luz (Chia et al., 2017). La mezcla de CYN y MC-LR ha sido estudiada *in vitro* en células hepáticas, obteniéndose unos resultados de genotoxicidad similares a los producidos por las toxinas por separado (Hercog et al., 2016). Por otro lado, Esterhuizen-Londt et al. (2016) han comparado la toxicidad de mezclas sintéticas de cianotoxinas con el extracto crudo de la floración, obteniéndose una mayor toxicidad en los grupos tratados con el extracto crudo. Además, Freitas et al. (2015) también ha corroborado *in vivo*, en un cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.), el efecto producido por MC-LR, CYN y la mezcla de ambas, utilizando como indicador el crecimiento de la raíz y hojas, el estrés oxidativo y la cantidad de minerales que contiene la planta.

1.7.2. Métodos para la evaluación de la genotoxicidad

Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), los ensayos de genotoxicidad son un requisito indispensable a llevar a cabo para una completa evaluación de riesgos de una sustancia. Los ensayos de genotoxicidad están diseñados para detectar compuestos que inducen directa o indirectamente daño en el material genético por diferentes mecanismos. Generalmente, se considera que este daño es esencial para producir efectos heredables o para mediar las distintas etapas de formación

de tumores. Existe una amplia gama de ensayos de genotoxicidad, entre ellos los más comunes para evaluar el potencial genotóxico son:

- **Ensayo Cometa**

El ensayo cometa estándar determina el daño genotóxico que produce una sustancia en la célula por roturas de la hebra de ADN. Las células se exponen a la sustancia que se pretende evaluar y, posteriormente, utilizando como soporte un gel de agarosa, se lisan. Por último, se realiza una electroforesis, que desplaza las hebras de ADN que han sido fraccionadas hacia el ánodo, ya que el ADN tiene carga negativa. Esto da lugar a lo que se conoce como cometa, formado por la cabeza y la cola. Cuanto mayor sea el tamaño de la cola, mayor es el daño genotóxico producido por la sustancia en cuestión (Azqueta y Collins, 2013).

Otra versión, denominada ensayo cometa modificado con enzimas, permite la determinación del daño genotóxico producido por la oxidación de las bases púricas y pirimidínicas. El procedimiento es igual que en el ensayo cometa, pero incluye antes de la electroforesis un periodo de incubación de las células lisadas con enzimas, en este caso endonucleasa III (Endo III) para detectar la oxidación de las bases pirimidínicas y formamidopiridina ADN glicosilasa (FPG) para las bases púricas (Azqueta et al., 2009).

- **Test de Ames**

El test de Ames es considerado también como test de mutagenicidad, en el que *Salmonella Typhimurium his⁻* es expuesta a las diferentes concentraciones del compuesto tóxico en un medio *his⁻*. Se comprueba el crecimiento de diferentes cepas después de la exposición al tóxico, evaluando si se ha producido el crecimiento de la misma por alteración en el material genético, revirtiendo así la mutación que presenta (Ames, 1975).

- **Ensayo de micronúcleos**

El ensayo de micronúcleos (MN) determina el daño cromosómico mediante el recuento de MN. Durante la división celular, el ADN se multiplica y divide dando lugar a dos células hijas idénticas. Este mecanismo podría alterarse debido a errores en la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y sustancias genotóxicas, produciéndose pérdidas cromosómicas que impiden

la división equitativa del material genético. Las pérdidas cromosómicas pueden dar lugar a un nuevo núcleo de menor tamaño (MN) visible al microscopio óptico (Fenech, 2000).

De todos ellos, el ensayo cometa es el más utilizado para la detección del daño directo producido en el ADN mediante roturas simples o dobles de la hebra, siendo uno de los más utilizados en células eucariotas (Neri et al., 2015). Además, la modificación de este ensayo mediante la incorporación de enzimas de restricción es el único que nos proporciona información suficiente para comprobar si el estrés oxidativo está implicado de forma indirecta en ese daño genotóxico (Azqueta et al., 2009).

2. OBJETIVO

Debido a la abundante presencia en la naturaleza y posible co-exposición a CYN y MC-LR, así como habiendo sido descrito el daño en el ADN como posible mecanismo de acción para ambas, el objetivo del presente estudio ha sido determinar por primera vez el daño genotóxico y oxidativo sobre el ADN producido en la línea celular de adenocarcinoma de colon Caco-2 por exposición a CYN y MC-LR de forma combinada mediante el ensayo cometa estándar y modificado, tomando como proporción de ambas cianotoxinas la encontrada en la naturaleza.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Productos químicos

El medio esencial mínimo (MEM), el suero fetal bovino (SFB), los aminoácidos no esenciales (AANE), la gentamicina, la L-glutamina, el piruvato sódico (CAS No. 113-24-6) y la tripsina (CAS No. 9002-07-7) fueron adquiridos en Gibco (Biomol, España). La CYN fue adquirida en Alexis Corporation (Lausen, Suiza) y la MC-LR Alexis Biochemicals (Suiza), la enzima Endonucleasa III (Endo III) (EC 3.1.21.5) fue proporcionada por C-Viral S.L. (Sevilla, España). La formamidopiridina ADN glicosilasa (FPG) (EC 3.2.2.23), el dimetil sulfóxido (DMSO) (CAS No. 67-68-5), azul tripán (CAS No. 72-57-1), Tris-HCl (CAS No. 1185-53-1), KCl (CAS No. 7447-40-7), Na₂HPO₄ (CAS No. 7558-79-4), KH₂PO₄ (CAS No. 7778-77-0), EDTA (CAS No. 10378-23-1), BSA (CAS No. 9048-46-8), HEPES (CAS No. 7447-40-7), agarosa de bajo punto de fusión (CAS No. 39346-81-1) y Tritón™ X-100 (CAS No. 9002-93-1) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El etanol absoluto (CAS No. 64-17-5) y NaCl (CAS No. 7647-14-5) fueron proporcionados por Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

3.2. Línea celular y condiciones de cultivo

La línea celular Caco-2 (ATCC® HTB-37), fue utilizada para la realización del ensayo cometa estándar y modificado debido a que representa un cultivo celular de uno de los principales órganos diana afectados tras la exposición oral a cianotoxinas. Las células fueron cultivadas en monocapa en medio MEM suplementado con un 10% de SFB, 50 µg/ml de gentamicina, L-glutamina 2 mM, 1% de aminoácidos no esenciales y piruvato sódico 1 mM. Las células se mantuvieron a unas condiciones de cultivo de 37°C y 5% CO₂ en atmósfera humidificada. Se utilizaron pases celulares entre 20 y 27.

3.3. Exposición de las células al tóxico

Partiendo del cultivo celular dispuesto en monocapa de células uniforme, se preparó una suspensión de células Caco-2 y se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 3,5x10⁵ células/ml. Esta densidad es óptima para que se forme una monocapa de células tras una incubación de 24 h bajo las condiciones de cultivo ya mencionadas.

Transcurridas las 24 h y alcanzada esta densidad óptima de crecimiento, las células fueron expuestas a la mezcla de concentraciones ascendentes de cianotoxinas: CYN (0.6, 1.5, 2.5 $\mu\text{g/ml}$) y MC-LR (6, 12.5 y 25 $\mu\text{g/ml}$), durante 24 y 48 h. La elección de dichas concentraciones de exposición a CYN se llevó a cabo teniendo en cuenta experimentos previos de citotoxicidad en los que se determinó a partir del parámetro más sensible, que fue la reducción de MTS la concentración efectiva media (EC_{50}) en las células intestinales expuestas a esta cianotoxina, que fue 2.5 $\mu\text{g/ml}$ tras 24 h de exposición (Gutiérrez-Praena et al., 2012). Por este motivo, fue utilizada como máxima concentración para este ensayo 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de CYN. Para la elección de la concentración de MC-LR se tuvo en cuenta la proporción real en que se presentan estas cianotoxinas en la naturaleza, correspondiéndose con una proporción 1:10 CYN/MC-LR (Buratti et al., 2017), siendo así la concentración máxima de MC-LR para este ensayo de 25 $\mu\text{g/ml}$.

Las toxinas se adquirieron en forma de polvo liofilizado y se procedió a su disolución con agua y una mezcla 1:4 metanol/agua para MC-LR. En el caso de CYN, la disolución se realizó en agua Milli-Q.

Con el fin de garantizar la reproducibilidad del ensayo y sistema celular se establecieron dos grupos controles: un control negativo, tratándose de células sin tratamiento externo únicamente expuestas a medio celular sin SFB, y un control positivo, en el que las células son tratadas con una solución 100 μM de H_2O_2 durante 5 min a 4°C, sustancia con capacidad genotóxica.

3.4. Ensayo cometa estándar

La detección de la rotura de las hebras de ADN, representándose así el daño genotóxico producido por las sustancias de exposición, ha sido llevado a cabo mediante el ensayo cometa. Este ensayo cometa estándar se realizó siguiendo el protocolo de Collins et al. (1997) con determinadas modificaciones (Corcuera et al., 2011). Mediante el ensayo cometa, podemos cuantificar el daño genotóxico producido por la mezcla de CYN y MCs en las células Caco-2 mediante la medida de la rotura de la hebra de ADN en cada célula. Usando el ensayo cometa modificado con enzima, podemos cuantificar también el daño oxidativo, mediante la percepción de la oxidación de las bases púricas y pirimidínicas en cada célula.

El ensayo cometa clásico sirve para detectar la rotura del ADN, para ello, necesitamos una suspensión de células individuales embebidas en agarosa, que son lisadas y expuestas al tóxico. A continuación, se realiza una electroforesis a un pH elevado. El ADN roto migrará hacia el ánodo, formando un cometa que podrá ser detectado al observar las muestras en un microscopio de fluorescencia (Azqueta y Collins, 2013).

Para llevar a cabo el ensayo, transcurridos los periodos de exposición, se retira el medio con el tratamiento y se procede a dos enjuagues con tampón fosfato salino (PBS). Las células expuestas se resuspenden en PBS, de forma que cada muestra tenga una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/ml. Esta suspensión celular se mezcló con un 1% de agarosa de bajo punto de fusión. La mezcla fue goteada en portaobjetos obteniendo los geles de agarosa con las células imbuidas. A continuación, los portaobjetos se introdujeron en solución de lisis (BL) (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, Tris base, pH 10 Y 1% Tritón™ X-100) a 4°C durante al menos 1h.

Tras este tiempo, se llevó a cabo una incubación con un tampón de pH elevado durante 20 min con el fin de desnaturalizar el ADN y, posteriormente, una electroforesis (20min, 25V (350-400 mA)). Con ello se consigue que, en caso de producirse daño genotóxico, las hebras del ADN migren hacia el ánodo, ya que el ADN presenta carga eléctrica negativa, formándose los cometas que representan las roturas de las hebras del material genético (Figura 6).

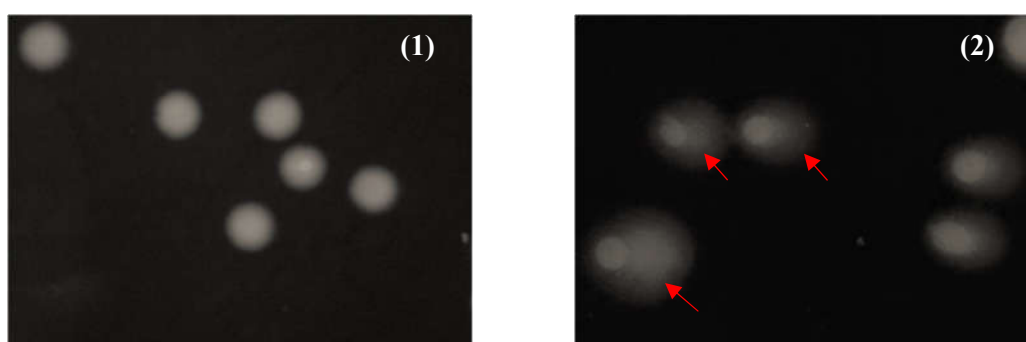


Figura 6. (1) Grupo control negativo donde no se produce daño en el ADN y no se observa migración del mismo. (2) Grupo control positivo donde se produce daño en el ADN y éste migra formando cometas.

Finalizada la electroforesis, los portaobjetos se neutralizaron con PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} durante 10 min y H_2O desionizada ($>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ de resistividad) durante 10 min.

Se fijaron con etanol al 70% durante 15 min y etanol absoluto durante 15 min y se dejaron secar toda la noche. Posteriormente, se realizó la tinción del ADN con el colorante Syber Gold (SYBR Gold, Invitrogen, Thermofisher, MA USA) diluido en DMSO. Para ello, se mezcla la dilución anterior del colorante con Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) con el fin de aumentar la sensibilidad de detección de los núcleos. Se sumergen los portaobjetos en buffer TE con la dilución del colorante y se deja en agitación durante 35 minutos.

Finalmente, el ADN se visualizó (microscopio de fluorescencia Olympus BX61) analizándose 100 núcleos aleatorios por cada concentración estudiada con un software de análisis de imagen (Comet Assay IV, Perceptive Instruments, UK). El parámetro utilizado para el análisis del cometa fue el % de ADN en la cola, que se obtiene automáticamente con el software anteriormente mencionado.

3.5. Ensayo cometa modificado con enzimas

El ensayo cometa modificado permite determinar la oxidación de las bases púricas (adenina y guanina) y pirimidínicas (citosina y timina) mediante el empleo de dos enzimas de restricción, FPG y Endo III, las cuales reconocen, respectivamente, a las bases nitrogenadas mencionadas cuando se oxidan. Tras la exposición al tóxico, se incluye la incubación con estas dos enzimas específicas con actividad glicosilasa, que eliminan la base dañada creando un sitio apúrico o apirimidínico según corresponda (Collins et al., 2008; Azqueta et al., 2009). Tras la incubación con enzimas, si hay oxidación de las bases, se observa un incremento en el porcentaje cola del cometa respecto a las que fueron incubadas solo con solución tampón (Corcuera et al., 2011).

En el ensayo cometa modificado es importante que la concentración y el tiempo de incubación sean óptimos. Para poder determinarlos, se deben ensayar diferentes concentraciones de enzima a diferentes tiempos previamente (Collins, 2014). El procedimiento de este ensayo es igual al anterior descrito, diferenciándose únicamente en que realiza la incubación del ADN con las enzimas una vez solidificada la agarosa en los portaobjetos y tras al menos 1h solución de lisis.

De tal forma, previo a la incubación, los portaobjetos se lavaron 3 veces durante 5 minutos con tampón F (BF) (0.04 M HEPES, 0.1 M KCl, 0,0005 M EDTA, 0.2 mg/ml BSA), vehículo adecuado para el funcionamiento óptimo de las enzimas.

Posteriormente, se procedió a la incubación con las enzimas, teniendo diferentes grupos de exposición: BL, BF, Endo III y FPG, siendo estas dos últimas a una concentración de 20 y 0,2 U/ml, respectivamente, que fueron seleccionadas previamente como concentración óptima de actuación de las enzimas.

Los portaobjetos se incubaron durante 30 min a 37°C haciendo así que las enzimas FPG y Endo III actuaran. Una vez transcurrido este tiempo de incubación, se procede de igual forma que en el ensayo cometa estándar.

3.6. Tratamiento de los resultados y análisis estadístico

La cuantificación del ensayo se realizó mediante el recuento de los núcleos que existen en cada uno de los geles de agarosa. Para ello, las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia utilizando el fluorocromo fluoresceína (FITC) cuya $\lambda_{\text{abs}}=495$ nm y $\lambda_{\text{e}}=519$ nm, que da lugar a una luz de color verde.

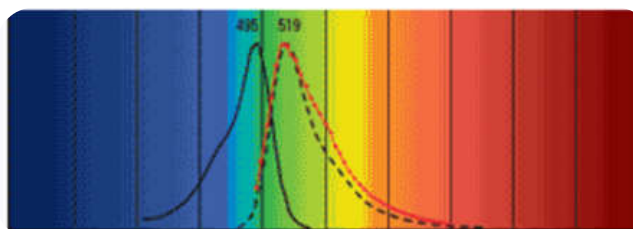


Figura 7. Espectro de absorción (línea continua) y emisión (línea discontinua) del fluorocromo fluoresceína (FITC).

El estudio estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo con un software de análisis estadístico (GraphPad In Stat, GraphPad Software, Inc., USA). En primer lugar, se realizó el test estadístico Kruskal-Wallis, seguido del test de comparación múltiple Dunnet, consiguiendo así establecer la existencia o no de diferencias significativas en la genotoxicidad de las diferentes concentraciones ensayadas.

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos mostraron que la mezcla de CYN y MC-LR no produjo rotura de las hebras de ADN en las células Caco-2 en el rango de concentraciones estudiado (CYN (0.6, 1.5, 2.5 $\mu\text{g/ml}$)) y MC-LR (6, 12.5 y 25 $\mu\text{g/ml}$)) así como a ninguno de los tiempos de exposición ensayados (24, 48h). Sin embargo, se observó un incremento significativo del daño genotóxico ($p < 0.001$) en las células intestinales expuestas al control positivo (H_2O_2) tras 24 y 48 h de exposición (Figura 8).

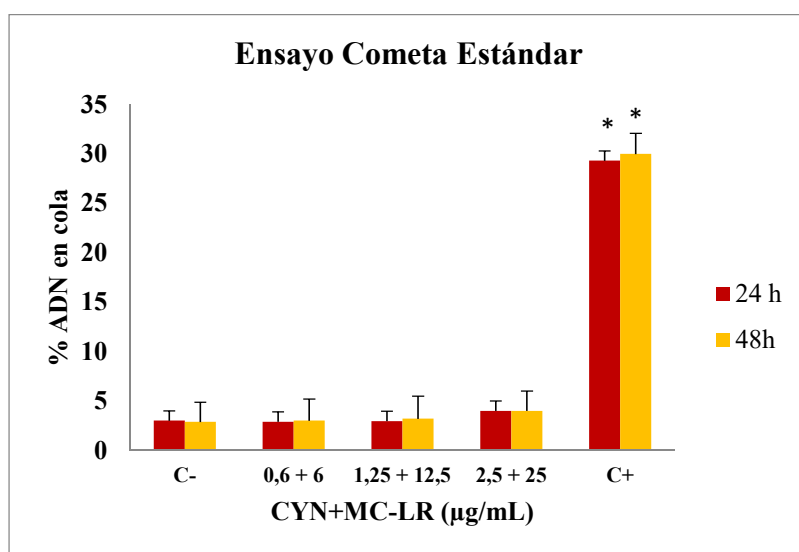


Figura 8. Daño en el ADN producido tras la exposición de células Caco-2 a la mezcla de 0.6 y 6, 1.25 y 12.5, 2.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$ de CYN y MC, respectivamente, representado como rotura de la hebra de ADN tras realizar el ensayo cometa estándar. La rotura de la hebra de ADN se expresa como % de ADN en la cola. Todos los valores se expresan como media \pm desviación estándar. *Existen diferencias significativas respecto al control ($p < 0.001$).

Por otro lado, el ensayo cometa modificado con las enzimas de restricción Endo III y FPG nos permite detectar el daño genotóxico producido por la oxidación de las bases pirimidínicas y púricas, respectivamente.

En el caso de la exposición a Endo III, las células Caco-2 expuestas a la mezcla de CYN y MC-LR no presentaron daño oxidativo de las bases pirimidínicas del ADN bajo las condiciones ensayadas, observándose únicamente un resultado significativo en el caso de la exposición al control positivo incubado con la enzima (Figura 9). Además, no se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con BL (control

negativo) respecto al grupo tratado con el vehículo de las enzimas, BF (datos no mostrados).

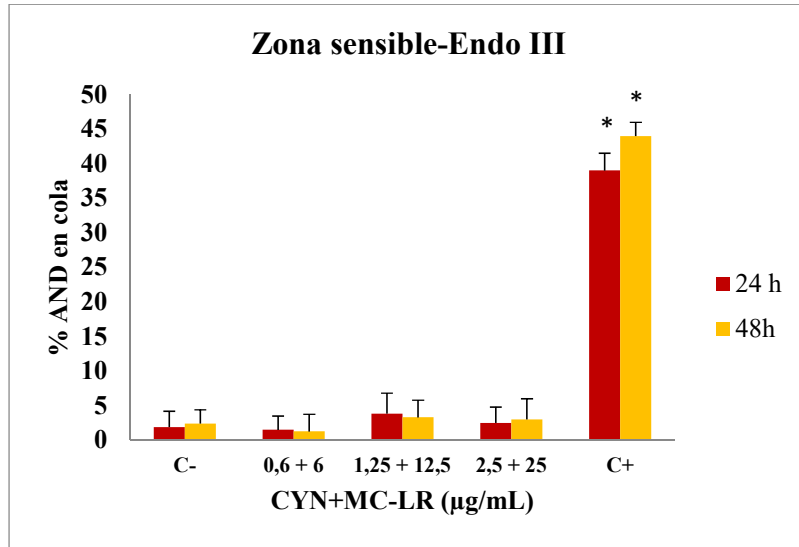


Figura 9. Oxidación de las bases pirimidínicas tras la exposición de células Caco-2 a la mezcla de 0.6 y 6, 1.25 y 12.5, 2.5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CYN y MC, tras realizar el ensayo cometa modificado con la enzima Endo III. El daño producido se expresa como % de ADN en la cola. Todos los valores se expresan como media \pm desviación estándar *Existen diferencias significativas respecto al control ($p < 0.001$).

Los resultados obtenidos tras la incubación con FPG fueron similares, no obteniendo digestión del núcleo y, por tanto, observando una ausencia de daño oxidativo de las bases púricas. Como en el caso anterior, se observa un aumento significativo ($p < 0.001$) del daño oxidativo tras exposición al control positivo. De igual forma, no se observan diferencias significativas entre el control negativo y las células tratadas con BF (Figura 10).

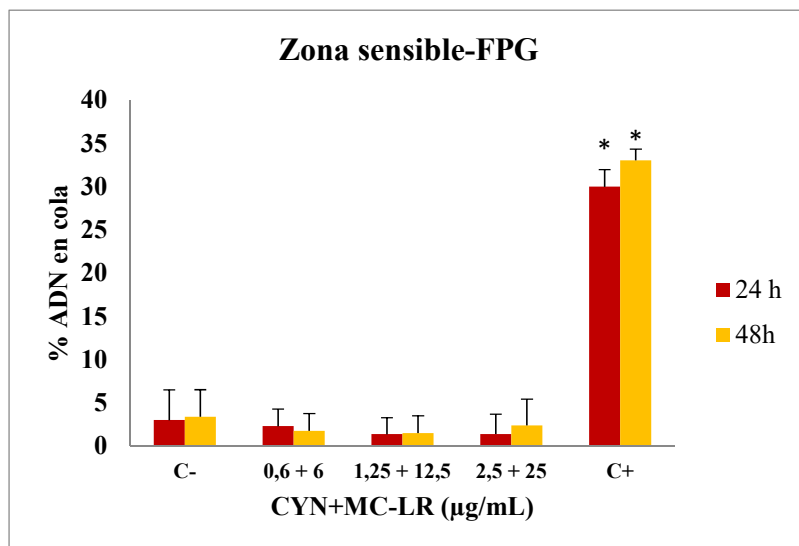


Figura 10. Oxidación de las bases púricas tras la exposición de células Caco-2 a la mezcla de 0.6 y 6, 1.25 y 12.5, 2.5 y 25 µg/mL de CYN y MC, tras realizar el ensayo cometa modificado con la enzima FPG. El daño producido se expresa como % de ADN en la cola. Todos los valores se expresan como media ± desviación estándar *Existen diferencias significativas respecto al control ($p < 0.001$).

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En la naturaleza las cianotoxinas no se encuentran aisladas, siendo frecuente encontrar floraciones de cianobacterias con varias toxinas diferentes. Esto hace que, en caso de intoxicación, por cualquiera de las vías de exposición, haya una probabilidad elevada de intoxicación por más de una de estas cianotoxinas. Por este motivo, la EFSA recomienda el estudio de las mezclas de toxinas, para poder conocer mejor los efectos tóxicos de las mezclas, ya que hasta hoy, dichos estudios son muy escasos (EFSA, 2016).

Por ello, en el presente trabajo se evaluó en primer lugar la genotoxicidad producida por daño directo por rotura de la hebra de ADN en células Caco-2 expuestas a la mezcla de dos de las cianotoxinas más ampliamente distribuidas, la CYN (0.6, 1.5, 2.5 $\mu\text{g/ml}$) y MC-LR (6, 12.5 y 25 $\mu\text{g/ml}$), durante 24 y 48 h, obteniéndose como resultado que la combinación de ambas no produjo daño genotóxico bajo las condiciones ensayadas.

Actualmente, bajo nuestro conocimiento, solo hay un ensayo *in vitro* que estudia los posibles efectos genotóxicos producidos por la combinación de CYN y MC-LR. En este estudio, se describen los efectos de la combinación de CYN (0.01-0.5 $\mu\text{g/ml}$) y MC-LR (1 $\mu\text{g/ml}$) a concentraciones no citotóxicas en células de hepatocarcinoma humano (HepG2) mediante el ensayo cometa (Hercog et al., 2016). Estos autores evalúan los posibles efectos tras 4 y 24 h de exposición a la mezcla y a las cianotoxinas de forma individual. Los resultados obtenidos mostraron que MC-LR de forma individual no causa daño genotóxico, sin embargo, la CYN y la mezcla de ambas cianotoxinas mostraron en ambos ensayos un significativo potencial genotóxico tras 24 h de exposición. Además, estos autores también llevaron a cabo el ensayo de micronúcleos, otro ensayo de genotoxicidad, obteniendo resultados similares. Esto podría indicar que la mezcla binaria de concentraciones no citotóxicas de la CYN y MC-LR no dan lugar a un efecto sinérgico o potenciador. En este caso, podemos decir que la línea hepatocelular es más sensible que la de adenocarcinoma de colon usada en el presente trabajo, ya que a una menor concentración de CYN utilizada en la mezcla fueron obtenidos resultados significativos de genotoxicidad.

Respecto a los estudios que evalúan el potencial genotóxico de cada uno de estas cianotoxinas, existe una amplia bibliografía, sin embargo, los resultados son contradictorios.

Estudios *in vitro* de la genotoxicidad producida por 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ MC-LR durante 2, 4, 6, 12 y 16 h de exposición realizados en células Caco-2, han dado un resultado negativo tras 12 h de exposición (Žegura et al., 2008). Resultados similares fueron observados en nuestro experimento tras 24 y 48 h de exposición, conteniendo nuestra mezcla, incluso, mayor cantidad de MC-LR. Estos mismos autores estudiaron la misma toxina en las mismas condiciones en otras líneas celulares tales como astrocitomas (IPDDC-A2) y células linfoblastoides (NCNC) donde tampoco se observó daño genotóxico directo por rotura de la hebra de ADN (Žegura et al., 2008).

Sin embargo, en algunas líneas celulares sí se observa daño genotóxico producido por la exposición a MC-LR. El ensayo cometa ha puesto de manifiesto de forma significativa el potencial genotóxico de MC-LR (1-10 $\mu\text{g/ml}$) en células de linfocitos de sangre periférica humana tras 6 y 24 h de exposición (Žegura et al., 2011) y en células renales Vero-E6 tras exponer las células a MC-LR (5-20 $\mu\text{g/ml}$) tras 4 y 24 h de exposición (Dias et al, 2014).

Estudios genotóxicos *in vitro* de CYN, han demostrado resultados negativos en células CHO K1 tras haber sido expuestas a 0.5-1 $\mu\text{g/ml}$ de CYN durante 24 h (Fessard y Bernard, 2003). Sin embargo, se han obtenido resultados positivos de genotoxicidad en la mayoría de líneas celulares ensayadas. Mediante el ensayo cometa, Štraser et al. (2011) evaluaron el efecto genotóxico en hepatocitos HepG2 tras la exposición a CYN (0.005-0.5 $\mu\text{g/ml}$) durante 4, 12 y 24 h, observando daño genotóxico tras 12 h de exposición a las concentraciones más altas ensayadas (0.01-0.5 $\mu\text{g/ml}$). Fonseca et al. (2013) también determinaron el potencial genotóxico de CYN (0.5-0.5 $\mu\text{g/ml}$) en la línea celular HepG2 tras 24, 48 y 76 h de exposición, obteniendo como resultado daño genotóxico directo a 1 $\mu\text{g/ml}$ y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ tras 24 y tras 48 y 72 h, respectivamente. En células de linfocitos de sangre periférica humana HPBL, se determinó el potencial genotóxico de CYN (0.05-0.5 $\mu\text{g/ml}$) mediante este mismo ensayo tras 4 y 24 h, obteniendo rotura de ADN tras 4 h de exposición y a 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Žegura et al, 2011).

La variabilidad de los resultados obtenidos tanto para MC-LR como para CYN, dependen de la sensibilidad de las líneas celulares utilizadas, del tiempo y las

concentraciones de exposición utilizadas. Se observa daño genotóxico en la mayoría de las líneas celulares que han sido probadas, por lo que puede decirse que las células en general son más sensibles al efecto genotóxico de CYN que de MC-LR (Žegura et al., 2011b).

Hasta el momento, no se han publicado estudios *in vivo* del efecto genotóxico directo producido por la rotura de la hebra de ADN en la mezcla, por lo que serán necesarios más estudios para poder comprender mejor su toxicidad.

En este trabajo también se evaluó el daño genotóxico de la mezcla de CYN y MC-LR producido por la oxidación del ADN mediante el ensayo cometa modificado, empleando para la detección de la oxidación de las bases pirimidínicas y púricas las enzimas Endo III y FPG, respectivamente. Existe gran variedad de estudios *in vitro* que ponen de manifiesto el potencial oxidante tanto de MC-LR en células Caco-2, IPDDC-A2 (Žegura et al., 2008) y HepG2 (Žegura et al., 2008) como de la CYN en células de hepatocitos de ratón (Humpage et al., 2005) y Caco-2 (Gutierrez-Praena et al., 2012). Esto se manifiesta con un aumento en la aparición de radicales libres y peróxidos, que producen una oxidación de otras moléculas, como lípidos, proteínas o ADN. Esto puede desembocar en necrosis celular o daño celular y, consecuentemente, apoptosis (Humpage et al., 2005; Guzmán-Guillén et al., 2013). Además, Esterhuizen-Londt et al. (2016) demuestra que la exposición a las mezclas de cinaotoxinas MCs de 64.4 ± 3.6 $\mu\text{g/L}$ (estando combinadas MC-LR 21.1 ± 1.9 ; MC-RR 37.2 ± 4.8 y MC-YR 6.1 ± 0.8 $\mu\text{g/L}$) con una mezcla de 20 $\mu\text{g/L}$ de CYN, 20 μg de MC-LR y 20 $\mu\text{g/L}$ de BMAA puras y otra mezcla de 60 $\mu\text{g/L}$ de MCs puras (20 $\mu\text{g/L}$ de MC-LR, MC-YR y MC-RR) durante 24, 72 y 144 h en una especie de pulga de agua (*Daphnia pulex*) producen estrés oxidativo manifestado por un aumento de las ERO y los peróxidos. De mayor a menor daño oxidativo, se obtuvo primero el extracto crudo MCs, seguido de la mezcla CYN+MC-LR+ BMAA y por último mezcla de MCs puras

Es por ello que, en presente estudio, buscamos determinar la repercusión de la oxidación del ADN mediante el ensayo cometa modificado con enzimas. Se obtuvo como resultado que, las células Caco-2 tras haber sido expuestas a la mezcla de CYN y MC-LR durante 24 y 48 h, no producen oxidación de las bases púricas ni pirimidínicas del ADN.

Actualmente no hay ensayos que determinen el daño genotóxico por oxidación del ADN *in vitro* o *in vivo* producido por dicha mezcla. Sin embargo, existen estudios que determinan este parámetro de forma individual en células expuestas a MC-LR y a la CYN.

Žegura et al. (2011) determinaron *in vitro* mediante el ensayo cometa modificado, utilizando como enzima FPG, la oxidación producida tras la exposición de HPBL a 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ de MC-LR durante 4, 6 y 24 h en las purinas del ADN, obteniéndose un aumento de la rotura de la hebra de ADN producido por la digestión de FPG a las 6 h de exposición con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de MC-LR, además de un comportamiento dosis-dependiente tras 24 h de exposición. Estudios *in vivo* también ponen de manifiesto la oxidación de las guaninas tras la administrada por vía intraperitoneal de MC-LR (36.2 μM) en ratones tras 24h de administración (Al-Jassabi et al., 2006).

En el caso de la CYN, se llevó a cabo el mismo ensayo cometa modificado con la enzima FPG tras la exposición de células HepG2 a 0.125-0.5 $\mu\text{g/ml}$ de la toxina durante 4, 12 y 24 h, obteniendo como resultado que la toxina no produjo oxidación de las bases del ADN (Štraser et al., 2013). Resultados positivos se obtuvieron en células de leucocitos CLC de pez tratadas con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de CYN tras 24 h de exposición (Sieroslawska y Rymuszka, 2014). Estudios *in vivo* en peces de la especie *Oreochromis niloticus* (tilapia) expuestos a 200 μg de la CYN por kg de p.c por vía oral e intraperitoneal no mostraron daño oxidativo del material genético en células hepáticas tras 24 y 48 h de exposición (Gutiérrez-Praena et al., 2011a). Sin embargo, en hígado y riñón de esta misma especie se observa un incremento del daño oxidativo tras la exposición a 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de la CYN por inmersión (Guzmán-Guillén et al., 2014).

La ausencia del daño genotóxico directo y del daño oxidativo en las bases nitrogenadas de las hebras del ADN en las células Caco-2 nos aporta nuevos conocimientos en la evaluación toxicológica de la mezcla (MC-LR y CYN) estudiada. Estas investigaciones pueden ser completadas por otros ensayos de genotoxicidad también recomendados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

6. CONCLUSIÓN

Aunque se han descrito con anterioridad diversos resultados acerca de la genotoxicidad de las cianotoxinas CYN y MC-LR de forma individual, es importante llevar a cabo una evaluación de forma combinada debido a que los efectos podrían verse potenciados o bien presentar una respuesta antagonista o sinergista.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que la combinación de la CYN y la MC-LR no produce daño genotóxico, así como daño oxidativo en el ADN en células Caco-2 tras la exposición a dicha mezcla en los tiempos ensayados.

No obstante, no se puede garantizar la completa inocuidad de la exposición a la combinación de ambas cianotoxinas, ya que sería necesario completar la batería de ensayos genotóxicos con el fin de realizar una evaluación de riesgos más precisa y completa. Las futuras investigaciones en relación con la mezcla de la CYN y MCL-LR deberían orientarse a la realización de nuevos ensayos de genotoxicidad basados en fundamentos toxicológicos diferentes, que permitan tener una visión global de la genotoxicidad de esta combinación.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ames B. Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity tests. *Handb Mutagen Test Proced.* 1975; 31(6): 1-17.

Atencio L, Moreno I, Jos A, Pichardo S, Moyano R, Blanco A, et al. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon.* 2008; 52(1): 1-12.

Azevedo SM, 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: 441-446.

Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol.* 2013; 87(6): 949-968.

Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res.* 2009; 674(1-2): 101-108.

Botes DP, Kruger H, Viljoen CC. Isolation and characterization of four toxins from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon.* England. 1982; 20(6): 945-954.

Bouvy M, Falcão D, Marinho M, Pagano M, Moura A. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquat Microb Ecol.* 2000; 23(1): 13-27.

Briand JF, Leboulanger C, Humbert JF, Bernard C, Dufour P. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J Phycol.* 2004; 40(2): 231-238.

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): 1049-1130.

Campos A, Araújo P, Pinheiro C, Azevedo J, Osório H, Vasconcelos V. Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. *Ecotoxicol Environ.* 2013; 94: 45-53.

Carmichael WW. Toxins of freshwater algae. En: Tu AT, editor. Handbook of Natural Toxins, Vol. 3: Marine Toxins and Venoms. Nueva York. Marcel Dekker Co; 1988. P. 121-147

Carmichael WW. The Cyanotoxins. Adv Botan Res. 1997; 27: 211-256

Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environ Health Perspect. 2001; 109(7): 663-668.

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 Sci. 2009; 108(1): 81-89.

Chia MA, Cordeiro-Araújo MK, Lorenzi AS, Bittencourt-Oliveira MDC. Cylindrospermopsin induced changes in growth, toxin production and antioxidant response of *Acutodesmus acuminatus* and *Microcystis aeruginosa* under differing light and nitrogen conditions. Ecotoxicol Environ Saf. 2017; 142(April): 189-199.

Chlipala GE, Mo S, Orjala J. Chemodiversity in freshwater and terrestrial cyanobacteria - a source for drug discovery. Curr Drug Targets. 2011; 12(11): 1654-1673.

Chorus I, Falconer IR, Salas HJ, Bartram J. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. J. Toxicol. Environ. Heal. Part B. Taylor & Francis. 2000; 3(4): 323-347.

Chorus I. Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences. 1^a ed. Berlín: Springer-Verlag; 2001.

Chorus I, Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. 1^a ed. London: E&FN Spon. 1999.

Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. Biochim Biophys Acta. 2014; 1840(2): 794-800.

Collins AR, Mitchell DL, Zunino A, De Wit J, Busch D. UV-sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts. Environ Mol Mutagen. 1997; 29(2): 152-160.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis*. 2008; 23(3): 143-151.

Corcuera LA, Arbillaga L, Vettorazzi A, Azqueta A, López de Cerain A. Ochratoxin A reduces aflatoxin B1 induced DNA damage detected by the comet assay in Hep G2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49(11): 2883-2889.

Dias E, Louro H, Pinto M, Santos T, Antunes S, Pereira P, et al. Genotoxicity of microcystin-LR in in vitro and in vivo experimental models. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 949521.

Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Ong CN. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ Res*. 1998; 78(1): 12-18.

Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Lee BL, Ong CN. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat Res*. 1999; 442(2): 69-77.

EFSA. Harmonisation of risk assessment methodologies for human health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. EFSA. 2016

Esterhuizen-Londt M, von Schnehen M, Kühn S, Pflugmacher S. Oxidative stress responses in the animal model, *Daphnia pulex* exposed to a natural bloom extract versus artificial cyanotoxin mixtures. *Aquat Toxicol*. 2016; 179: 151-157.

Falconer IR. Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies. 1^a ed. CRC Press. Florida; 2004.

Falconer IR, Hardy SJ, Humpage AR, Froschio 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): 143-150.

Falconer IR, Humpage AR. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *Int J Environ Res Public Health*. 2005; 2(1): 43-50.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000; 455(1-2): 81-95.

Fessard V, Bernard C. Cell alterations but no DNA strand breaks induces *in vitro* by cylindrospermopsin in CHO K1 cells. *Environmental Toxicology*. 2003; 18: 353-359.

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.

Fonseca AL, Lankoff A, Azevedo SMFO, Soares RM. Effects on DNA and cell viability of treated water contaminated with *Cylindrospermopsis raciborskii* extract including cilindrospermopsina. *Ecotoxicol Environ Contam.* 2014; 8(1): 135-141.

Freitas M, Campos A, Azevedo J, Barreiro A, Planchon S, Renault J, et al. Lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf-proteome profiles after exposure to cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture: A concentration-dependent response. *Phytochemistry.* 2015; 110(2015): 91-103.

Frosio 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): 243-251.

Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol.* 2008; 38(2): 97-125.

Gaudin J, Huet S, Jarry G, Fessard V. *In vivo* DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: Comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. 2008; 652(2008): 65-71.

Gehring MM. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic response. *FEBS Lett.* 2004; 557(1-3): 1-8.

Griffiths DJ, Saker ML. The Palm Island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol.* 2003; 18(2): 78.

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.* 2011a; 105(1-2): 100-106.

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.* 2011b; 74(6): 1567-1572.

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

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(2013): 1184-1194.

Guzmán-Guillén R, Prieto AI, Moreno I, Ríos V, Vasconcelos VM, Cameán AM. Effects of depuration on oxidative biomarkers in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after subchronic exposure to cyanobacterium producing cylindrospermopsin. *Aquatic Toxicology.* 2014; 149(2014): 40-49.

Hercog K, Maisanaba S, Filipic M, Jos A, Cameán A, Žegura B. Genotoxic potential of the binary mixture of cyanotoxins microcystin-LR and cylindrospermopsin. *Abstracts/Toxicology Letters.* 2016; 258S (2016): S62-S324.

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.

Humpage AR, Fontaine F, Froscio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health.* 2005; 68(9): 739-753.

IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 94, Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2010; 94(v-vii): 1-412.

Jos A, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vázquez CM, Moreno I, et al. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol.* 2005; 72(3): 261-271.

Kaloudis T, Zervou SK, Tsimeli K, Triantis TM, Fotiou T, Hiskia A. Determination of microcystins and nodularin (cyanobacterial toxins) in water by LC-MS/MS. *Monitoring*

of Lake Marathonas, a water reservoir of Athens, Greece. *J Hazard Mater.* 2013; 263: 105-115.

Li G, Cai F, Yan W, Li C, Wang J. A proteomic analysis of MCLR-induced neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Toxicol Sci.* 2012; 127(2): 485-495.

Li G, Yan W, Cai F, Li C, Chen N, Wang J. Spatial learning and memory impairment and pathological change in rats induced by acute exposure to microcystin-LR. *Environ Toxicol.* 2014; 29(3): 261-268.

Li Y, Sun B, Wu H, Nie P. Effects of pure microcystin-LR on the transcription of immune related gene and heat shock protein in larval stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture.* 2009; 289: 154-160.

Liu YJ, Huang PL, Chang YF, Chen YH, Chiou YH, Xu ZL, et al. GSTP1 genetic polymorphism is associated with a higher risk of DNA damage in pesticide-exposed fruit growers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(4): 659–666.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biología de los Microorganismos.* 10^a ed: Prentice-Hall. Madrid; 2013.

Neri M, Milazzo D, Ugolini D, Milic M, Campolongo A, Pasqualetti P, et al. Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. *Mutagenesis.* 2015; 30(1): 155-163.

Nong Q, Komatsu M, Izumo K, Indo HP, Xu B, Aoyama K, et al. Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR-induced cytogenotoxicity. *Free Radic Res.* 2007; 41(12): 1326-1337.

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.

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

Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs*. 2010; 8(5): 1650-1680.

Pichardo S, Jos A, Zurita JL, Salguero M, Cameán AM, Repetto G. Acute and subacute toxic effects produced by microcystin-YR on the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1. *Toxicol Vitro*. 2007; 21(8): 1460-1467.

Prasanna R, Sood A, Jaiswal P, Nayak S, Gupta V, Chaudhary V, et al. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2010; 46(2): 133-147.

Puerto M, Campos A, Prieto A, Cameán AM, Almeida AM de, Coelho AV, et al. Differential protein expression in two bivalve species; *Mytilus galloprovincialis* and *Corbicula fluminea*; exposed to *Cylindrospermopsis raciborskii* cells. *Aquat Toxicol*. 2011; 101(1): 109-116.

Puerto M, Pichardo S, Jos A, Cameán AM. Oxidative stress induced by microcystin-LR on PLHC-1 fish cell line. *Toxicol Vitro*. 2009a; 23(8): 1445-1449.

Puerto M, Pichardo S, Jos A, Cameán AM. Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Toxicol*. 2009b; 54(2): 161-169.

Quesada A, Moreno E, Carrasco D, Paniagua T, Wormer L, Hoyos C de, et al. Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur. J. Phycol*. 2006; 41(1): 39-45.

Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE nº 45: 72028-7245.

Runnegar M, Kong S, Zhong Y. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 201(1): 235-241.

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.

Runnegar MT, Xie C, Snider BB, Wallace GA, Weinreb SM, Kuhlenkamp J. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicol Sci.* 2002; 67(1): 81-87.

Seawright AA, Nolan CC, Shaw GR, Chiswell RK, Norris RL, Moore MR, et al. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). 1999; 14(1): 135-142.

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

Sieroslawska A. Assessment of the mutagenic potential of cyanobacterial extracts and pure cyanotoxins. *Toxicon.* 2013; 74: 76-82.

Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial Toxins. En: Chorus I, Bartram, J. *Toxic Cyanobacteria Water A Guid. to Public Health.* 1^a ed. London: E&FN Spon; 1999. 41-111.

Sola B. Avances en el estudio de cilindrospermopsina: detección de cianobacterias potencialmente productoras de la toxina y prospección de las etapas iniciales de su síntesis. Madrid; 2013.

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

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

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.

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): 833-843.

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): 5442-5447.

Wang S, Tian D, Zheng W, Jiang S, Wang X, Andersen ME, et al. Combined Exposure to 3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone and Microcystin-LR Increase Genotoxicity in Chinese Hamster Ovary through Oxidative Stress. *Environ Sci Technol.* 2013; 47(3): 1678-1687.

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.

Wood R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature. *Environ Int.* 2016; 91: 276-282.

Wood SA, Heath MW, Holland PT, Munday R, McGregor GB, Ryan KG. Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (*Oscillatoriales*) associated with a dog poisoning in New Zealand. *Toxicon.* 2010; 55(4): 897-903.

Wormer 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: 206-213.

Wu J, Shao S, Zhou F, Wen S, Chen F, Han X. Reproductive toxicity on female mice induced by microcystin-LR. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014; 37(1): 1-6.

Žegura B, Gajski G, Štraser A, Garaj-Vrhovac V, Filipič M. Microcystin-LR induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res.* 2011; 726(2): 116-122.

Žegura B, Gajski G, Štraser A, Garaj-Vrhovac V. Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. *Toxicon.* 2011a; 58(6-7): 471-479.

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

Žegura B, Volcic M, Lah TT, Filipic M. Different sensitivities of human colon adenocarcinoma (CaCo-2), astrocytoma (IPDDC-A2) and lymphoblastoid (NCNC) cell lines to microcystin-LR induced reactive oxygen species and DNA damage. *Toxicol.* 2008; 52(3): 518-525.

Zhang H, Zhang J, Chen Y, Zhu Y. Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage. *Fish Physiol Biochem.* 2008; 34(4): 307-312.