

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**“Toxinas del veneno diarreico de mariscos favorecen un ambiente tumorigénico en células gástricas epiteliales”**

**Tesis doctoral para optar al grado de Doctor en Bioquímica**

**MIGUEL DEL CAMPO ZALDÍVAR**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. NÉSTOR LAGOS WILSON**

**SANTIAGO-CHILE**

**2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DOCTORAL**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato:

**MIGUEL DEL CAMPO ZALDÍVAR**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día: \_\_\_\_\_

**Director de tesis:**

Dr. Néstor Lagos Wilson \_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dra. María Antonieta Valenzuela \_\_\_\_\_

Dra. Mónica Vásquez \_\_\_\_\_

Dr. Alejandro Corvalán \_\_\_\_\_

Dr. Marcelo Kogan \_\_\_\_\_

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1130037, adjudicada en el período 2013-2014.

El candidato recibió el apoyo de la Beca CONICYT regular (Marzo 2010 a Febrero 2014), una Beca de Extensión de CONICYT (Marzo 2014 a Agosto 2014) y una Beca CONICYT de Gastos Operacionales 21100413 (Año 2013).

## PUBLICACIONES

Los resultados originados de esta Tesis han sido publicados en

- **Del Campo M**, Toledo H, Lagos N. Okadaic Acid toxin at sublethal dose produced cell proliferation in gastric and colon epithelial cell lines. *Mar Drugs*. **2013**, 11, 4751-60.
- **Del Campo M**, Zhong TZ, Tampe R, García L, Lagos N. Dinophysistoxin-1 is more potent than okadaic acid in the activation of the inflammatory response. (enviada a Marine Drugs, aceptada con correcciones)

El candidato, durante el período que comprendió su doctorado, participó en las siguientes publicaciones:

- Manubens A, Salazar F, Haussmann D, Figueroa J, **Del Campo M**, Pinto JM, Huaquín L, Venegas A, Becker MI. Concholepas hemocyanin biosynthesis takes place in the hepatopancreas, with hemocytes being involved in its metabolism. *Cell and Tissue Research*. **2010**, 342, 423-435.
- **Del Campo M**, Arancibia S, Nova E, Salazar F, González A, Moltedo B, De Ioannes P, Ferreira J, Manubens A, Becker MI. Hemocyanins as immunostimulants. *Revista Medica Chilena*. **2011**, 139, 236-46.
- Arancibia S, **Del Campo M**, Nova E, Salazar F, Becker MI. Enhanced structural stability of Concholepas hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. *European Journal of Immunology*. **2012**, 42, 688-699.
- Arancibia S, Espinoza C, Salazar F, **Del Campo M**, Tampe R, Zhong TY, De Ioannes P, Moltedo B, Ferreira J, Lavelle EC, Manubens A, De Ioannes AE, Becker MI. A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma. *PLoS One*. **2014**, 9.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer al Dr. Néstor Lagos por confiar en mí y darme todo su apoyo para poder desarrollar esta tesis, y a los amigos y compañeros del laboratorio de Bioquímica de Membranas de los cuales tanto aprendí: Carlos García, Cristóbal Contreras, Rubén Zamorano y Diego Figueroa.

A todos los profesores que me ayudaron a llegar a buen puerto: Los académicos de la comisión evaluadora Dra. María Antonieta Valenzuela, Dra. Mónica Vásquez, Dr. Alejandro Corvalán y Dr. Marcelo Kogan. Al Dr. Héctor Toledo por abrirme las puertas de su laboratorio de manera tan generosa y a todo su grupo por los buenos aportes en los seminarios; a la Dra. Lorena García, por su entusiasmo al querer participar de este proyecto; a la Dr. Amalia Sapag, por sus consejos y buenas vibras; y muy especialmente a la Dra. María Inés Becker, quien para mí simboliza el más profundo sentido de Universidad y a quien siempre estaré agradecido por todo lo que me ha entregado.

A los amigos y colegas de la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo: Ta-Ying Zhong, Ricardo Tampe, Claudia D'alencon, Daniel Plaza, Miriam Palacios, Javiera Villar, José Jiménez, Augusto Manubens y Sergio Arancibia.

A mi familia, mis padres Rafael y Margarita, y mis hermanos, Rafa, Javi y Guarapo; y también a los clásicos de siempre: Palito, Pepe, Leal, Manolo y José José.

Y nada de esto existiría si no fuera por mi esposa, Paola Schulz, a quien le debo infinitamente más que este doctorado, y al hij@ que tanto soñamos durante estos años y que ahora crece en su vientre para que luego lo tengamos en los brazos.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
INFORME DE APROBACIÓN	ii
FINANCIAMIENTO	iii
PUBLICACIONES	iv
AGRADECIMIENTOS	1
ÍNDICE GENERAL	2
ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS	3
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
<i>Toxinas del DSP y sus microalgas productoras.</i>	11
<i>Veneno diarreico de mariscos</i>	15
<i>Blancos moleculares de las toxinas del DSP: PP2A.</i>	19
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS GENERALES	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
MATERIALES	25
METODOLOGÍA	27
RESULTADOS	34
<i>Objetivo 1</i>	34
<i>Objetivo 2</i>	39
<i>Objetivo 3</i>	46
<i>Objetivo 4</i>	50
DISCUSIÓN	68

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Página
Figura 1	Estructura química de las toxinas del DSP	14
Figura 2	Especies y distribución mundial de microalgas productoras de toxinas del DSP.	16
Figura 3	Cuantificación de toxinas del DSP a partir de extractos de microalga <i>P. lima</i> .	28
Figura 4	Caracterización de macrófagos intraperitoneales.	30
Tabla 1	Administración de toxinas de DSP por vía oral en modelo murino.	35
Figura 5	Efectos sobre órganos del sistema gastrointestinal por administración de toxinas del DSP.	38
Figura 6	Efecto de OA sobre la viabilidad de cultivos de epitelios gastrointestinales.	40
Figura 7	Efecto de OA sobre la viabilidad de cultivos AGS, MKN-45 y Caco 2 hasta 7 d.	41
Figura 8	Efecto de DTX-1 sobre la viabilidad de cultivos de epitelios gastrointestinales.	42
Figura 9	Comparación por microscopía entre tratamientos con OA o DTX-1 sobre células MKN-45.	44
Figura 10	Efecto de tratamiento con OA por 4 h sobre la viabilidad de cultivos de epitelios gastrointestinales.	45
Figura 11	Expresión de ciclina B en cultivos de epitelios gastrointestinales.	48
Figura 12	Activación de AKT y ERK en cultivos de epitelios gastrointestinales.	49
Figura 13	Cuantificación de TNF- $\alpha$ e IL-6 en placas de Peyer extraídas de ratón tratados con diferentes dosis de toxinas del DSP.	52
Figura 14	Efecto de OA y DTX-1 sobre la viabilidad de macrófagos intraperitoneales.	54
Figura 15	Cuantificación de TNF- $\alpha$ e IL-6 en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1.	58
Figura 16	Cuantificación de quimioquinas de la familia CXCL (KC, MIP-2, LIX y LIF) en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1.	59

<b>Figura 17</b>	<b>Cuantificación de quimioquinas de la familia CCL (MIP1<math>\alpha</math>, MIP1<math>\beta</math>, MCP-1 y RANTES) en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1.</b>	<b>60</b>
<b>Figura 18</b>	<b>Cuantificación de factores de crecimiento G-CSF y VEGF en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1.</b>	<b>61</b>
<b>Figura 19</b>	<b>Cuantificación de citoquinas INF<math>\gamma</math>, IL-2 y las quimioquinas MIG e IP-10 en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1.</b>	<b>62</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Cuantificación de citoquinas anti inflamatorias IL-4 e IL-10 en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1.</b>	<b>63</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Cuantificación de TNF-<math>\alpha</math> e IL-6 en células RAW 264.7 y DC 2.4 tratadas con OA o DTX-1.</b>	<b>66</b>
<b>Figura 22</b>	<b>Cuantificación de NO, y actividad de MMP-9 y MMP-2 por efecto de OA y DTX-1 en sobrenadantes de macrófagos intraperitoneales.</b>	<b>67</b>
<b>Figura 23</b>	<b>Esquema de conclusiones generales.</b>	<b>76</b>



## ABREVIATURAS

<b>Abs</b>	<i>Antibodies</i> / Anticuerpos
<b>ADAM</b>	9-antrildiazometano
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> / Albumina de suero bovino
<b>DSP</b>	<i>Diarrheic shellfish poison</i> / Veneno diarreico de mariscos
<b>DTXs</b>	Dinophysistoxinas
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i> / Autoridad Europea de seguridad alimentaria
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> / Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> / Factor estimulante de colonias de granulocitos.
<b>HABs</b>	<i>Harmful algal blooms</i> / Florecimientos algales nocivos
<b>IC<sub>50</sub></b>	<i>Inhibitory Concentration 50</i> / Concentración inhibitoria 50
<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>ILs</b>	Interleuquinas
<b>INF<math>\gamma</math></b>	Interferón $\gamma$
<b>IP-10</b>	<i>Interferon <math>\gamma</math>-induced protein 10</i> / Proteína inducida interferón $\gamma$
<b>KC</b>	<i>Keratinocyte chemoattractant</i> / Quimioattractante de keratinocitos.
<b>LIF</b>	<i>Leukemia inhibitory factor</i> / Factor inhibitorio de leucemia
<b>LIX</b>	<i>LPS-induced CXC chemokine</i> / Quimioquina CXC inducida por LPS
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide</i> / Lipopolisacárido
<b>MCP 1</b>	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i> / Proteína quimioattractante de monocitos 1
<b>MIG</b>	Monokine induced by interferon $\gamma$ / Monocina inducida por interferón $\gamma$
<b>MIPs</b>	<i>Macrophage Inflammatory Proteins</i> / Proteínas inflamatorias de macrófagos
<b>MMPs</b>	<i>Matrix metalloproteinases</i> / Metaloproteinasas de matriz.
<b>MTT</b>	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> / Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
<b>NO</b>	<i>Nitric oxide</i> / Óxido Nítrico
<b>OA</b>	Okadaic acid / Ácido okadacico.
<b>PP1</b>	Proteína fosfatasa 1

<b>PP2A</b>	Proteína fosfatasa 2A
<b>PSP</b>	Paralytic shellfish poison / Veneno paralizante de mariscos.
<b>PTXs</b>	Pectenotoxinas
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i> / Especies reactivas de oxígeno
<b>Ser</b>	Serina
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> / Factor necrótico tumoral $\alpha$
<b>Trp</b>	Triptófano
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>UI/L</b>	Unidad internacional / Litro
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i> / Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>YTXs</b>	Yessotoxinas

## RESUMEN

En las tres regiones más australes de Chile, existen especies endémicas de microalgas productoras de toxinas del veneno diarreico de mariscos (DSP). El florecimiento de estas microalgas afecta severamente a la acuicultura, una de las principales actividades comerciales de esta zona, pues los mariscos contaminados, al ser consumidos, producen una intoxicación severa que incluye diarrea, vómitos y náuseas, y actualmente está en discusión si es que las toxinas del DSP pueden incrementar el riesgo de contraer cáncer gastrointestinal ya que actúan como promotores tumorales. Es por ello que la legislación internacional ha fijado un límite máximo de 160  $\mu\text{g}$  de toxinas del DSP totales/kg de carne de mariscos.

Se consideran toxinas del DSP el ácido okadaico (OA) y sus derivados, las dinophysistoxinas (DTXs) 1, 2 y 3. Desde el punto de vista químico, estas toxinas son largas cadenas de poliéteres cíclicos de 38 carbonos como estructura base, con carácter lipofílico y termoestables. En Chile, las principales toxinas detectadas en los moluscos son DTX-1 y DTX-3, a diferencia de los países europeos donde las toxinas predominantes son OA y DTX-2.

El blanco molecular de las toxinas del DSP son las proteínas fosfatasas, principalmente la PP2A, la cual participa en múltiples vías de señalización. A través de su inhibición, generan desregulación celular por hiperfosforilación, que puede llevar a la célula a apoptosis, así como también puede generar proliferación.

Nosotros planteamos que, a dosis sub-letales, las toxinas del DSP pueden activar vías de transducción de proliferación, sobre vida e inflamación, en epitelios gástricos y de colon, lo que generaría en exposiciones crónicas, un ambiente tumorigenico, ya que estas toxinas tendrían un efecto acumulativo.

Confirmamos nuestra hipótesis al demostrar un efecto positivo de OA y DTX-1 sobre la proliferación en dos modelos de epitelio gástrico (AGS y MKN-45) y de

colon (Caco 2), a dosis sub letales, activándose el ciclo celular y dos vías canónicas de proliferación, diferenciación y supervivencia, como AKT y ERK; siendo las células Caco 2 más resistentes al efecto de estas toxinas. Además, demostramos que ambas toxinas gatillan la secreción de señales pro-inflamatorias en macrófagos y células dendríticas, a dosis subletales. La concentración en la cual generan un efecto proliferante y de secreción de factores pro-inflamatorios no es igual en ambas toxinas: DTX-1 es un orden de magnitud más potente que OA, lo cual comprueba que no son equivalentes como lo establece la legislación. Nuestro trabajo aporta antecedentes para que nuestra legislación establezca la no presencia de toxinas del DSP en los alimentos; dado el riesgo de sus efectos crónicos.

## SUMMARY

*In the three southern regions of Chile, there are endemic species of toxin-producing microalgae of diarrhetic shellfish poison (DSP). The algae blooms affect severely the aquaculture, a major commercial activities in this area, because the seafood contaminated, when it is consumed, can produce a intoxication that includes diarrhea, vomiting and nausea. It is currently in discussion if the DSP toxins may increase the risk of colon and gastric cancer as they act as tumor promoters. That is why international law has set a maximum limit of 160 µg of total toxin / kg shellfish meat DSP.*

*Okadaic acid (OA) and its derivatives, the dinophysistoxinas (DTXs) 1, 2 and 3 are considered DSP toxins. From a chemical viewpoint, these toxins are long chain of cyclic polyethers with a base structure of 38 carbons and are lipopylic and thermosets molecules. In Chile, the major toxins detected in shellfish are DTX-1 and DTX-3, unlike European countries where the predominant toxins are OA and DTX-2.*

*The molecular target of DSP toxins are the protein phosphatases, PP2A majorly, which is involved in multiple signaling pathways. Through its inhibition, cell deregulation generated by hyperphosphorylation can lead to cell apoptosis and also proliferation.*

*We believe that DSP toxins at sub-lethal doses, can activate transduction pathways of proliferation, survival and inflammation in gastric and colon epithelia, at chronic exposures, generate a tumorigenic environment, as these toxins could have a cumulative effect.*

*For demonstrating our hypothesis, we analyzed the effect of OA and DTX-1 on the viability of two models of gastric epithelial (AGS and MKN-45) and colon epithelium (Caco 2), since both epithelia are physiological targets of these toxins. We studied the cell cycle and activation of canonical pathway of proliferation, differentiation and survival as AKT and ERK; and the effect on cells secreting pro-inflammatory signals, comparing both toxins, in order to prove that they are not equivalent as indicated by the legislation. Our work provides background for our legislation to set the absence of DSP toxins in food; given the risks of their chronic effects.*

## INTRODUCCIÓN

Los florecimientos algales nocivos (*harmful algal blooms*, HABs), conocidos popularmente como “marea roja”, generan severos problemas ecológicos, económicos y sanitarios a nivel global. Se caracterizan por un rápido incremento de la población de microalgas, principalmente en el ciclo primavera-verano, enquistándose en el fondo marino luego de ocurrido el florecimiento, lo que transforma este problema en endémico. Por lo general, los HABs ocurren en fiordos o mares de poca profundidad, cercanos a la costa, en años muy lluviosos donde baja la salinidad del agua y las concentraciones de nitratos y fosfatos se incrementan producto de la deforestación, proceso conocido como eutricación de las aguas (James *et al.* 2010).

En las tres regiones más australes de Chile existen microalgas productoras de toxinas del veneno paralizante de mariscos (*paralytic shellfish poison*, PSP), como *Alexandrium catenella*, y del veneno diarreico de mariscos (*diarrhetic shellfish poison*, DSP) como *Dinophysis acuminata* (Lagos, 1998; García *et al.* 2004a). Una vez ocurrido el florecimiento, estas toxinas pueden acumularse en mariscos filtradores como *Aulacomya ater* (cholga), *Gari solida* (culengue), *Mytilus chilensis* (chorito) y *Protothaca thaca* (almeja), los cuales a su vez pueden ser consumidos por gastrópodos carnívoros como *Argobuccinum ranelliformes* (caracol del sur) o *Concholepas concholepas* (loco). Estos mariscos contaminados, al ser consumidos por los humanos, pueden producir severas intoxicaciones, resultando incluso letales según el tipo y la cantidad de toxina consumida. Es por ello que la legislación internacional establece que debe controlarse la presencia de estas

toxinas en los alimentos marinos (Lagos, 1998; EFSA, 2008). Sin embargo, pese al riesgo que significa el consumo de mariscos contaminados y siendo estos parte importante de la dieta e idiosincrasia nacional, su salubridad no siempre está garantizada. Un estudio de nuestro laboratorio demostró que un gran porcentaje de los choritos ahumados que se comercializan en caletas rurales del sur del país presentan compuestos aromáticos policíclicos clasificados como mutagénicos, junto con toxinas del DSP (García *et al.* 2004b).

Desde el punto de vista económico, los HABs generan un enorme perjuicio para la acuicultura, una de las principales actividades comerciales de nuestras regiones australes. En 2008, se produjeron en el país más de 220.000 toneladas de mariscos, de las cuales más del 80% correspondió a la extracción de choritos en la X región, zona proclive a sufrir vedas de extracción (Sernapesca, 2008).

En este trabajo estudiamos el efecto de las toxinas del DSP sobre sus principales órganos y células blancas, y sobre células del sistema inmune, analizando diferentes parámetros que nos permitieron concluir que estas toxinas favorecen un ambiente tumorigénico cuando actúan en concentraciones sub-letales. A continuación, se muestra una revisión del estado del arte que nos permitió definir nuestra investigación.

#### *Toxinas del veneno diarreico de mariscos (DSP) y sus microalgas productoras.*

Si bien existen antiguos registros que relacionan los florecimientos algales con intoxicaciones masivas, como por ejemplo en la Biblia (Éxodo 7:20-21: “Y todo el

agua que estaba en el Nilo se convirtió en sangre. Y los peces que estaban en el Nilo murieron, y el Nilo se tornó contaminado, tal que los egipcios no podían beber de sus aguas”); la primera asociación entre un brote diarreico y una especie específica de microalgas ocurrió en Chile, en el Seno del Reloncaví, Provincia de los Lagos, X región; en el año 1970, cuando más de 100 personas sufrieron severos trastornos estomacales luego de consumir mariscos cocidos, describiéndose a *D. acuta* como responsable de provocar este mal. Sin embargo, no fue hasta la década del 90 que este hecho fue dado a conocer a la comunidad científica internacional (Guzmán & Campodónico, 1975; Lembeye *et al.* 1993). A partir de la década del setenta se comenzaron a aislar y describir las moléculas causantes de la intoxicación diarreica. Fue el profesor japonés Takeshi Yasumoto, quien, luego de ser parte de una masiva intoxicación en el noreste de Japón, logró identificar al ácido okadaico (*Okadaic Acid*, OA) como la principal molécula causante de la enfermedad, purificándola desde la esponja *Halichondria okadai* (Murata *et al.* 1982). El profesor Yasumoto, a su vez, fue el primero en describir el bioensayo de ratón como metodología de detección de las toxinas del DSP en mariscos, ensayo que hasta el día de hoy es el más utilizado en el mundo y que describiremos más adelante (Yasumoto *et al.* 1995).

En la actualidad, se consideran toxinas del DSP al ácido okadaico (OA) y sus derivados dinophysistoxina 1 (DTX-1, 35-metil OA), dinophysistoxina 2 (DTX-2, estéreo isómero del OA) y dinophysistoxina 3 (DTX-3, 7-O-acil-35-metil OA). Desde el punto de vista químico, estas moléculas son largas cadenas de poliéteres cíclicos de 38 carbonos como estructura base, con carácter lipofílico y

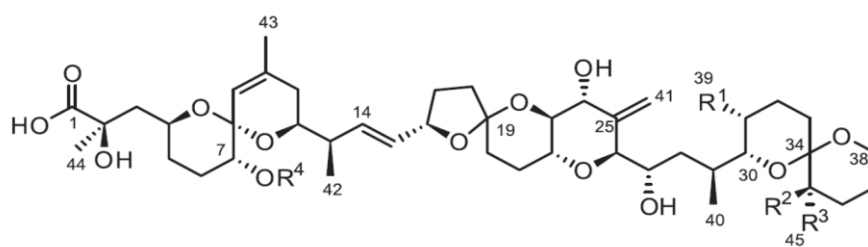


termoestables (figura 1) (Domínguez *et al.* 2010). En nuestro país, las principales toxinas detectadas en los moluscos son DTX-1 y DTX-3, a diferencia de los países europeos donde las toxinas predominantes son OA y DTX-2 (García *et al.* 2004a; García *et al.* 2006).

En los mariscos las toxinas pueden ser metabolizadas al unírseles largas cadenas de ácidos grasos, saturados o insaturados, a través de esterificaciones en el grupo hidroxilo de la posición C7, produciéndose mezclas de 7-O-acil ésteres. La esterificación de DTX-1 da origen a DTX-3. Se cree que esta reacción es una forma de depuración de la toxina en el marisco. Si bien DTX-3 por sí sola no tiene los efectos deletéreos de OA y DTX-1, puede ser hidrolizada en el sistema digestivo, transformándose otra vez en DTX-1, con lo cual vuelve a tener un carácter tóxico y muy dañino para la salud (García *et al.* 2005).

Inicialmente, también se clasificaron como toxinas del DSP a las Pectenotoxinas (PTX) y las Yessotoxinas (YTX). Estas toxinas son producidas por microalgas del género *Dinophysis* que generalmente co-florecen con las microalgas productoras de toxinas del DSP, y, dado su carácter lipofílico, pueden estar presentes en las extracciones hidrofóbicas de mariscos destinadas a ser analizadas por el bioensayo de ratón, generando falsos positivos. Sin embargo, tanto PTXs como YTXs no producen diarrea y tienen blancos moleculares distintos a las toxinas del DSP, debiendo ser analizadas por una metodología distinta (EFSA, 2008).

La descripción de las especies de microalgas productoras de toxinas del DSP tampoco ha estado exenta de errores y complicaciones. Un ejemplo de ello fue la



Nombre	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	C-19*	C-34*
Ácido okadaico	CH <sub>3</sub>	H	H	H	S	R
19-epi-Ácido okadaico	CH <sub>3</sub>	H	H	H	R	S
Dinophysistoxina 1 (DTX-1)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	S	R
Dinophysistoxina 2 (DTX-2)	H	H	CH <sub>3</sub>	H	S	R
Dinophysistoxina 3 (DTX-3)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	Acil	S	R

\* Estereoquímica

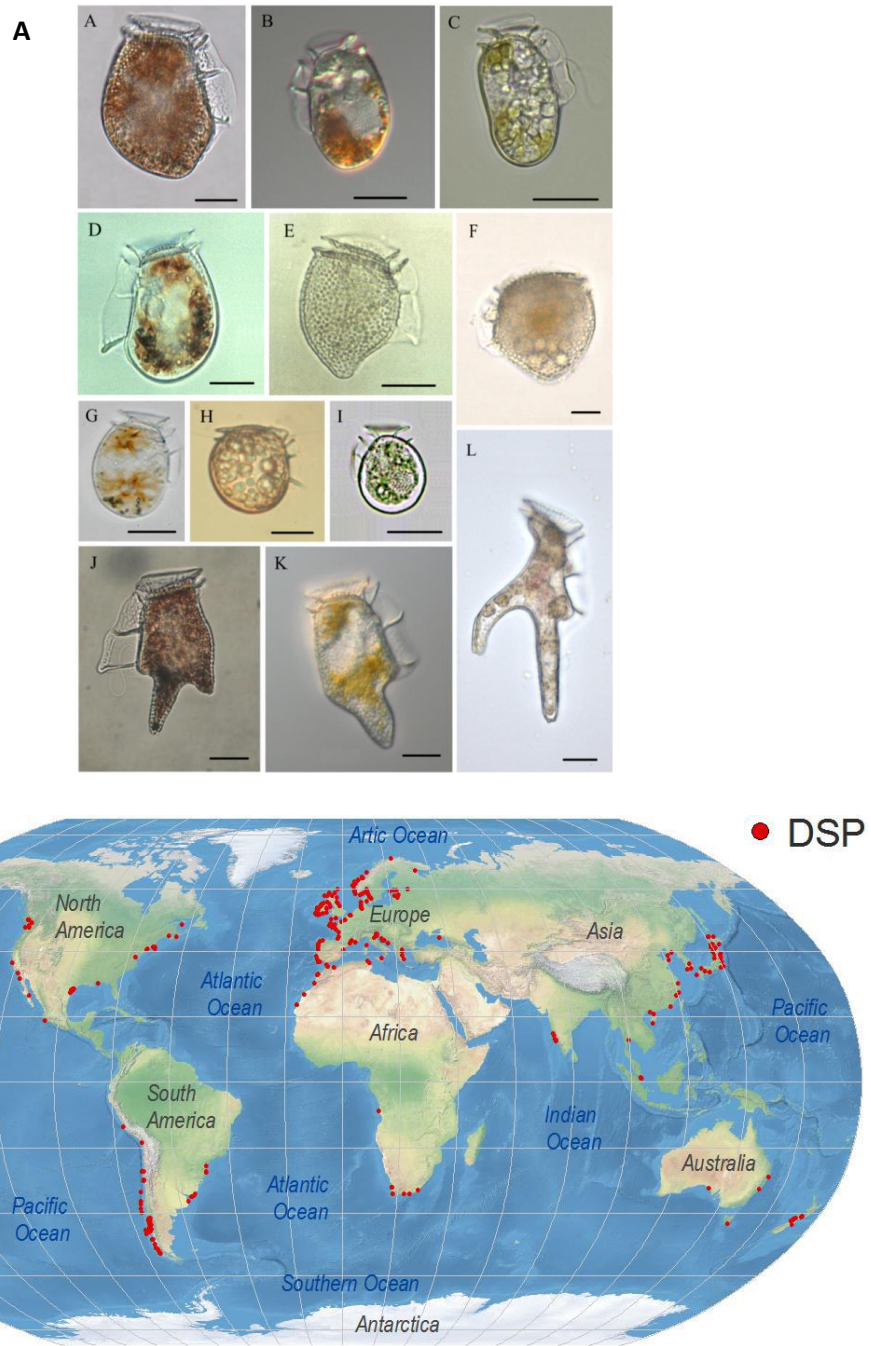
**Figura 1. Estructura química de las toxinas del DSP.** Estructura química base (Ácido okadaico) y sus derivados (Dominguez *et al.* 2010)

asociación del género *Prorocentrum* (*P. micans* y *P. mínimo*) con el DSP, debido a que estos microorganismos eran los mayoritarios en muestras de campo analizados luego de varias intoxicaciones ocurridas en Holanda. Al no reproducirse los efectos tóxicos en mariscos alimentados con *P. micans*, se sugirió que ciertas bacterias presentes en estas microalgas podrían ser las responsables de la producción de toxinas, abriendo un campo erróneo de investigación. Este mal diagnóstico persiste hasta hoy y todavía es frecuente leer artículos que consideran a *P. micans* como un agente causante del DSP, complicándose aún más el tema al descubrirse que *P. lima*, si es productor de toxinas del DSP (Lee *et al.* 1989).

Una tabla actualizada de las especies de microalgas productoras de toxinas del DSP y su distribución mundial se puede apreciar en la figura 2 (Reguera *et al.* 2014). En nuestro país, se ha detectado tanto *D. acuta* como *D. acuminata*, siendo esta última la especie más descrita. En las últimas décadas, las zonas geográficas afectadas y la biodiversidad de estas microalgas se han multiplicado debido al incremento del transporte de carga a través del mar al moverse grandes cantidades de agua residual, expandiéndose este mal (James *et al.* 2010).

#### *Veneno diarreico de mariscos*

La intoxicación por consumo de mariscos contaminados con toxinas del DSP se genera luego de 30 min a 6 horas después de la ingesta, y su sintomatología incluye diarrea, vómitos, náuseas y dolores abdominales severos, siendo muy



**Figura 2. Especies y distribución mundial de microalgas productoras de toxinas del DSP:** A. *D. acuta* (A); *D. acuminata* (B); *D. sacculus*; (C); *D. Fortii*; (D); *D. norvegica*; (E); *Phalacroma mitra* (F); *D. ovum* (G); *P. rotundatum* (H); *D. infundibula* (I); *D. tripos* (J); *D. caudata* (K); and *D. miles* (L). B. Distribución mundial de microalgas productoras de toxinas del DSP. (Reguera *et al*, 2014)

similar a una intoxicación con bacterias enteropatógenas. Además, conlleva pérdida de la integridad epitelial, erosión e hipersecreción en los intestinos, incrementándose la permeabilidad paracelular. Si los niveles de intoxicación son leves, los síntomas pueden desaparecer luego de 2 a 3 días (Picot *et al.* 2011). Si bien no existen registros de muertes causadas por esta intoxicación, las toxinas del DSP han sido ampliamente descritas como agentes promotores de tumores, demostrándose experimentalmente que la exposición reiterada a estas toxinas induce un desarrollo tumoral en piel de ratón y en estómago glandular e hígado de rata cuando se exponen previamente a un agente mutagénico o iniciador tumoral, como son ciertos compuestos aromáticos policíclicos (Fujiki *et al.* 2013). En humanos, existen estudios ecológicos que han relacionado el aumento en la incidencia de cáncer gastrointestinal con una alta tasa de consumo de mariscos en zonas afectadas por HABs diarreicos, pero aún son estudios tentativos que no permiten establecer una relación directa (Cordier *et al.* 1999; Maneiro *et al.* 2008).

Los estudios de toxicidad en animales, presentes en literatura, han usado concentraciones agudas de toxinas del DSP muy altas en relación a una situación de consumo humano real. Estos estudios han podido determinar que el OA en mayor cantidad se concentra en el estómago y en los intestinos, pero que también se distribuye por todo el organismo, detectándose en sangre, cerebro y tras la barrera hemato-placentaria (Matias & Creppy 1996; Matias *et al.* 1999; Aune *et al.* 2012; Vieira *et al.* 2013). A la fecha, no existen estudios sobre los efectos crónicos que las toxinas del DSP tienen sobre los órganos blancos, específicamente sobre

los epitelios gástricos y de colon, en cuanto a la sobrevida y/o proliferación celular o sobre la activación de señales pro-inflamatorias.

La norma chilena, al igual que la europea, establece un nivel máximo de presencia de toxinas del DSP en los mariscos de 160  $\mu\text{g}$  de OA o equivalentes/kg de carne de mariscos, es decir, se permite a la población mundial consumir estas toxinas de manera crónica a bajas concentraciones. Esta cuantificación se realiza con el bioensayo de ratón, el cual, brevemente, consiste en inyectar una extracción hidrofóbica de la carne del molusco por vía intraperitoneal a tres ratones de la cepa CF-1, de aproximadamente 20 g de peso. La supervivencia se monitoriza durante 24 h, y el resultado positivo, es decir, presencia de toxina, se define por la muerte de dos de los tres ratones dentro de las primeras 24 h (Yasumoto *et al.* 1995). Este método presenta baja sensibilidad, nula selectividad de toxinas, además de serios cuestionamientos éticos. Existen métodos alternativos de detección tales como cromatografía con detección fluorescente, espectrometría de masas, ensayos de inhibición de fosfatasa o inmunoensayos (ELISA) (EFSA, 2008), pero sus altos costos y su baja disponibilidad mantienen vigente la urgencia de desarrollar nuevos métodos de detección. Sin embargo, la manera actual de cuantificación nos hace plantearnos si efectivamente la población está protegida de los efectos que puede conllevar el consumo crónico de las toxinas del DSP en los alimentos. Considerando que la concentración mínima de toxinas del DSP para observar un efecto deletéreo en humanos es de 0,8  $\mu\text{g}$  de OA o equivalente/kg de individuo, y tomando en cuenta a la diarrea como un mecanismo de defensa de nuestro organismo: ¿Qué ocurre cuando se consumen mariscos contaminados sin

presencia de diarrea? ¿Aumenta el factor de riesgo de contraer cáncer gástrico al consumir toxinas del DSP a dosis subdiarreicas, de manera crónica? En este trabajo pretendemos ampliar el conocimiento para dar respuesta a estas interrogantes.

*Blancos moleculares de las toxinas del DSP: Proteína Fosfatasa 2A (PP2A).*

Los blancos moleculares de las toxinas del DSP son las proteínas fosfatasas 1 y 2A (PP1 y PP2A). El OA inhibe la actividad de la PP2A con una  $IC_{50}$  de 0,1-1 ng/mL, siendo 100 veces mayor para la PP1 (Takai *et al.* 1992). La estructura cristalográfica de la subunidad catalítica de PP2A unida al OA, ha revelado que el extremo hidrófobo de la toxina encaja en una región donde están presentes aminoácidos hidrofóbicos (Trp 200, Ile 123) en el sitio activo de esta enzima. La ausencia de esta “caja hidrofóbica” en PP1 puede explicar la diferencia en las constantes de inhibición entre las fosfatasas (Xing *et al.* 2006). La PP2A es la principal fosfatasa Ser/Thr en las células de los mamíferos y juega un papel clave en la regulación de múltiples vías metabólicas, tales como la proliferación celular, al controlar la transición de G2 a la fase mitótica; la inflamación, al regular la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B; y la apoptosis, al controlar factores anti apoptóticos como BCL2. Es por ello que la PP2A es considerada una proteína supresora de tumores y un regulador positivo de la apoptosis (Westermarck & Hahn, 2008). Está demostrado que la inhibición de la PP2A por proteínas oncovirales, por mutaciones específicas en sus subunidades, o por la sobreexpresión de sus inhibidores endógenos, contribuye a la transformación de células normales en

oncogénicas debido a la pérdida del control sobre los eventos específicos de fosforilación (Arnold & Sears, 2008). A través de la inhibición de PP2A, las toxinas del DSP generan hiperfosforilación celular, pudiendo activar múltiples rutas de señalización, entre las cuales se han descrito a las enzimas AP-1, AKT, PTEN, ERK, JNK y c-Myc (Thompson *et al.* 2002; Chung *et al.* 2007; Guenin *et al.* 2008) así como también la transcripción y secreción de TNF- $\alpha$ , citoquina pro-inflamatoria descrita como promotor tumoral endógeno (Fujiki *et al.* 2013).

La activación de la respuesta inflamatoria por parte de las toxinas del DSP es el principal mecanismo propuesto para explicar el rol de promotores tumorales de estas toxinas, lo cual se comprobó usando ratones TNF- $\alpha$  -/- a los cuales se les aplicó dosis reiteradas de OA sin que desarrollaran tumor (Suganuma *et al.* 1999). Sin embargo, sólo se ha estudiado a TNF- $\alpha$ , y su inducción por parte de OA, y no de las otras toxinas del DSP.

Se sabe también que concentraciones sub-letales del OA pueden generar aumentos en la viabilidad celular, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Yuasa *et al.* 1994; Baharians & Schönthal, 1999; Guénin *et al.* 2008). Aún cuando OA y DTX-1 sólo se diferencian químicamente por la presencia de un grupo metilo en el C35 de DTX-1, no son igualmente tóxicos. Si bien la capacidad del OA de inhibir la PP2A es muy alta, DTX-1 tiene una constante inhibitoria que es 1,6-2,4 veces mayor que la de OA, según el origen de la PP2A (Munday *et al.* 2013). DTX-1 es capaz de generar pérdida de la integridad epitelial en células de colon y



disrupción del citoesqueleto de actina a concentraciones menores que el OA (Espiña *et al.* 2010; Fernández *et al.* 2014).

En la literatura predominan los estudios en que establecen a estas toxinas como agentes apoptóticos, capaces de arrestar el ciclo mitótico, formar aductos con el DNA, generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y activar las caspasas 3, 8 y 9; determinándose que la citotoxicidad y genotoxicidad del OA es dependiente de la línea celular (Soud-Mensi *et al.* 2008; Jayaraj *et al.* 2009). Creemos que estos efectos duales no son contradictorios, ya que se deben a diferentes tiempos de exposición y dosis respuesta, donde, la desregulación producida por las toxinas del DSP puede activar o no señales de muerte celular. Cuando esto no ocurre, es decir, en dosis sub-letales, podrían estar activándose vías de señalización de supervivencia y proliferación celular, así como también, activarse la secreción de agentes proinflamatorios, generándose de esta forma un ambiente tumorigénico.

Para demostrar esto, analizamos el efecto de OA y DTX-1 sobre la viabilidad de dos modelos de epitelio gástrico (AGS y MKN-45) y de epitelio de colon (Caco 2), ya que ambos epitelios son blancos fisiológicos de estas toxinas luego de ser consumidas en mariscos contaminados. Estudiamos la activación del ciclo celular y de vías canónicas de proliferación, diferenciación y supervivencia, como AKT y ERK, ambas reguladas por PP2A. Además, estudiamos el efecto de las toxinas del DSP sobre las principales células efectoras de la respuesta inflamatoria (cultivo primario de macrófagos, y las líneas celulares RAW 264.7 (macrófagos de ratón) y DC 2.4 (células dendríticas de ratón), con el fin de demostrar que estas toxinas

generan un ambiente endógeno tumoral. Comparamos también, los efectos producidos por las toxinas OA y DTX-1, para comprobar que no son equivalentes en su efecto, como lo señala la legislación. Creemos que con este trabajo estamos aportando a entender el “porqué” las toxinas del DSP actúan como promotores tumorales, al estudiar su efecto sobre sus blancos celulares. Nuestro trabajo podría servir como referencia para estipular en la legislación la no presencia de toxinas del DSP en los alimentos; ya que serían más riesgosos sus efectos crónicos (consumo en dosis sub-letales, sin presencia de diarrea) que sus efectos agudos.

## **HIPÓTESIS**

“Las toxinas del DSP, en dosis sub-letales, generan un ambiente tumorigénico al activar vías de señalización de sobrevida, proliferación celular e inflamación, en células de epitelios gastrointestinales”.

## **OBJETIVOS GENERALES.**

- 1.- Determinar proliferación celular y sobrevida por efecto de las toxinas del DSP en células de epitelios gastrointestinales.
- 2.- Determinar activación de vías de señalización de sobrevida, proliferación e inflamación, por efecto de toxinas del DSP, en un modelo murino y celular de epitelio gastrointestinal, y en células del sistema inmune.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar dosis sub-diarreicas y sub-letales de las toxinas del DSP, en un modelo murino.
- 2.- Determinar curvas de dosis y tiempo respuesta de toxinas del DSP en cultivos celulares de epitelios gastrointestinales.
- 3.- Establecer la activación de las vías de señalización de sobrevivencia y proliferación por efecto de toxinas del DSP, en modelos celulares de epitelios gastrointestinales.
- 4.- Determinar aumentos en los niveles de citoquinas proinflamatorias en Placas de Peyer, en cultivos primarios (macrófagos peritoneales) y líneas células (AGS, MKN-45, DC 2.4 y Raw 264.7), por efecto de las toxinas del DSP.

## **MATERIALES**

### **Animales de experimentación.**

Se utilizaron ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 como animales de experimentación, obtenidos del Bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile. En todos los experimentos se utilizaron ratones hembras de 2 a 4 meses de edad, de 20 g de peso aproximadamente, sometidos a un periodo de luz/oscuridad (12/12 h), a una temperatura de 21-25 °C, con agua y alimento *ad limitum*. Todos los procedimientos y cuidados se realizaron con la venia del Comité de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo el certificado del protocolo CBA# 0551 FMUCH.

### **Líneas celulares.**

Las líneas celulares AGS y MKN-45 fueron proporcionadas por el Dr. Alejandro Corvalán, del Laboratorio de Oncología , CIM, Universidad Católica de Chile. Las líneas celulares Caco-2, DC 2.4 y Raw 264.7, fueron proporcionadas por la Dra. María Inés Becker, de la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (FUCITED). Las microalgas *P. lima*, productoras de OA y DTX-1, se adquirieron en Laboratorio Bigelow, USA.

### **Reactivos**

**Toxinas:** El ácido Okadaico (OA; NRC CRM-OA-c) y la Dinophysistoxin-1 (DTX-1, NRC CRM-DTX1) se obtuvieron en el *National Research Council* (Halifax, Nova Scotia, Canadá)

**Anticuerpos:** El Ab anti Ciclina B1 y los Abs anti MHC II, CD80, CD 86 y CD40 conjugados con FITC se obtuvieron en BD Pharmingen (USA); el Ab anti F4/80 conjugado con Alexa Fluor 647 se adquirió en Biolegend (USA); el Ab Anti Conejo IgG conjugado con Peroxidasa se obtuvo en Thermo (Rockford, Illinois, IL, USA); el Ab Anti ratón IgG conjugado con Peroxidasa se obtuvo en Sigma (Saint

Louis, Missouri, MO, USA); y los Abs ERK1 + ERK2; ERK1 / ERK2 (phospho Y204/187 + T202/185); AKT-1; AKT-1 (phospho T308); AKT-1 (phospho S473) y  $\beta$ -Actina se obtuvieron en Abcam (Cambridge, Massachusetts, MA, USA).

**Medios de cultivo:** Los medios de cultivo DMEM y RPMI 1640, además de los suplementos de cultivo: Penicilina/Streptomycin (100  $\mu$ g/mL), Tripsina/EDTA al 0,25%; Aminoácidos no esenciales (100X) se obtuvieron de Invitrogen (Grand Island, New York, NY, USA). El suero fetal bovino (FBS) se obtuvo de HyClone (South Logan, Utah, UT, USA).

**Kit experimentales:** el *kit* de medición de proteínas BCA; el kit Alamarblue para determinación de viabilidad celular; y el kit de Quimioluminiscencia para *Westernblot* de pico señal se adquirieron en Thermo (Rockford, Illinois, IL, USA). Los kit ELISAS Duoset contra TNF- $\alpha$  e IL6 se compraron en R&D System (Minneapolis, MN, USA).

**Proteínas y reactivos químicos:** Albumina sérica bovina (BSA); bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT); Tioglicolato; ADAM; NaNO<sub>3</sub>; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; dihidrocloruro de N-1-naphthylethilenediamina (NED); y Sulfanilamina se compraron en Merck (Darmstadt, Alemania). Tampón Ripa; inhibidores de proteasas; inhibidores de fosfatasas, tampón BupH Tris-Glicina SDS, tampón BupH PBS, Tween-20 10%, membranas de nitrocelulosa 0,22  $\mu$ m, kit de y tampón de Stripping para Western blot se adquirieron por Thermo (Rockford, Illinois, IL, USA).

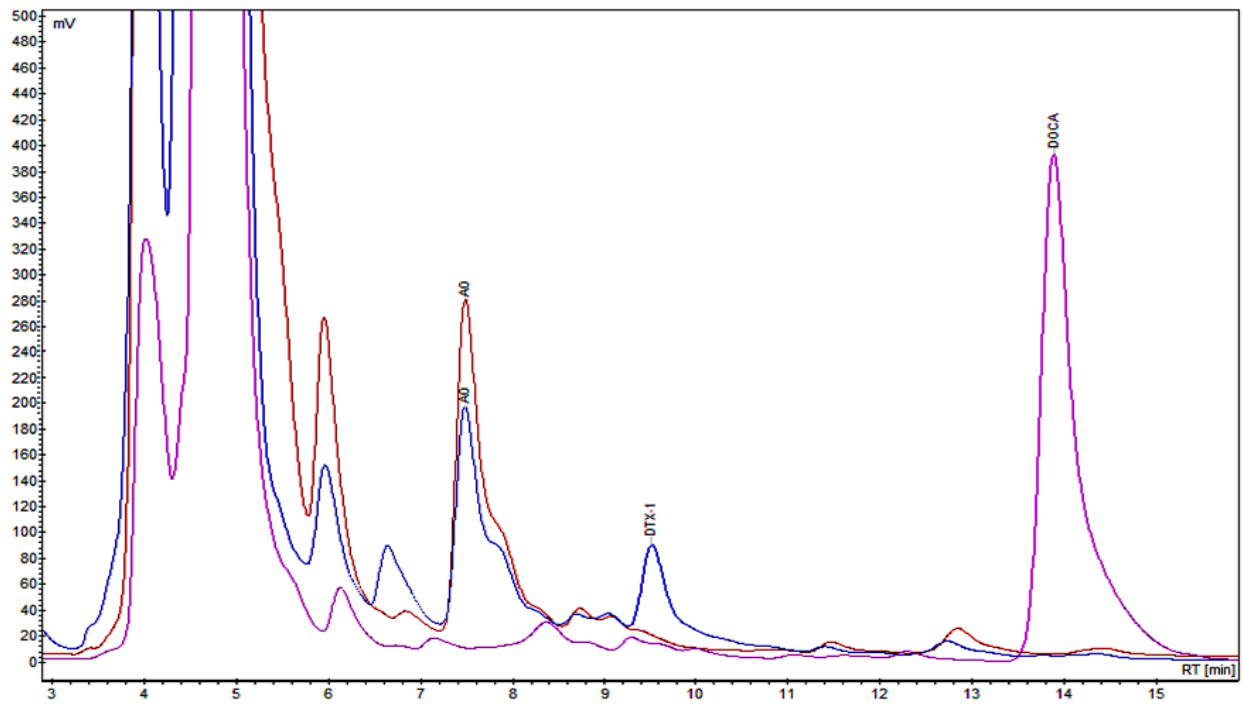
## METODOLOGÍA

**Cultivo de microalgas productoras de toxinas del DSP:** Las microalgas *P. lima*, se centrifugaron cultivadas en agua de mar filtrada y autoclavada, suplementada con  $\text{NaNO}_3$  (75 ng/mL),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (5 ng/mL),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (13 ng/mL) y mezcla de metales trazas y vitaminas. Las condiciones de cultivo fueron: 19°C de temperatura, con foto periodos de luz y oscuridad de 12 horas. Luego de que los cultivos alcanzaron aprox. 20000 cél/L, se cosecharon, se centrifugaron, se resuspendieron en Cloroformo 100% y se sonicaron por durante 15 min por 3 d. Luego, se centrifugaron y al sobrenadante se le realizó una extracción en diclorometano/metanol 9:1.

**Caracterización y cuantificación de toxinas del DSP:** La caracterización y cuantificación de toxinas del DSP a partir de extractos de microalgas se realizó a través de la técnica de HPLC-FLD. Para ello, fue necesaria la derivatización pre-columna con el cromóforo fluorescente 9-antrildiazometano (ADAM). En primer lugar, se secó la muestra con  $\text{N}_2$  gaseoso, y se resuspendió en una solución de ADAM 0,1% en metanol y acetona en relación 1:4, por 1 h, a 30°C, en oscuridad. Como control interno de derivatización se usó el reactivo DOCA, el que al igual que las toxinas del DSP reacciona 1:1 con ADAM. Se secó nuevamente la muestra y se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de metanol 80%. Luego, 20  $\mu\text{L}$  se inyectaron las muestras en un HPLC con columna de fase reversa C-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 micras) y se analizó según su fluorescencia. La longitud de onda de excitación y emisión es 365 nm y 415 nm, respectivamente (figura 3).

### Cultivo celular

**Líneas celulares:** Las líneas celulares AGS, MKN-45 y Caco 2 (ATCC), se cultivaron en medio DMEM suplementado con penicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), estreptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 1% de aminoácidos no esenciales, y 10% de FBS descomplementado por calor. Las células se incubaron en 10%  $\text{CO}_2$  a 37 °C y se



**Figura 3. Cuantificación de toxinas del DSP a partir de extractos de microalga *P. lima*:**

AO (Ácido okadaico): 9,13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (línea azul)

DTX-1: 2,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (línea azul)

Estándar Ácido Okadaico 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (línea roja)

Estándar de derivatización: DOCA 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (línea purpura).

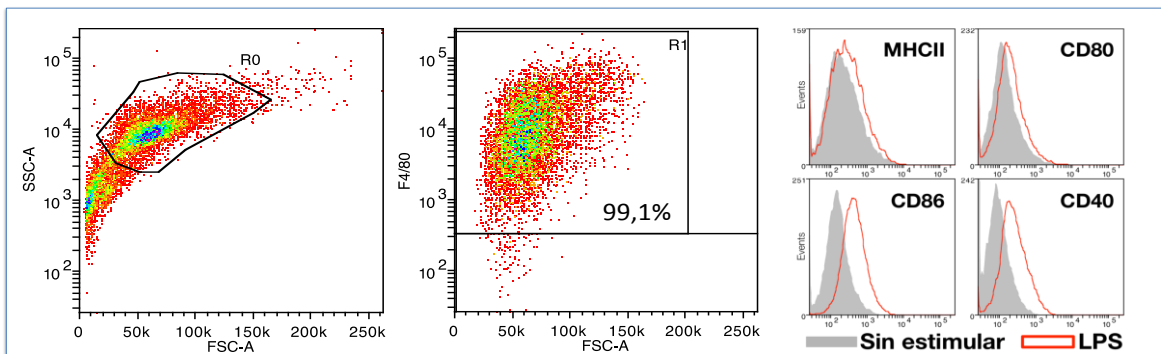


cosecharon con un 70-90% de confluencia usando tripsina / EDTA al 0,25%. Para las microscopías con contraste de fases, las células se trabajaron con un 100% de confluencia (figura 9). Las células DC 2.4, RAW 264.7 se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado de igual forma, siendo cultivadas en 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C de temperatura, y cosechadas con ayuda de “*Scaper cell culture*”.

**Macrófagos intraperitoneales de ratón:** Para obtener macrófagos intraperitoneales, se inyectaron ratones C57BL/6 intraperitonealmente con 1,6 mL de tioglicolato 0,5% envejecido al menos por 1 año. Luego de cuatro días el ratón se mata por dislocación cervical y se le extraen en 6 mL de medio de la cavidad peritoneal, el exudado celular. Los eritrocitos se eliminan con un tampón de lisis (KCl al 0,88%). Se sembraron  $3 \times 10^4$  células en placas de 96 pocillos en un volumen de 100 µL y luego de 2 horas, y se retiraron las células no adherentes. Las células se analizaron por citometría de flujo, siendo en un 99,1% positivas para el marcador F4/80 positivas (marcador específico de macrófagos). Además, se analizó la capacidad de activación de los macrófagos frente a LPS 10 ng/mL, respondiendo satisfactoriamente al expresarse los marcadores de maduración MHCII, CD80, CD86 y CD 40, por sobre el control negativo (figura 4, Zhong 2014).

### **Ensayos de viabilidad y proliferación celular**

**Ensayo MTT y ensayo AlamarBlue:** Para las líneas celulares se sembraron  $1 \times 10^4$  células en placas de 96 pocillos, en 100 µl de medio sin SFB, por 24 h. Luego se removió el sobrenadante y se reemplazó por medio completo, suplementado con OA o DTX-1 a diferentes tiempos y concentraciones. Para los macrófagos intraperitoneales se sembró  $3 \times 10^4$  células, antes de remover las células no adherentes y se reemplazó por medio completo suplementado con las toxinas del DSP, por 24 h. Para el **ensayo MTT**, las células se incuban con MTT a una concentración final de 0,5 mg/mL en medio, por 2 h. Luego se agregan 200 µL de HCl-isopropanol 0,1 N, para disolver los cristales de formazan (al reducirse el MTT por acción de las enzimas mitocondriales, este se precipita y cambia de color amarillo a cristales de color purpura). Para el **ensayo AlamarBlue**, se usó el



**Figura 4. Caracterización de macrófagos intraperitoneales:** Un 99,1% de las células adherentes presentó el marcador F4/80, característico de macrófagos. Las células sobreexpresan el marcador de maduración MHCII, y las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40, frente a 10 ng/mL de LPS. Gráfico representativo (Zhong, 2014).

protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, las células se incuban con el reactivo al 10% por 1 ó 2 h (este reactivo comercial puede ser reducido por enzimas citoplasmáticas, cambiando de un color azul oscuro a violeta). En ambos métodos, se midió la densidad óptica del medio, la cual es extrapolable a la cantidad de células, con un lector de microplaca a una longitud de onda de 570 nm y 690 nm como referencia, para el ensayo MTT; y 600 nm y 570 como referencia para el ensayo Alamarblue.

**Ensayo de exclusión por Azul de Tripán:** Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 24 pocillos, en 500  $\mu$ l en medio libre de SFB por 24 h, para luego removerlo y reemplazarlo por medio completo, suplementado con OA a diferentes concentraciones y tiempos. Las células se lavaron dos veces con PBS y se soltaron de la matriz con Ttripsina/EDTA 1%, resuspendiéndolas en 1 mL de medio. Luego, las células se contaron en una cámara Neubauer, 1:1 con Azul de tripán.

Todos los resultados de viabilidad son expresados considerando como 100% la condición control, sin toxina.

**Ensayo de administración de toxinas del DSP a un modelo murino:** A grupos de 4 ratones BALB/c se les administró por vía oral diferentes dosis de toxinas del DSP (0, 25, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/Kg), en un volumen máximo de 20  $\mu$ L, 25% metanol, a través de una pipeta. Se les administró 1, 2, 4, 5 ó 14 dosis, y se mataron 24 h después de entregada la última dosis. Se tomaron muestras de estómago, intestino delgado, intestino grueso y de las 3 Placas de *Peyer* más próximas al duodeno, almacenándose a  $-80^\circ\text{C}$ .

**Extractos celulares:** Para los análisis de Western Blot, se sembraron en placas de 6 pocillos  $3 \times 10^5$  células en 2 mL de medio libre de SFB, por 24 h. Luego el medio se removió y reemplazó por medio completo, suplementado con OA o DTX-1 a diferentes concentraciones, por 4 ó 24 h. Luego, se removió el medio, se lavó dos veces con PBS, y se agregó tampón RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasas, por 3 min. El buffer se centrifugó a 14000 g por 15 min, y se cuantificó la concentración de proteínas con el método BCA. Las muestras se calentaron a

100°C en presencia de SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol antes de analizarse por electroforesis.

**Western blotting:** Se cargaron 10  $\mu$ g de proteína total en geles SDS-PAGE al 15% y se transfirieron en membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con BSA 1% en PBS-Tween20 0,1% (PBST), por 1 h, a T° ambiente. Luego, se incubaron contra los siguientes Abs: Cyclin B1 (1:2,500), AKT-1 (1:5000), AKT-1 (phospho T308) (1:5000), AKT-1 (phospho S473) (1:5000), ERK1+ERK2 (1:5000), ERK1+ERK2 (phospho Y204/187 + T202/185) (1:5000) y  $\beta$ -actina (1:7500), por 12 h. Las membranas se lavaron 3 veces y se incubaron contra el Ab secundario conjugado con peroxidasa (1:5000), por 1h, para luego ser lavadas 3 veces y reveladas por quimioluminiscencia. Las bandas se cuantificaron ocupando el Software Gel Pro31. Para la normalización se utilizó la banda obtenida para  $\beta$ -actina, AKT-1 ó ERK1+ERK2.

#### **Análisis de citoquinas y quimioquinas:**

**ELISA:** Para cuantificar la secreción de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6 en las líneas celulares AGS, MKN-45, DC 2.4 y Raw 264.7, y en macrófagos intraperitoneales, tratadas con OA o DTX-1, se utilizó el sistema DuoSet ELISA Assay, según las indicaciones del fabricante. Como revelador se utilizó “TMB substrate”, midiéndose en un lector de placa a 450 nm.

**Sistema Luminex XMap inmunofluorescente de citoquinas:** Esta medición se realizó en cultivos de macrófagos intraperitoneales y se realizó a través del servicio prestado por la compañía Eve Technologies (Calgary, Canadá). Brevemente, se agregaron sobrenadantes de macrófagos intraperitoneales tratados por 24 h con diferentes estímulos de OA y DTX-1, en pocillos pre-incubados con perlas unidas a Abs contra 32 citoquinas distintas. En cada experimento se usó un *pool* de 4 pocillos independientes, realizándose 3 experimentos independientes (macrófagos obtenidos de 3 extracciones diferentes). Las muestras se incubaron con las perlas marcadas con Ab específicos para cada citoquina, durante 2 horas y se lavaron 3

veces antes de incubarlas con el Ab secundario durante 1 hora. Luego, se lavaron los pocillos y se midió la fluorescencia en el sistema Luminex 200, determinando su concentración según estándares.

**Ensayo de Greiss:** Para cuantificar la concentración de NO, 100  $\mu$ L de sobrenadante de macrófagos intraperitoneales se incubaron con 50  $\mu$ L de sulfanilamida 0,1% en 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, por 15 min, y luego con 50  $\mu$ L de dihidrocloruro de N-1-naphthylethilenediamina (NED) 0,1%. Luego se midió a 550 nm en un lector de placa y se cuantificó según curva estándar de NO.

**Actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9:** En sobrenadantes de macrófagos intraperitoneales analizamos la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9. Para ello, 10  $\mu$ L de medio se diluyeron en 190  $\mu$ L de tampón de muestra (SDS 2%, Tris-HCl 125 mM; pH 6.8, glicerol 10% y Azul de Bromofenol 0,001%). Luego, se cargaron 10  $\mu$ L en un gel SDS PAGE al 7,5%, polimerizado con gelatina al 1%. Después de la electroforesis el gel se incubó por 30 s en Triton X-100 2,5% y luego a 37°C por 18 h en tampón CaCl<sub>2</sub> 10 mmol/L, Tris-HCl, pH 7.4. Los geles se tiñeron con Coomassie G-250 0,05% y se destiñeron con metanol 30%, ácido acético 10%. La actividad gelatinasa se detectó en las bandas no teñidas por el Coomasie, y luego se cuantificó por densitometría. Las bandas de MMP-2 y MMP-9 corresponden a 72 y 87 kDa, respectivamente.

**Análisis estadísticos:** Los resultados se expresaron como promedios  $\pm$  s. Para los ensayos de viabilidad, análisis de Western blot, actividad gelatinasa y cuantificación de citoquinas a partir de placas de *Peyer*, se usó ANOVA de dos vías con post-análisis de Bonferroni. Para los análisis de citoquinas en sobrenadantes celulares se determinaron diferencias significativas con ANOVA de una vía entre cada estímulo y su control negativo; y t-test para determinar diferencias entre las toxinas, a igual concentración de estímulo. Las significancias estadísticas se cuantifican a partir de  $p < 0,05$ . Para realizar el análisis y los gráficos se usó el programa GraphPad Prism 5. Las cuantificaciones de densitométricas de los geles electroforéticos y los *westernblots* se utilizó el programa GelPro 31 (USA).

## RESULTADOS

A continuación, analizaremos los resultados según los objetivos planteados en esta tesis:

### **Objetivo 1: Determinar dosis sub-diarreicas y sub-letales de las toxinas del DSP, en un modelo murino**

Con el fin de evaluar los efectos crónicos de las toxinas del DSP, se determinaron las dosis subletales y subdiarreicas en el tiempo, en un modelo murino. Es por esto que a grupos de 4 ratones BALB/c, se les administró por vía oral diferentes dosis de toxinas del DSP. En este experimento se utilizaron extractos de microalgas *P. lima*, considerándose la concentración de toxina total como la suma de OA y DTX-1, determinadas en los extractos (figura 3). La mayor dosis administrada fue de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de animal, ya que es la concentración menor del índice letal descrito en literatura para el OA por vía oral en ratones (400-2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , según Le Hegarat *et al.* 2006; ID<sub>10</sub> e ID<sub>50</sub> de 780  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 880  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente, según Aune *et al.* 2012; 4/13 ratones muertos luego de dosis 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  según Vieira *et al.* 2013).

Como se muestra en la Tabla 1, los 4 ratones a los cuales se les administró una dosis de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , presentaron diarrea, hasta 24 h después de la administración y uno murió. Con 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 3 de 4 ratones presentaron diarrea 24 h luego de la segunda administración. Con 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sólo un ratón presentó diarrea luego de la cuarta administración. Los controles no mostraron diarrea.

**Tabla 1. Administración de toxinas de DSP por vía oral en modelo murino:** A grupos de 4 ratones se les administró diferentes dosis a diferentes tiempos de toxinas del DSP, por vía oral.

\*Administración dosis, ° Diarrea, † Muerte.

Tiempo Dosis	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
400 mg/Kg	*	°(4 de 4) †(1 de 4)			
200 mg/Kg	*	°(1 de 4)	*	°(3 de 4)	
100 mg/Kg	*	* °(0 de 4)	* °(0 de 4)	* °(0 de 4)	°(1 de 4)
0 mg/Kg	*	*	*	*	

Luego de sacrificar a los ratones 24 h después de entregada la última dosis, se observó una notoria dilatación y formación de edema a nivel estomacal e intestinos, de manera similar como lo describe Aune *et al.* 2012, especialmente al grupo de 400 µg/kg, en comparación a los controles (figura 5). No se observó daño a nivel de otros órganos, como heridas pulmonares o palidez del hígado, lo cual se corroboró con la medición de la transaminasa ALT sérica, la que no mostró diferencias por efecto de las toxinas del DSP al comparar con los controles (todas las muestras tuvieron valores entre 45 UI/L y 60 UI/L; muestras analizadas en el laboratorio clínico de la Clínica Vespucio).

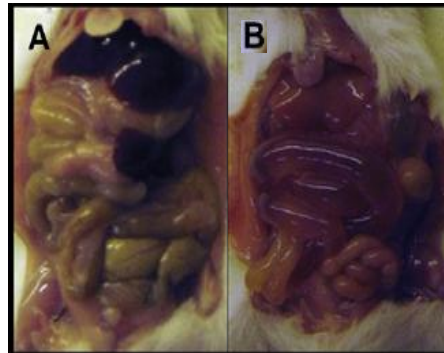
De este experimento se puede inferir que: tal como está descrito en literatura (Matías *et al.* 1999), los blancos principales de las toxinas del DSP son los órganos del sistema gástrico; y que existen diferencias fisiológicas entre la exposición crónica y las agudas de las toxinas del DSP. En cuanto a la determinación de la dosis letal 50, por vía oral, creemos que nuestros datos se aproximan bastante a lo descrito en literatura.

Este experimento nos permitió determinar las dosis y los tiempos a los cuales administrar toxinas del DSP con el fin de estudiar su efecto crónico. Si bien no fue posible cuantificar la cantidad de toxinas del DSP acumuladas en los órganos debido a que la matriz orgánica en que se extraen no permite la derivatización de ellas para así poder detectarlas por HPLC (los trabajos en los cuales se estudió la distribución del OA en ratones luego de administración vía oral, se realizaron con [3H]OA, (Matías *et al.*, 1999; Aune *et al.*, 2012)); este experimento sirvió para



determinar la secreción de señales pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6, a nivel de placas de *Peyer*. Estos resultados se muestran en el objetivo 4. Además, los resultados se pueden proyectar hacia el comportamiento de cultivos epiteliales de estómago e intestino, en cuanto a qué efecto tendrán las toxinas del DSP sobre su viabilidad. Con 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  todas las estructuras celulares gástricas murieron, por tanto, si consideramos que la capacidad estomacal de un ratón es de aproximadamente 1 mL (Mc Connell *et al.* 2008), que los ratones pesaron 20 g en promedio, y suponiendo que toda la toxina administrada ingreso en el estómago, habríamos puesto en presencia del epitelio gástrico una concentración de 8  $\mu\text{M}$  de toxina. En literatura, concentraciones mayores a 100 nM ya generan muerte en múltiples líneas celulares a las 24 h (Souid-Mensi *et al.* 2008; Jayaraj *et al.* 2009). Debemos considerar que la biodisponibilidad de las toxinas no es la misma en un modelo *in vivo* (presencia de mucosa, difusión, células estratificadas) que en uno *in vitro*.

A



B

400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 1 dosis



200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 2 dosis



100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 4 dosis



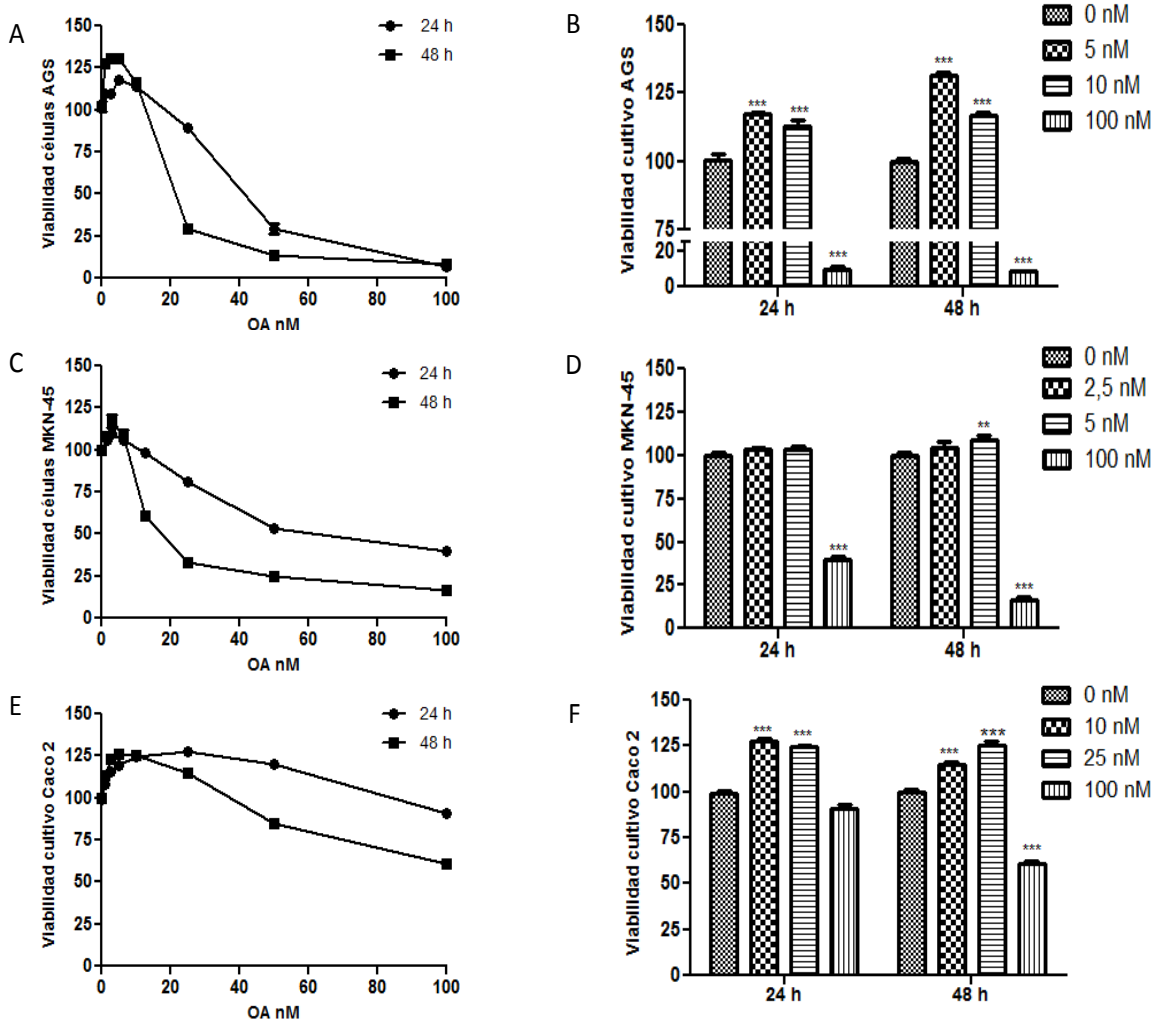
Control



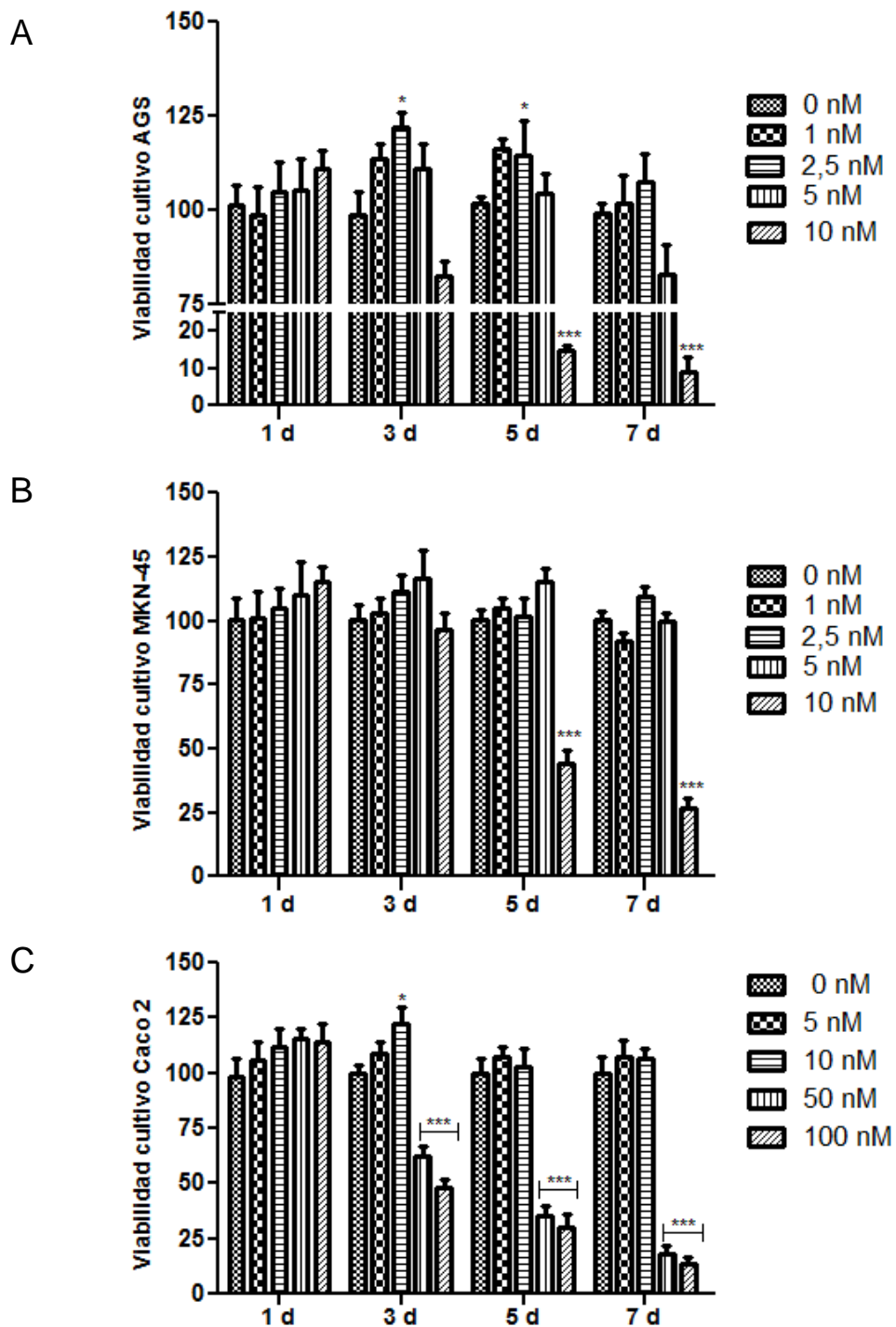
**Figura 5. Efectos sobre órganos del sistema gastrointestinal por administración de toxinas del DSP:** A: En los intestinos se aprecia dilatación y transparencia del tejido, con formación de edema y contenido acuoso, cuando se administró 880 mg/kg (B), en comparación al control (A). (Aune *et al.*, 2012). B: Estómagos de ratones BALB/c, 24 h después de la última dosis entregada. Se aprecia gran dilatación y formación de edema, con contenido estomacal líquido, en comparación al control.

## **Objetivo 2.- Determinar curvas de dosis y tiempo respuesta de toxinas del DSP en cultivos celulares de epitelio gástrico y de colon**

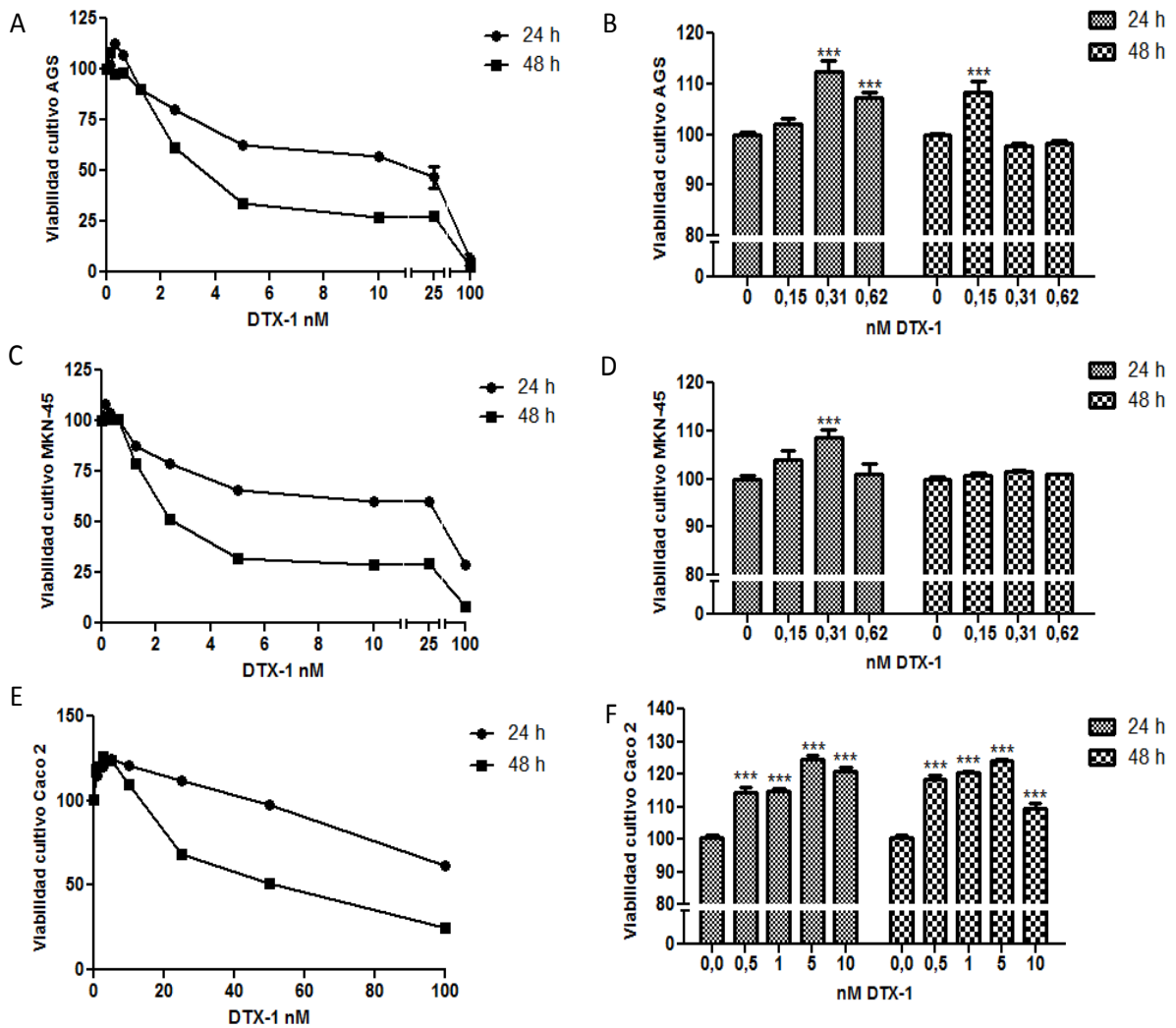
Para determinar si existe un rango de concentraciones de las toxinas del DSP que generen proliferación celular, realizamos curvas de dosis y tiempo respuesta, en los modelos de epitelio gástrico AGS y MKN-45, y en el modelo de epitelio de colon Caco 2. Los resultados obtenidos con OA se muestran en la figura 6 y los con DTX-1 en la figura 8; donde, en A, C y E, se grafica la tendencia de las curvas, y en B, D y F, se grafica las diferencias significativas. Los resultados corresponden al ensayo Alamarblue, no se muestran los resultados obtenidos por el ensayo MTT por ser muy similares. Determinamos que los epitelios gástricos comienzan a disminuir su viabilidad a concentraciones de OA mayores que 12,5 nM a 24 h; y a 10 nM a 48 h. Por su parte, las células de epitelio de colon, mostraron tener una menor toxicidad frente al efecto de OA, disminuyendo la viabilidad del cultivo a concentraciones mayores de 50 nM. A dosis sub-letales, los tres cultivos celulares incrementaron su viabilidad en comparación al control negativo a ambos tiempos. Analizamos este efecto a lo largo de 7 días (figura 7), observando un aumento en la viabilidad de los cultivos a concentraciones menores a 5 nM para los epitelios gástricos, y de 10 nM para la línea celular Caco 2, lo cual tiende a equipararse con los controles en el tiempo. Es difícil encontrar diferencias significativas en este experimento dada la alta tasa mitótica de las células y las limitaciones propias del método (Exclusión por Azul de tripán, ver metodología).



**Figura 6. Efecto de OA sobre la viabilidad de cultivos de epitelios gastrointestinales:** Células AGS (A), MKN-45 (C) y Caco 2 (E) se incubaron durante 24 h ó 48 h con diferentes concentraciones de AO, y la viabilidad fue medida por el ensayo Alamarblue. En B, D y F, gráficos de barra muestran las diferencias significativas comparando con los controles (N = 4, en cuadruplicado). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005.



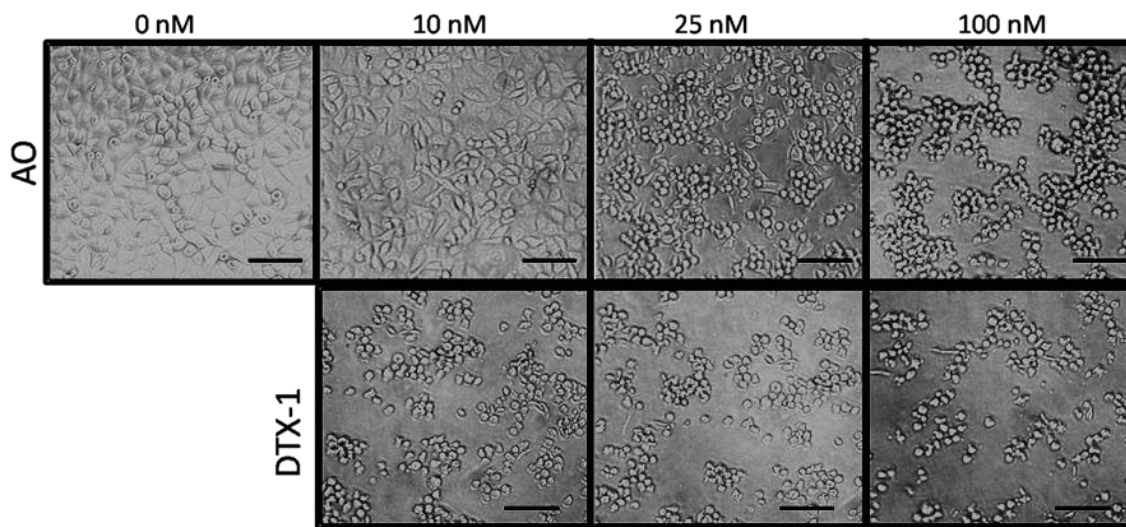
**Figura 7. Efecto de OA sobre la viabilidad de cultivos AGS, MKN-45 y Caco 2 hasta 7 d:** Células AGS (A), MKN-45 (B) y Caco 2 (C) se incubaron por 1, 3, 5 y 7 d con diferentes concentraciones de AO, y la viabilidad fue medida usando el método de exclusión por Azul de tripán (N=3, en cuatruplicado) \*  $p < 0,5$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p > 0,005$ .



**Figura 8. Efecto de DTX-1 sobre la viabilidad de cultivos de epitelios gastrointestinales:** Células AGS (A), MKN-45 (C) y Caco 2 (E) se incubaron por 24 h ó 48 h con diferentes concentraciones de DTX-1, y la viabilidad fue medida por el ensayo Alamarblue. En B, D y F, gráficos de barra muestran las diferencias significativas comparando con los controles (N = 3, en cuadruplicado). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005.

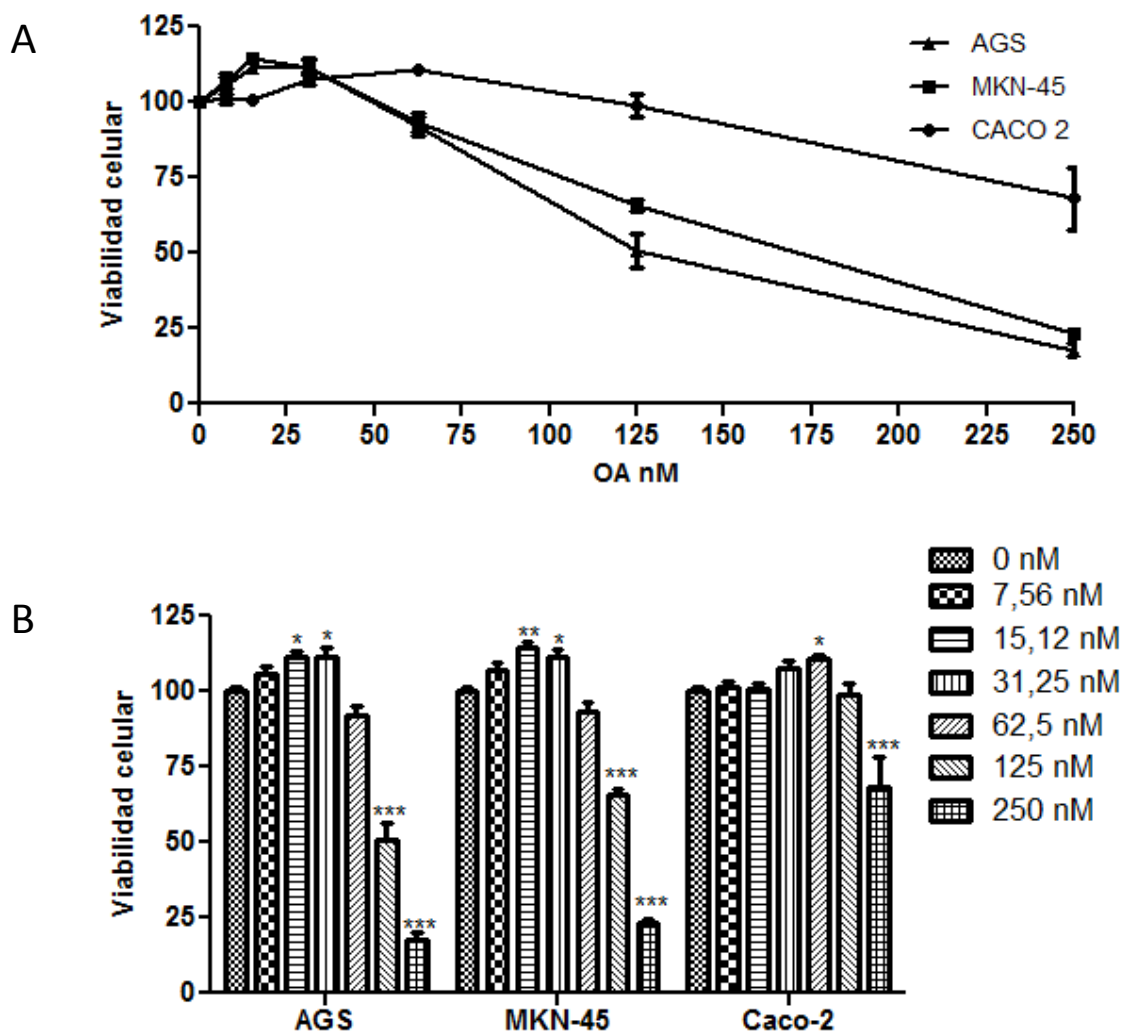
DTX-1 demostró ser al menos un orden de magnitud más tóxica que OA en las tres líneas celulares, y el comportamiento de las curvas fue muy similar al encontrado con OA, aún cuando los aumentos en la viabilidad de los cultivos a dosis sub-letales fueron menores. En la figura 9, por microscopía de contraste de fase se comparan los efectos de ambas toxinas sobre la línea MKN-45, y se observa que DTX-1 genera disrupción de la monocapa celular y una morfología de las células aparentemente en estado apoptótico, a concentración 10 veces menores que OA.

Con el fin de observar los efectos de OA sobre la proliferación celular en condiciones más cercanas a las fisiológicas, se realizaron tratamientos a las células durante 4 h, tiempo luego del cual el estómago presenta un vaciamiento total de comida (Parkman *et al.* 2009); y se analizó la proliferación celular a 48 h. Los resultados se grafican en la figura 10. Tal como en los resultados anteriores, los cultivos mostraron un aumento de la viabilidad a concentraciones sub-letales, siendo Caco 2 más resistente a la toxicidad del OA. En este ensayo de pulso, los cultivos celulares resistieron concentraciones más altas de la toxina, observándose la proliferación del cultivo a mayores concentraciones en comparación a lo observado cuando OA está presente de manera continua. Estos resultados demuestran que tanto el epitelio gástrico como el de colon pueden ser expuestos a niveles letales de OA por períodos cortos de tiempo sin que se active muerte celular, tan cómo podría ocurrir en el estómago luego de ser consumidos mariscos contaminados.



**Figura 9. Comparación por microscopía entre tratamientos con OA o DTX-1 sobre células MKN-45:** Se compara igual concentración de toxinas, a 24 h, en monocapa de células MKN-45 trabajadas con 100% de confluencia. Barra de aumento corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .





**Figura 10. Efecto de tratamiento con OA por 4 h sobre la viabilidad de cultivos de epitelios gastrointestinales:** A. Curvas dosis respuesta en células AGS, MKN-45 y Caco 2. La viabilidad se analizó por el método Alamarblue. B: Gráficos de barras con las significancias estadísticas. (N =3, en cuadruplicado). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ .

En resumen, las tres líneas celulares presentan aumento en la viabilidad del cultivo frente a dosis sub-letales de toxinas del DSP; Caco 2 mostró menor toxicidad en comparación a las células de epitelio gástrico, es decir, presenta una mayor resistencia frente a las toxinas; y además, el tiempo de exposición determina también el efecto sobre las células, si es que promueve muerte o proliferación celular.

A continuación, analizaremos si este efecto dual (muerte o proliferación celular) que generan las toxinas del DSP, depende de la activación de señales transcripcionales de ciertas vías canónicas de proliferación celular, y si este aumento en la viabilidad de los cultivos se debe, efectivamente, a una mayor tasa proliferativa de las células.

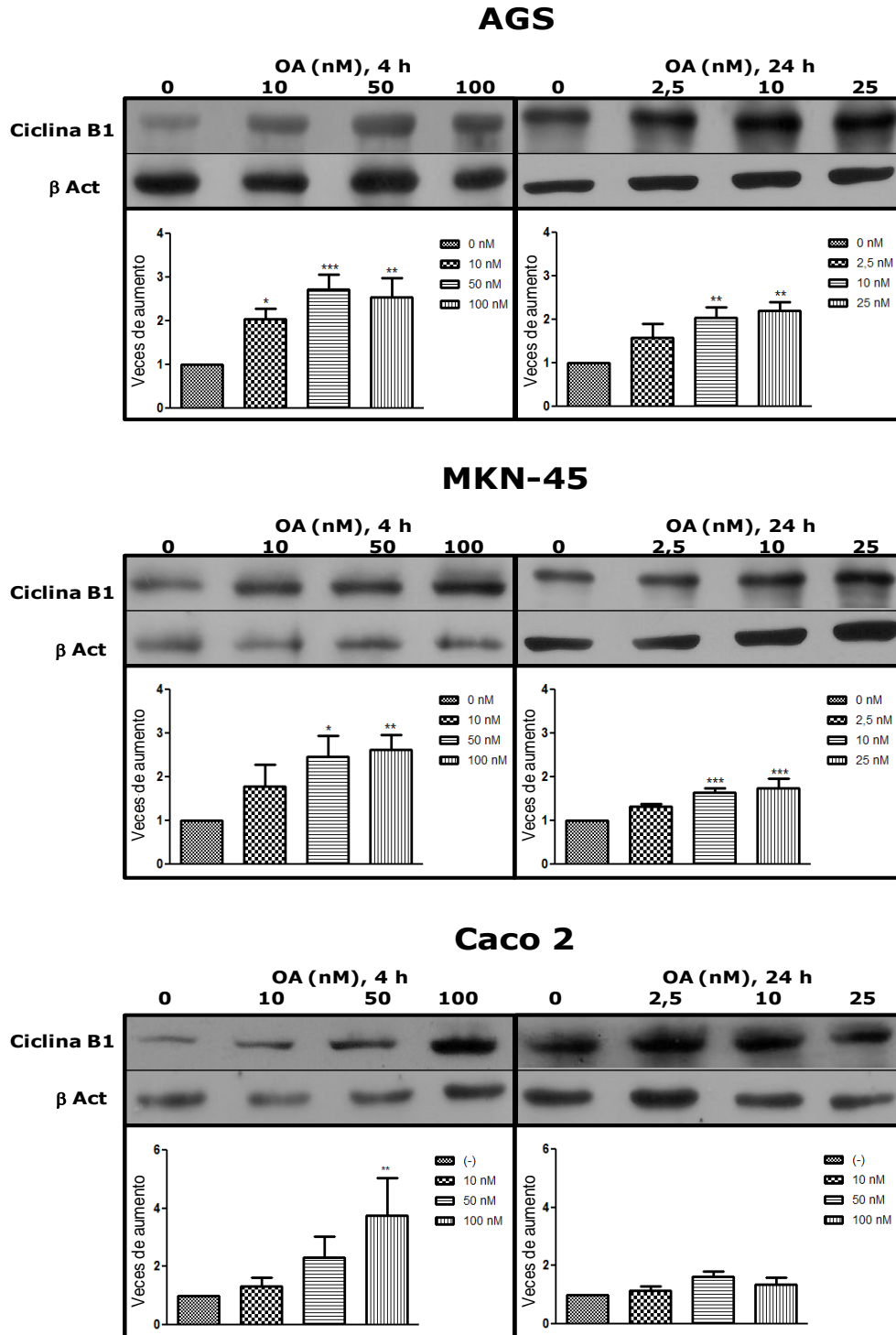
**Objetivo 3.- Establecer la activación de las vías de señalización de supervivencia, proliferación e inflamación, por efecto de toxinas del DSP, en modelos celulares de epitelio gástrico**

A través de la sobreexpresión de la ciclina B, analizamos el efecto proliferativo de las toxinas del DSP sobre los epitelios gástricos y de colon. Ciclina B es el último factor inducible del ciclo celular y determina el paso de G2 a mitosis; y a su vez, está regulada por la actividad de PP2A (Fisher *et al.* 2012). Las células se trataron con OA por 4 ó 24 h, a diferentes concentraciones tanto letales como sub-letales. Los resultados obtenidos por Western Blot se muestran en la figura 11. Ciclina B aumentó su expresión en las tres líneas celulares, con un efecto dosis respuesta,

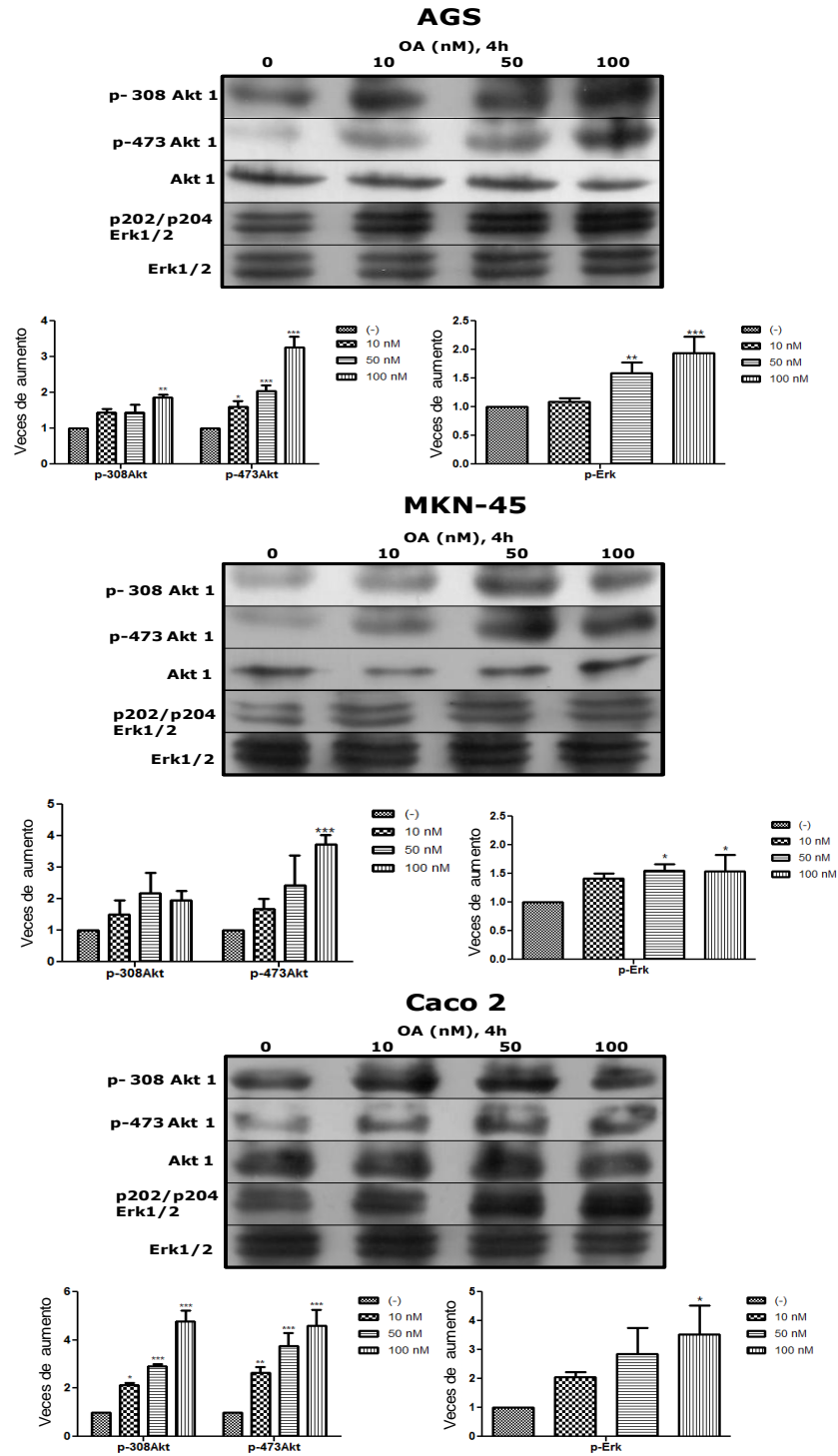
incluso a concentraciones donde la viabilidad del cultivo fue menor. El aumento relativo de Ciclina B fue mayor a 4 h que a 24 h, tiempo al cual tiende a normalizarse respecto al control. Podemos inferir de estos resultados que, aun cuando se activan señales de proliferación celular, la desregulación producida por OA puede activar también apoptosis u otro tipo de muerte celular. Cuando esto no ocurre, las células proliferan.

A continuación, analizamos si OA puede activar vías canónicas de proliferación y diferenciación celular como AKT1 (principal efector de la vía PI3K) y ERK (uno de los 3 efectores de la vía MAPK). La activación de AKT1, o PKB como también se le conoce, requiere de la fosforilación de los aminoácidos Thr 308 y Ser 473. ERK es la señalización clásica para la activación de efectores transcripcionales en respuesta a factores de crecimiento y depende de las fosforilaciones en sus residuos Thr 202 y Tyr 204. Ambas proteínas son sustrato de PP2A, la cual las desactiva. Además, ambas quinasas tienen la capacidad de activar al factor transcripcional NF $\kappa$ B, el cual modula respuestas de supervivencia, inhibiendo apoptosis, diferenciación celular, proliferación y activación de la respuesta inflamatoria, por lo que se han visto implicadas en muchos tipos de cáncer al desregularse (Letourneux *et al.* 2006; Rodgers *et al.* 2011).

Luego de un tratamiento por 4 h con OA, las tres líneas celulares mostraron un aumento en las formas fosforiladas de AKT y ERK, siendo significativo este incremento en algunos casos, incluso cuando los cultivos disminuyen su viabilidad (figura 12).



**Figura 11. Expresión de ciclina B en cultivos de epitelios gastrointestinales:** Tratamientos en células AGS, MKN-45 y Caco 2 con OA durante 4 ó 24 h, midiéndose por *Westernblot* la expresión de Cyclina B. La intensidad de las bandas se cuantificó y gráfico determinándose las diferencias significativas según normalización con  $\beta$  Actina (N=4 para AGS y MKN-45; N=3 para Caco 2). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .



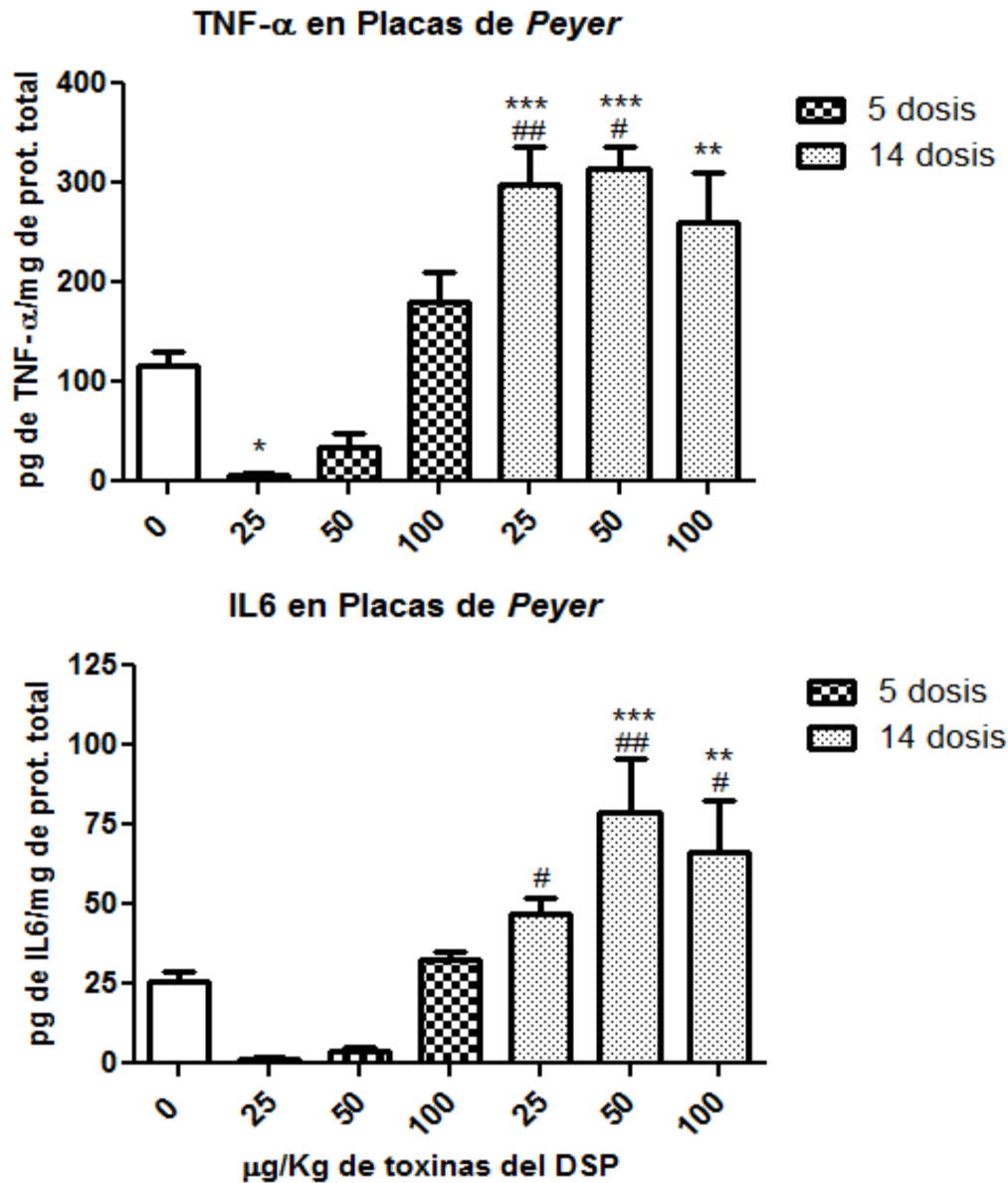
**Figura 12: Activación de AKT y ERK en cultivos de epitelios gastrointestinales.** Tratamientos en células AGS, MKN-45 y Caco 2 con OA durante 4 h, midiéndose por *Westernblot* la expresión de p308-Akt1, p473-Akt1 y p-Erk1/2. La intensidad de las bandas se cuantificó y gráfico determinándose las diferencias significativas según normalización con niveles basales de AKT1 y ERK1/2. (N=3). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

En conclusión, nuestros resultados demuestran que las concentraciones sub-letales de la OA pueden aumentar la tasa mitótica celular, al sobre expresar ciclina B; y además activar vías de proliferación y diferenciación celular como AKT y ERK.

**Objetivo 4.- Determinar aumentos en los niveles de citoquinas proinflamatorias en Placas de Peyer, en cultivos primarios (macrófagos peritoneales) y líneas células (AGS, MKN-45, DC 2.4 y Raw 264.7), por efecto de las toxinas del DSP**

Para explicar el mecanismo por el cual las toxinas del DSP actúan como promotores tumorales, Komori *et al.* en 1993, plantearon que el OA, al gatillar hiperfosforilación celular, aumenta la secreción de TNF- $\alpha$  y que esta citoquina proinflamatoria es la que actúa como promotor tumoral endógeno, induciendo un estado de inflamación crónico que favorece un ambiente tumorigénico. Este mismo grupo científico luego demostró que OA genera aumentos a nivel de RNA mensajero de TNF- $\alpha$  en queratinocitos de ratón luego de aplicaciones reiteradas, y que en los ratones *knockout* de esta citoquina no se genera un tumor inducido por OA (Fujiki *et al.* 2013). Sin embargo, la inducción de la respuesta inflamatoria en su conjunto no ha sido estudiada y sólo se ha usado OA para determinar este mecanismo. Analizamos por tanto la secreción de factores pro-inflamatorios *in vivo*, desde las placas de Peyer de ratones a los cuales se les administró dosis subdiarreicas de toxinas del DSP; y en cultivos celulares de las líneas AGS, MKN-45, DC 2.4 (línea de células dendríticas murinas), RAW 264.7 (línea de macrófagos murinos) y en macrófagos intraperitoneales de ratón (cultivo primario).

Para analizar este efecto *in vivo*, se les administró a grupos de 4 ratones 0, 25, 50 ó 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de toxinas del DSP (3:1 OA/DTX-1), cada 2 ó 3 días, por 2 ó 5 semanas, y se mataron por dislocación cervical 24 h después de la última dosis. Salvo en un caso (dosis 11, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) los ratones no presentaron diarrea ni tampoco sangre en las deposiciones. Se extirparon las 3 placas de *Peyer* más próximas al duodeno y se maceraron en un volumen de 1 mL de medio. Este sobrenadante se centrifugó para eliminar los restos de tejido y se cuantificó la concentración de proteínas totales, antes de medir la cantidad de TNF- $\alpha$  e IL-6, por ELISA. Los resultados se muestran en la figura 13. Los ratones a los cuales se les administró 14 dosis presentan un aumento significativo en ambas citoquinas, al compararlos con los controles negativos y con los ratones que se les entregó 5 dosis. Esto significa que hay un efecto acumulativo de las toxinas del DSP, aun cuando no observamos diferencias entre las 3 dosis (Según Matias *et al.* 1999, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , se considera dosis sub-letal, y 50 y 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , son dosis sub-diarreicas, existiendo una mayor acumulación de toxinas cuando no ocurre diarrea).

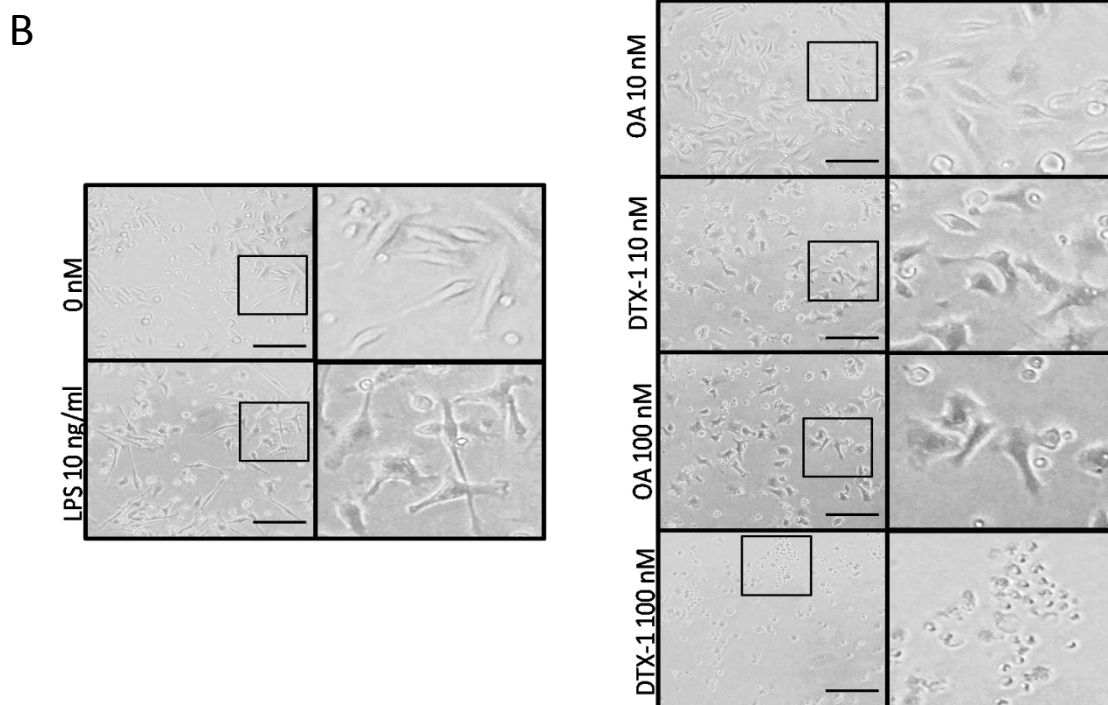
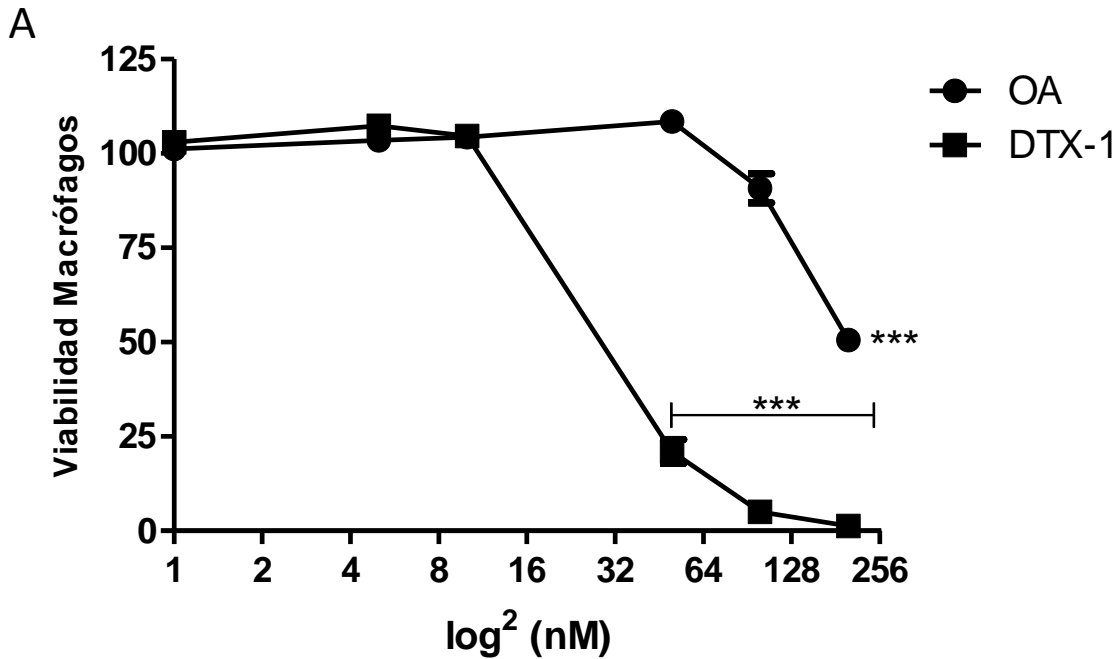


**Figura 13. Cuantificación de TNF- $\alpha$  e IL-6 en placas de Peyer extraídas de ratón tratados con diferentes dosis de toxinas del DSP:** Cuantificación por ELISA de TNF- $\alpha$  e IL-6 en placas de Peyer extraídas de grupos de 4 ratones a los cuales se les administró cada 2 ó 3 días, 5 ó 14 dosis de diferentes concentraciones de OA (control solo vehículo). Los ratones se mataron 24 h después de la última dosis y se extrajeron las 3 placas de Peyer más cercanas al duodeno. La concentración de citoquinas se normalizó por la concentración de proteína total. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.005.



En cuanto a los resultados obtenidos con células *in vitro*, no detectamos secreción de citoquinas pro-inflamatorias en células de epitelio gástrico (AGS y MKN-45), por efecto de las toxinas del DSP y LPS, tanto por ensayos ELISA como por el sistema Luminex XMAP (dato no mostrado). En literatura está descrito que estas líneas pueden secretar TNF- $\alpha$  e IL-6 por efecto de LPS, sin embargo, nosotros no obtuvimos este resultado.

Dado que los macrófagos están presentes en un gran número en el estómago, participando en procesos de inflamación gástrica, cicatrización, inmunidad contra infecciones como *H. pylori* y carcinogénesis (Kawahara *et al.* 2011; Chung & Lim, 2014) y que son un modelo universal para estudiar respuesta inmune, analizamos el efecto de OA y DTX-1 sobre cultivos primarios de macrófagos intraperitoneales murinos. En la figura 14 A, se observa una curva dosis respuesta de la viabilidad de los cultivos, disminuyendo por efecto de OA a partir de 100 nM y por DTX-1 sobre 10 nM, luego de 24 h. Esta diferencia se ilustra en la figura 14 B, al comparar imágenes de la morfología celular luego de incubarlas con OA, DTX-1 y LPS. Los macrófagos activos (células con citoplasma oscuro, rico en procesos celulares) se observan con estímulos de LPS 10 ng/mL, DTX-1 10 nM y OA 100 nM. A su vez, los macrófagos no activados (más espigados y menos densos en su citoplasma), se aprecian en el control negativo y en los estimulados con OA 10 nM. Para el estímulo de DTX-1 100 nM sólo se aprecian grupúsculos de células muertas.



**Figura 14. Efecto de OA y DTX-1 sobre la viabilidad de macrófagos intraperitoneales.**  
 A: Cuantificación de la viabilidad de macrófagos intraperitoneales con estímulos de OA o DTX-1 a diferentes concentraciones, durante 24h, medida por método Alamarblue. \*\*\*  $p < 0,005$ .  
 B: Microscopía de contraste de fase de cultivo de macrófagos intraperitoneales con diferentes estímulos de OA y DTX-1, en comparación al control negativo (0 nM) y positivo (LPS 10 ng/mL). Barra de aumento corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Se analizaron los sobrenadantes de macrófagos intraperitoneales tratados con diferentes concentraciones de OA, DTX-1 y LPS 10 ng/mL para determinar su perfil inmune. Para ello se utilizó el sistema Luminex XMap, midiéndose 32 citoquinas solubles. En las figuras 15, 16, 17, 18, 19 y 20, están agrupados los resultados por citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6), quimioquinas de la familia CxCL (KC, MIP-1, LIX, LIF), quimioquinas de la familia CCL (MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ), factores de crecimiento (C-CSF, VEGF); señales de respuesta innata/adaptativa como INF $\gamma$  e IL-2, y las quimioquinas que se activan con esta señal (MIG, IP-10); y citoquinas anti-inflamatorias como IL-4 y IL-10, respectivamente.

Tanto OA como DTX-1 activan de manera potente la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6, llegando incluso a ser mayor que lo secretado por efecto del LPS en algunas concentraciones. La secreción más alta de estos factores producto de OA ocurre para las concentraciones entre 50-200 nM; y para el caso de DTX-1, la mayor secreción se alcanza a concentraciones 10 veces menores, es decir entre 5 y 10 nM. Se analizaron las diferencias significativas en comparación al control negativo (\*), y entre las toxinas a igual concentración (#). Un resultado similar se obtuvo usando un ELISA comercial para ambas citoquinas (sistema DuoSet, R&D System, USA), validándose así que nuestro resultado no se debe a algo propio de la preparación del cultivo primario ni que tampoco depende de la técnica de detección (figura 15 B).

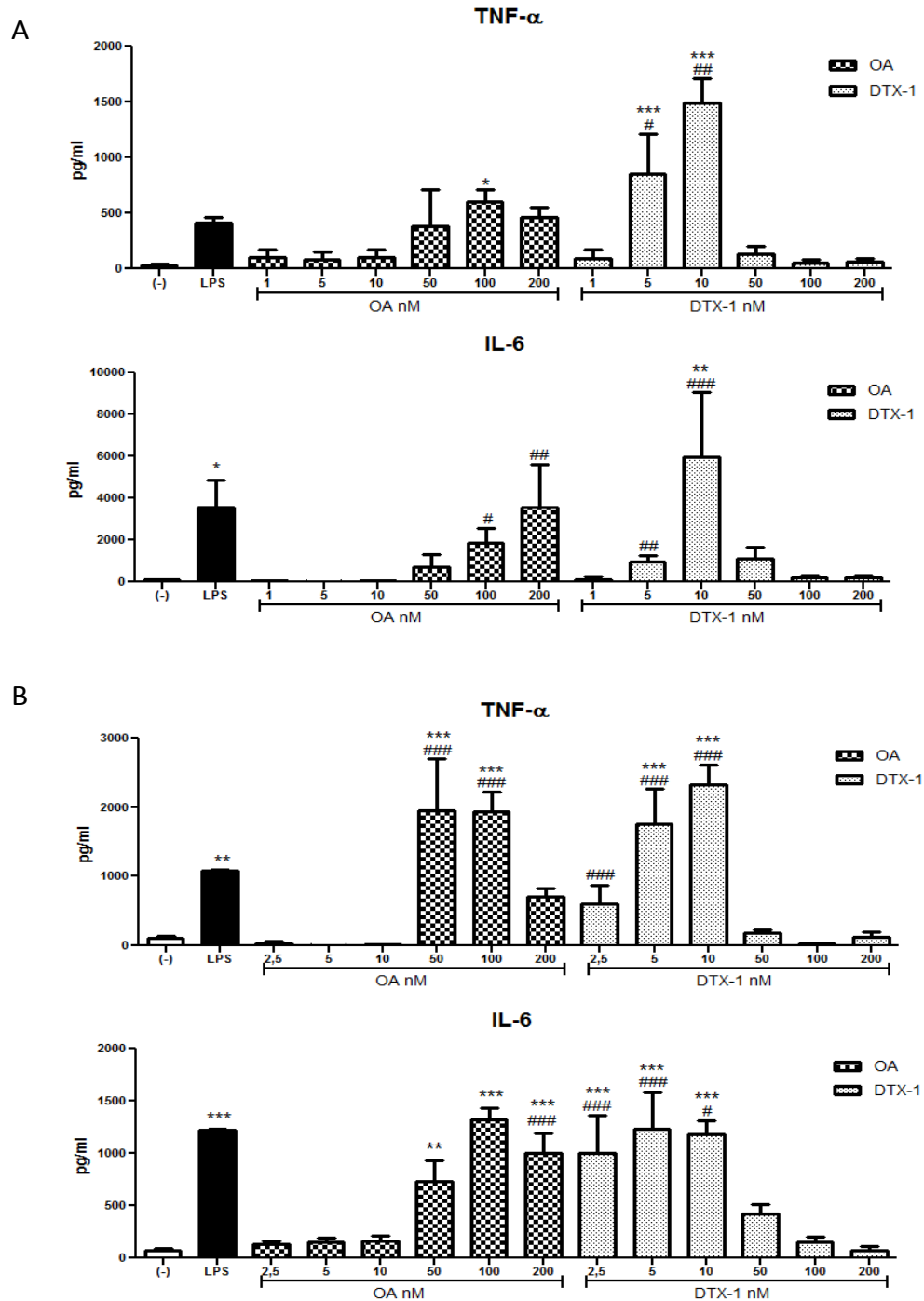
Los resultados se repiten para casi todos los factores pro-inflamatorios estudiados.

Destacamos a algunos de ellos:

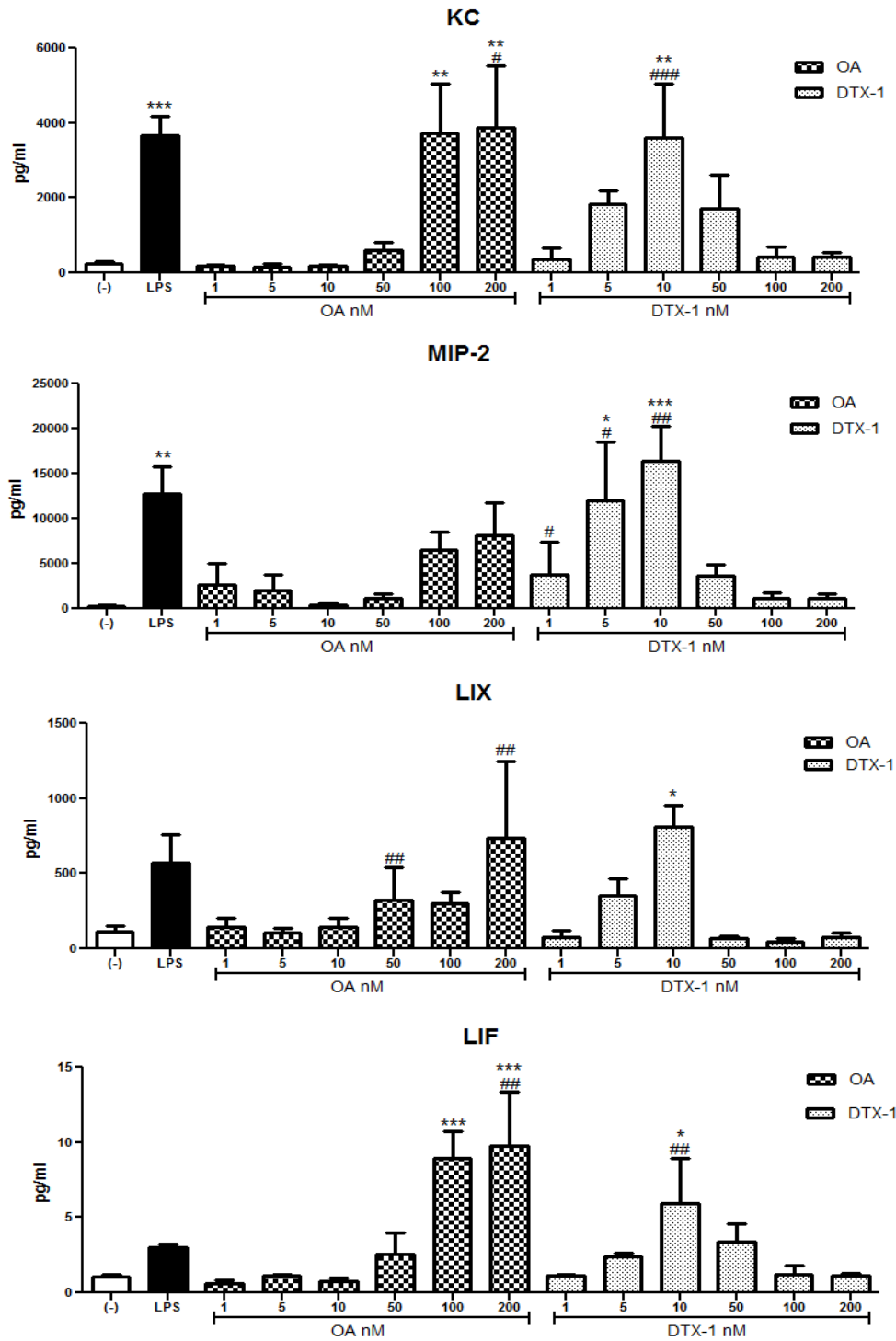
- KC (CXCL1), uno de los principales factores inducibles en inflamación aguda, con una fuerte actividad quimio atrayente de neutrófilos, y participa en procesos de angiogénesis, cicatrización y tumorigénesis (Haghnegahdar *et al.* 2000) (figura 16).
- MIPs (proteínas inflamatorias de macrófagos), secretadas principalmente en respuesta a TNF- $\alpha$ , generan quimioatracción y reclutamiento de leucocitos polimorfo nucleados, células *natural killer* (NK) y monocitos (Broxmeyer *et al.* 1993) (figura 16 y 17).
- MCP-1 (CCL2, proteína quimioatractante de monocitos 1) recluta monocitos, células T de memoria y células dendríticas (DC) a los sitios de la inflamación producidos por cualquiera de lesión tisular o infección. Se ha visto que aumenta por efecto de infección por *H. pylori* y por exposición a OA (Chung *et al.* 2007) (figura 17)
- G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), factor de crecimiento que participa en la maduración de granulocitos a partir de células madres en la médula ósea, pero también promueve supervivencia, proliferación, diferenciación, y maduración de neutrófilos en los sitios de inflamación (Thomas *et al.* 2002) (figura 18).

- VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular) su principal rol es generar vascularización y angiogénesis, pero también participa como quimioattractante de monocitos y granulocitos en procesos inflamatorios. Inhibir su sobre expresión ha sido una de las estrategia para combatir al cáncer gástrico (Park *et al.* 2014).

Para las citoquinas  $INF\gamma$ , IL-4 (figuras 19, 20), e IL17 (datos no mostrados), las cuales determinan tipos diferentes de respuestas inmunes (Th1, Th2 y Th17, respectivamente, ver discusión), no se observan diferencias significativas por efecto de las toxinas del DSP; es decir, no se están gatillando respuestas evolutivamente más finas, que tienen por fin generar activación celular (linfocitos T *helper*, Th1) o respuesta humoral (linfocitos B, Th2).



**Figura 15. Cuantificación de TNF- $\alpha$  e IL-6 por método ELISA y Luminex XMap en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1: A. Método ELISA (N = 3, en triplicado). B: Método Luminex XMap (N = 3, pool de 3 sobrenadantes del cultivo). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005 (diferencias con el control). # p < 0,5, ## p < 0,05; ### p < 0,005 (diferencias entre las toxinas a igual concentración).**



**Figura 16: Cuantificación de quimioquinas de la familia CXCL (KC, MIP-2, LIX y LIF) en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1: Método Luminex XMap (N = 3, pool de 3 sobrenadantes del cultivo). \* p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.005 (diferencias con el control) # p < 0,5, ## p < 0,05; ### p <0,005 (diferencias entre las toxinas a igual concentración).**

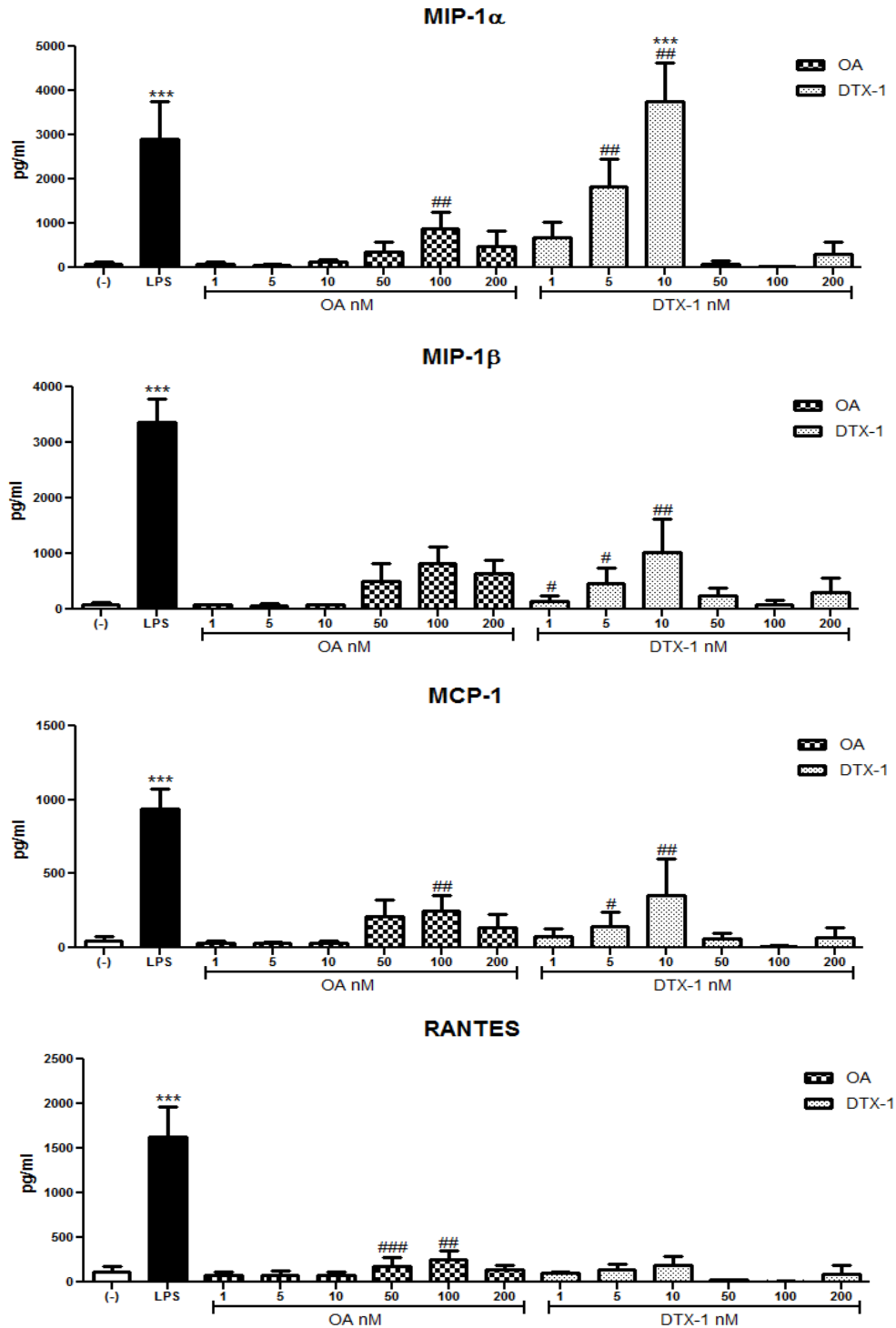
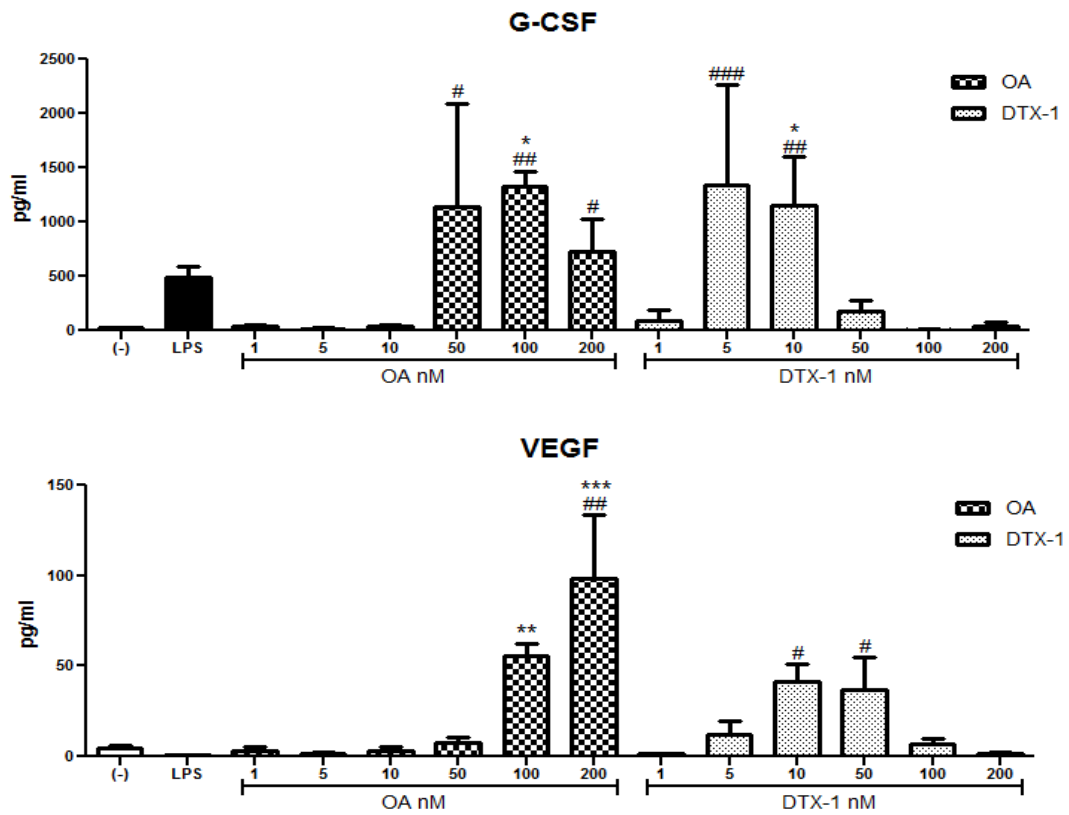
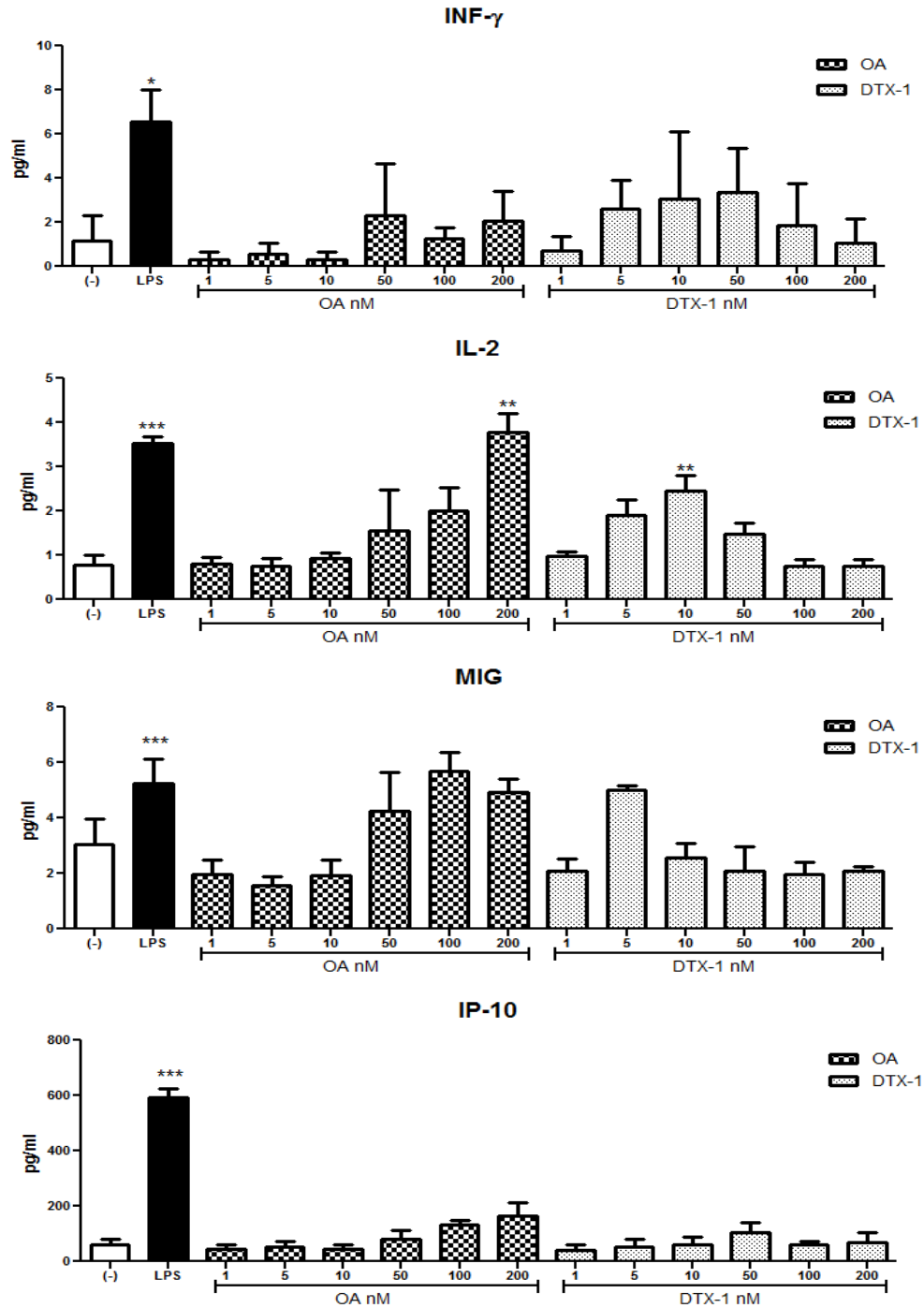


Figura 17: Cuantificación de quimioquinas de la familia CCL (MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , MCP-1 y RANTES) en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1: Método Luminex XMap (N = 3, pool de 3 sobrenadantes del cultivo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.005 (diferencias con el control) # p < 0,5, ## p < 0,05; ### p < 0,005 (diferencias entre las toxinas a igual concentración).

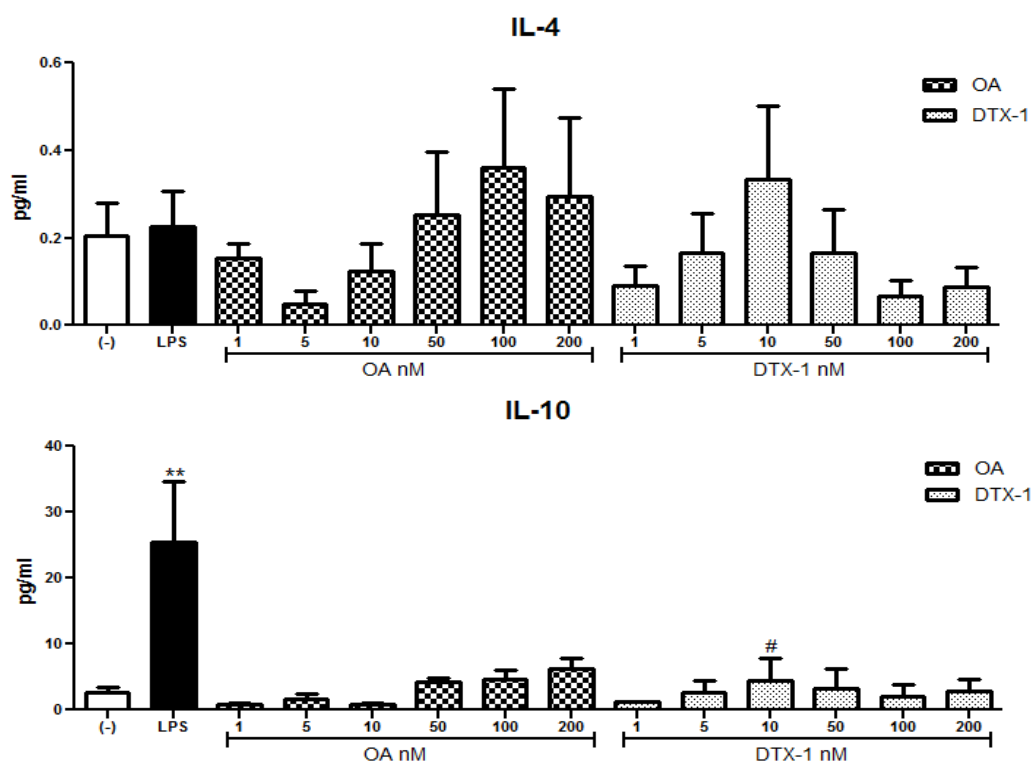




**Figura 18: Cuantificación de factores de crecimiento G-CSF y VEGF en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1.** Por método Luminex XMap (N = 3, pool de 3 sobrenadantes del cultivo). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$  (diferencias con el control) #  $p < 0,5$ , ##  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,005$  (diferencias entre las toxinas a igual concentración).



**Figura 19: Cuantificación de citoquinas INF $\gamma$ , IL-2 y las quimioquinas MIG e IP-10 en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1. Por método Luminex XMap (N = 3, pool de 3 sobrenadantes del cultivo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.005 (diferencias con el control) # p < 0,5, ## p < 0,05; ### p < 0,005 (diferencias entre las toxinas a igual concentración).**

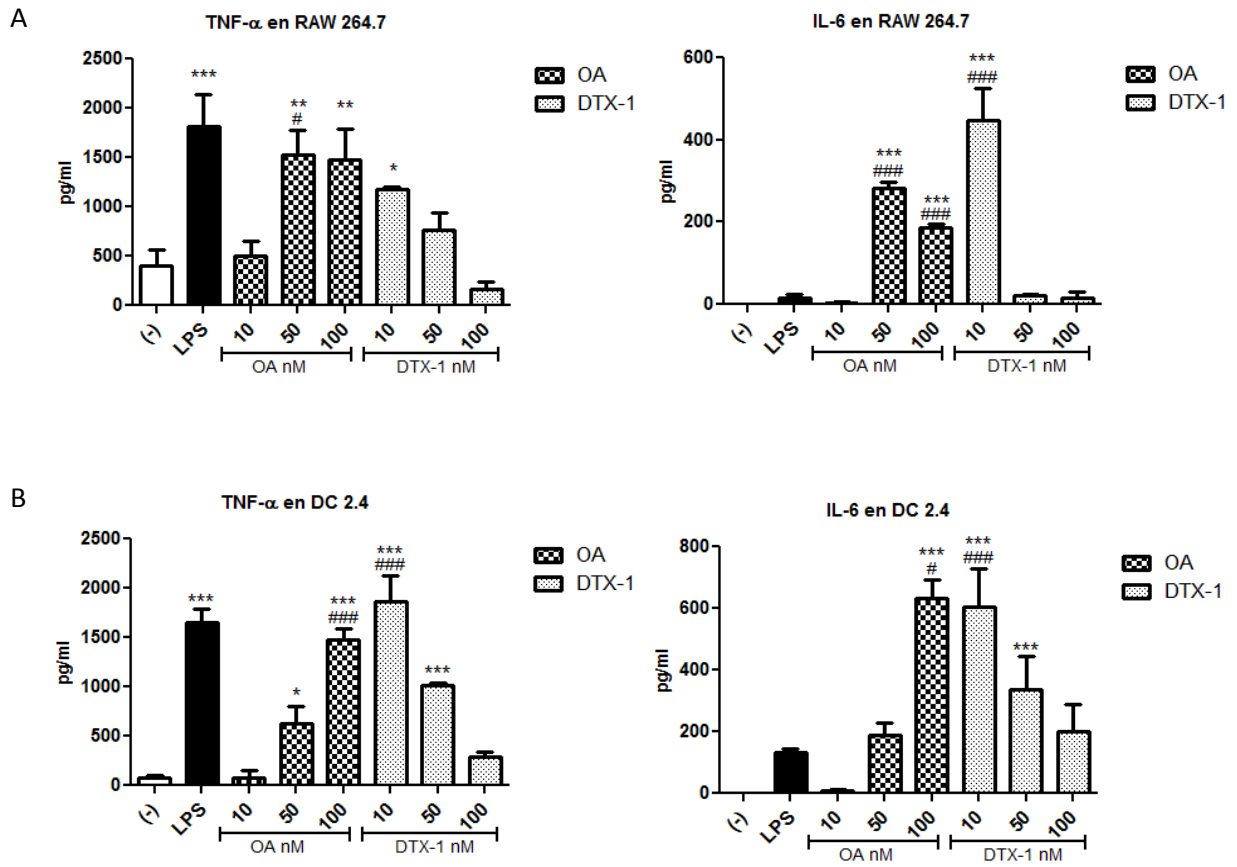


**Figura 20: Cuantificación de citoquinas anti inflamatorias IL-4 e IL-10 en macrófagos intraperitoneales tratados con OA o DTX-1.** Por método Luminex XMap (N = 3, pool de 3 sobrenadantes del cultivo). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$  (diferencias con el control) #  $p < 0,5$ , ##  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,005$  (diferencias entre las toxinas a igual concentración).

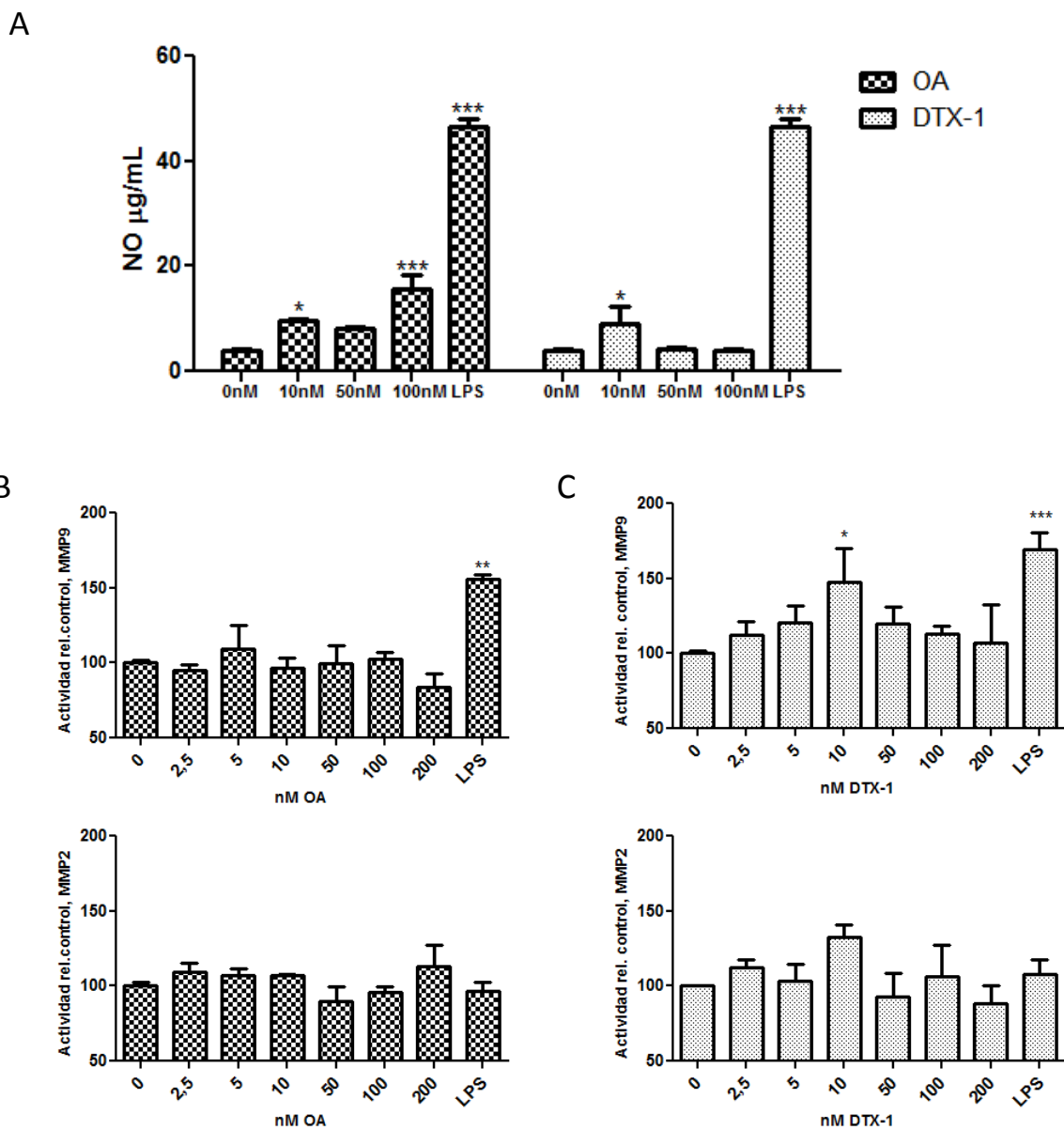
Para analizar si el efecto positivo sobre la secreción de señales pro-inflamatorias de las toxinas del DSP ocurre de manera independiente del modelo de macrófagos utilizado, y si este efecto también sucede en otras células del sistema inmune, usamos las líneas celulares RAW 264.7 (macrófagos de ratón) y DC 2.4 (células dendríticas de ratón). El resultado obtenido fue el mismo que se encontró para los macrófagos intraperitoneales (figura 21), validando de esta forma nuestro modelo y descartando que el aumento en la secreción de los factores inflamatorios sea algo propio de estas células, sino más bien se debe al efecto de las toxinas sobre la señalización que gatilla la transducción y/o secreción de estos factores.

Estudiamos también la secreción de NO y el aumento en la actividad de MMP-2 y MMP-9 por efecto de las toxinas del DSP. NO es un segundo mensajero presente en procesos inflamatorios que favorece la vasodilatación, y es dependiente de la acción de la iNOS, enzima que es inducible por acción de MAPKs (Heo *et al.* 2014). Si bien la cantidad de NO secretado por efecto de las toxinas del DSP fue menor en relación al control positivo (LPS 10 ng/mL), de todas formas se mantiene la tendencia mostrada por las citoquinas pro-inflamatorias (figura 22 A). Tanto MMP-2 como MMP-9 son las metaloproteinasas mejor caracterizadas y ambas están asociadas a la invasión y la formación de metástasis del cáncer gástrico dada su actividad proteolítica de la matriz extracelular (Huang *et al.* 2014). En la figura 22 C se observa un incremento significativo en la actividad de MMP-9 con 10 nM de DTX-1 y una tendencia al aumento en MMP-2 a dosis sub-letales. Por efecto de OA no se observan diferencias significativas en ambas MMPs (figura 22 B).

En resumen, tanto OA como DTX-1, a dosis sub-letales, gatillan una respuesta inflamatoria aguda comandada por  $\text{TNF-}\alpha$ , el cual promueve la secreción de múltiples factores quimioattractantes e inmunomoduladores, así como también moléculas y enzimas pro-inflamatorias como NO y MMP-9, en células del sistema inmune como macrófagos intraperitoneales y células dendríticas.



**Figura 21: Cuantificación de TNF- $\alpha$  e IL-6 en células RAW 264.7 y DC 2.4 tratadas con OA o DTX-1: Por método ELISA en sobrenadantes de células RAW 264.7 (A) y DC 2.4 (B) (N=3, en triplicado).**



**Figura 22: Cuantificación de NO, y actividad de MMP-9 y MMP-2 por efecto de OA y DTX-1 en sobrenadantes de macrófagos intraperitoneales:** (A) Cuantificación de NO por método de Greiss. (B y C) Cuantificación de actividad de MMP-9 y MMP-2 por método electroforético de actividad gelatinasa. Ambos experimentos se trabajaron con N = 3, en triplicado. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.005.

## DISCUSIÓN

Si bien las toxinas del DSP han sido ampliamente descritas como promotores tumorales, siendo relacionadas como un factor de riesgo de contraer cáncer gástrico por algunos autores (Cordier *et al.* 1999; Maneiro *et al.*, 2008), aún se permite su presencia en los alimentos marinos para consumo humano considerándose a todas las toxinas como equivalentes. En los estudios de toxicidad en ratones sólo se han usado concentraciones agudas para analizar los efectos que provocan sobre sus órganos blancos, principalmente el estómago e intestinos, pero aún faltan estudios que relacionen el consumo crónico de estas toxinas con el desarrollo del cáncer. Es por esto que analizamos las consecuencias que generan las principales toxinas del DSP sobre los tejidos y células epiteliales del sistema gástrico, analizando parámetros tumorigénicos en ellas, tales como sobre vida y proliferación, además de estudiar el efecto sobre células del sistema inmune en cuanto a la secreción de factores pro-inflamatorios.

En primer lugar, analizamos los efectos *in vivo*, en ratones, al administrarles una mezcla de toxinas del DSP (OA/ DTX-1 en relación 3:1), para determinar si existe o no acumulación de ellas en sus tejidos blancos (figuras 3 y 5). Aun cuando las dosis de toxina administradas no son extrapolables directamente a una situación de consumo real dado que la matriz orgánica en que se encuentran las toxinas al ser consumidas es muy distinta a entregarlas puras, el hecho de usar concentraciones sub-diarreicas creemos se acerca a lo que ocurre cuando se consumen mariscos que estén dentro de la norma, es decir, en situaciones de



consumo crónico sin que ocurra la sintomatología del DSP. Bajo nuestro punto de vista la diarrea es un mecanismo de defensa frente a las toxinas, y al no ocurrir se podrían estar manteniendo en el sistema a estos promotores tumorales. Aun cuando no pudimos cuantificar la acumulación de las toxinas de manera directa, logramos detectar cambios fisiológicos en los órganos (dilatación, edema, pérdida del epitelio interno) y determinar que a una mayor exposición a las toxinas, mayores fueron los factores pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) en las placas de *Peyer*. El mecanismo planteado por algunos autores por el cual las toxinas del DSP actúan como promotores tumorales es precisamente la capacidad de ellas de activar la secreción de TNF- $\alpha$ , citoquina considerada como factor endógeno tumoral (Komori et al. 1993).

Analizando el efecto de las toxinas del DSP sobre células del epitelio gástrico y de colon, vimos que existe un comportamiento dual en la viabilidad de los cultivos: en un rango de concentraciones (entre 0,5-10 nM aprox. para OA y 0,1-2,5 nM para DTX-1) las células gástricas aumentan su proliferación y a concentraciones mayores éstas mueren. Las células de epitelio de colon mostraron una mayor resistencia frente a las toxinas, probablemente, dada su función excretora, teniendo mayor número de bombas de intercambio en su membrana en comparación a las células de epitelio gástrico (figuras 6 y 8). Si bien el efecto apoptótico de las toxinas del DSP está ampliamente descrito en literatura (Souid-Mensi *et al.* 2008), el efecto positivo sobre la proliferación celular no ha sido estudiado en profundidad. La concentración que determina el comportamiento del cultivo en cuanto a su viabilidad depende del tiempo al cual son expuestas las células: a tiempo cortos (4

h, tiempo que demora el estómago en vaciarse por completo), las células “resisten” mayores concentraciones de toxina (figura 7), al contrario de lo que pasa cuando se exponen a tiempos más largos (figura 10). Sin embargo, en ambos casos observamos aumentos de proliferación cuando la concentración de toxina está en un rango nM.

Para determinar que efectivamente este aumento en la viabilidad de los cultivos se debe a que la tasa mitótica de las células esta aumentada, vimos que la expresión de la ciclina B, último factor inducible del ciclo celular que determina el paso de G2 a mitosis, se aumenta por efecto del OA, incluso en concentraciones en que disminuye la viabilidad del cultivo (figura 11). Esto último nos indica que OA promueve vías de proliferación celular aun cuando en las células se genere una desregulación general capaz de llevarlas a morir, probablemente por la activación de otras vías.

Las toxinas del DSP son inhibidores de PP1 y PP2A, teniendo un  $IC_{50}$  de 0,1-1 ng/mL para PP2A, lo que clasifica a estas toxinas como inhibidores mixtos, dado que no se puede explicar esta alta inhibición sólo por competencia al sustrato (Rivas *et al.* 2000). PP2A es un regulador “maestro” celular ya que participa en múltiples vías de señalización, con una amplia gama de sustratos. Para profundizar en el conocimiento de cómo las toxinas del DSP afectan la señalización celular por inhibición de PP2A, estudiamos la activación de dos enzimas centrales de vías canónicas de supervivencia y proliferación celular como AKT y ERK, las cuales también están consideradas como oncogénicas. Encontramos que la versión activada de

estas enzimas (AKT Fosfo T308 y S473; y ERK1 + ERK2 Y204/187 + T202/185) se ve aumentada en comparación al nivel basal, tanto a concentraciones sub-letales como letales de OA (figura 12). Se sabe que ambas quinasas también participan en apoptosis en células gástricas (Lu *et al.* 2014), por tanto, creemos que el “camino de vida o muerte” que toma la célula depende de la concentración y el tiempo al cual se exponen frente al estímulo.

Estudiamos también el perfil de citoquinas que secretan células del sistema inmune frente a estímulos de OA y DTX-1. Creemos que los macrófagos intraperitoneales son un buen modelo para estudiar esta respuesta, ya que son las células efectoras de la respuesta inflamatoria y son un modelo muy estudiado y bien caracterizado en literatura. Para entender la activación de los macrófagos debemos saber que existen, a grandes rasgos, al menos dos tipos de respuesta dependiendo del ambiente al cual son expuestas estas células, en muchos casos de manera autocrina:

- Activación M1: dependiente de  $\text{INF}\gamma$  solo o concertado con LPS y  $\text{TNF-}\alpha$ , caracterizado por promover una alta presentación antigénica, secreción de IL-12 y IL-23, y alta producción de mediadores tóxicos como NO y ROS.
- Activación M2: dependiente de IL-4, IL-10 y IL-13, generan una “desactivación de la respuesta inflamatoria”, favoreciéndose la regeneración del tejido, por ejemplo, luego de ocurrido el proceso inflamatorio.

Nuestros resultados indican que las toxinas del DSP a dosis sub-letales, a 24 h, activan una respuesta inflamatoria aguda, gatillada por TNF- $\alpha$  e IL-6, los cuales generan secreción de múltiples quimioquinas atrayentes de monocitos (KC, MCP-1, MIPs), de manera muy similar a como ocurre en la inflamación de una herida. Las respuestas de tipo celular o humoral, comandadas por INF $\gamma$  e IL-4 respectivamente, no se activan, probablemente por no estar presente un patógeno al cual presentar. Tampoco se activan señales anti-inflamatorias como IL-10, lo que quizás no ocurre a estos tiempos, ya que TNF- $\alpha$  genera a tiempos prolongados secreción de señales que “apagan” la inflamación (Mantovani et al. 2004).

Resulta interesante que al inhibirse un regulador negativo como PP2A se active de forma tan vigorosa la respuesta inflamatoria. Esto nos habla que el sistema intrínsecamente esta “encendido”, presto a responder frente a un estímulo. Pensando en el mecanismo, resulta más lógico creer que sólo interviniendo en un regulador, como PP2A, el sistema de secreción responde, en vez de generar toda una cascada de fosforilación frente al estímulo. Tampoco podemos descartar que las toxinas del DSP puedan estar inhibiendo (o activando) a otras moléculas, pero a la fecha no se les conoce otros blancos moleculares. Si bien NF $\kappa$ B, IRF-1 y ATF-2 actúan como factores transcripcionales tanto para INF $\gamma$  como para TNF- $\alpha$ , existen variados reguladores génicos como CREB, POU2F1 para INF $\gamma$ ; y c-Fos, p53, AP-1, y c-Jun para TNF- $\alpha$  por nombrar solo algunos (GeneCards) que participan en la transcripción de estos genes, los cuales también se activan por procesos de fosforilación/desfosforilación. Creemos que en esta regulación fina, podrían estar

actuando las toxinas del DSP a través de la inhibición de PP2A, determinando el perfil de citoquinas y quimioquinas secretadas.

Desde el punto de vista de las toxinas del DSP, resulta notable la diferencia entre OA y DTX-1 en cuanto a la potencia para activar la respuesta inflamatoria. Mientras OA genera mayor secreción de los factores inflamatorios a 100 nM aprox, DTX-1 lo hace con concentraciones diez veces menores. En ambos casos, son concentraciones sub-letales.

La única diferencia química entre estas toxinas es un grupo metilo en la posición C35 (ver figura 1). Pensamos que las diferencias de toxicidad y de activación de las señales pro-inflamatorias, pueden deberse a diferencias en las constantes de inhibición a PP2A. En literatura se encuentran valores variables de estas constantes (K<sub>i</sub> OA/DTX-1: 1,6 (Takai *et al.* 1992); 4,2 (Rivas *et al.* 2000); 1,1 y 0,9 para PP2A *wild type* y recombinante (Garibo *et al.* 2013); y 1,6-2,4 (Munday *et al.* 2013). Creemos que pequeñas diferencias en la inhibición de la PP2A, pueden significar cambios drásticos. Análisis cristalográficos del sitio activo de PP2A unido a OA, nos permiten proyectar el efecto que tendría el grupo metilo de DTX-1, el cual encaja en un sector de aminoácidos hidrofóbicos (Trp 200, Ile 123), lo cual explicaría su mayor capacidad inhibitoria (Xing *et al.* 2006)

Otro aspecto que podría explicar la mayor toxicidad de DTX-1 en comparación con OA, es que posea una mayor capacidad de incorporarse en las células. PP2A es una enzima citosólica por lo que las toxinas deben traspasar la membrana para poder ejercer su efecto inhibitorio. Varios estudios han determinado que OA puede

asociarse consigo misma, formando dímeros o tetrámeros, dependiendo de la presencia y cantidad de iones  $K^+$  en el medio, y que es en esta conformación que ingresa a las células (Daranas *et al.* 2007). Si bien no existen estudios de dimerización con DTX-1, hipotetizamos que su grupo metilo aumenta la capacidad de formar complejos, dado el incremento de hidrofobicidad, facilitándose así su incorporación en las células. Realizamos estudios para comprobar si DTX-1 ingresa en mayor cantidad en comparación a OA, pero dadas las bajas concentraciones y su efecto apoptótico, sumado a las dificultades de derivatizar toxinas con matrices orgánicas para su detección por HPLC, no pudimos obtener un resultado que explique esta hipótesis. Sin embargo, nuestros resultados demuestran de manera clara y contundente que DTX-1 presenta diez veces mayor toxicidad que OA, por lo que creemos no deberían ser consideradas toxinas equivalentes en nuestra legislación, sobre todo si es la principal toxina del DSP detectada en nuestro país. Además, nuestros resultados indican que efectivamente las toxinas del DSP generan un ambiente tumorigénico a concentraciones sub-letales, concentraciones que son permitidas en los mariscos. Creemos que nuestro trabajo entrega antecedentes suficientes como para que nuestra legislación limite a cero la presencia de toxinas del DSP en nuestros alimentos o para que, al menos, se regulen los factores de toxicidad según parámetros fisiológicos como los expuestos en esta tesis.

En la figura 23, se muestra un esquema con las principales conclusiones de este trabajo. Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten concluir que se cumple la hipótesis planteada, ya que las toxinas del DSP generan un ambiente tumorigénico en sus células blanco (epitelios gástricos y de colon) al aumentar la

proliferación celular, activar vías de señalización de supervivencia y proliferación como AKT y ERK (quinasas consideradas como oncogénicas) y al estimular en las células del sistema inmune que comandan la respuesta inflamatoria factores como TNF- $\alpha$  e IL-6, además de quimioquinas dependientes de estos factores, como MIP's y KC. Establecimos que estos efectos deletéreos ocurren a concentraciones sub letales, y es justamente a estas concentraciones que la legislación internacional permite el consumo de mariscos contaminados con toxinas del DSP. Es por ello que creemos que esta tesis no sólo aporta con conocimiento y desarrollo de la ciencia básica, sino también pensamos que puede ser un aporte en el establecimiento de leyes más restrictivas en cuanto a la presencia de las toxinas del DSP en los alimentos marinos.

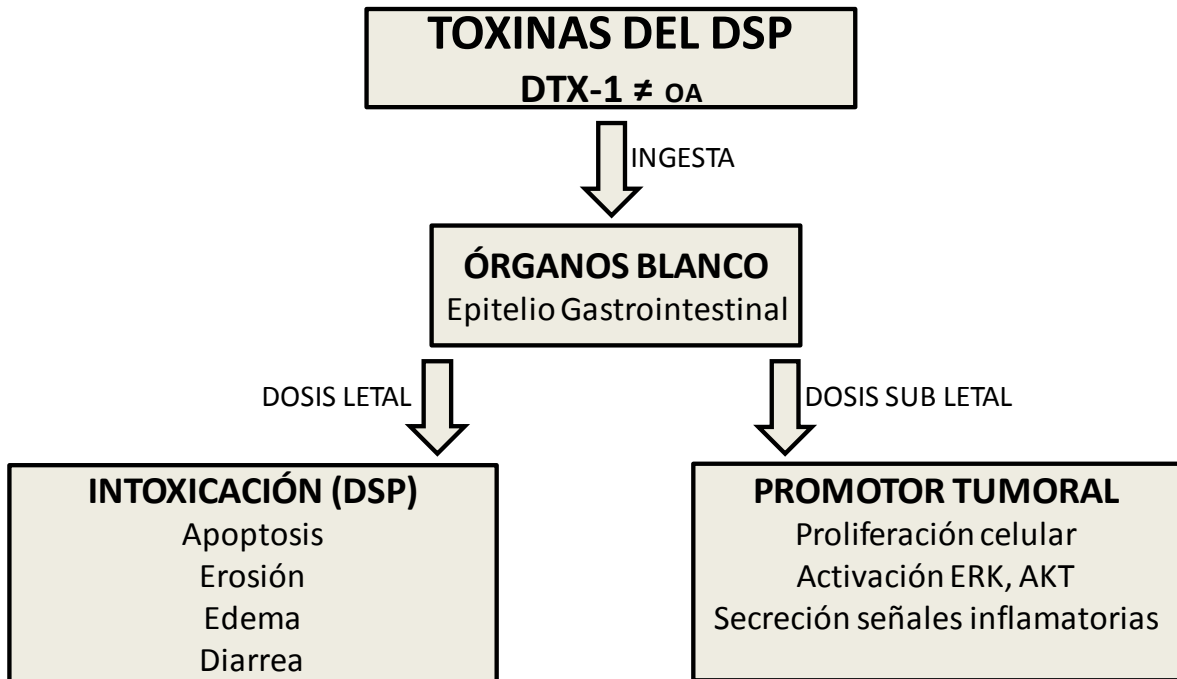


Figura 23: Esquema conclusiones generales.



## BIBLIOGRAFÍA

**Arnold HK**, Sears RC. A tumor suppressor role for PP2A-B56 alpha through negative regulation of c-Myc and other key oncoproteins. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2008, 27, 147-158.

**Baharians Z**, Schönthal AH. Reduction of Ha-ras-induced cellular transformation by elevated expression of protein phosphatase type 2A. *Molecular Carcinogenesis*. 1999, 24, 246-254.

**Broxmeyer HE**, Sherry B, Cooper S, Lu L, Maze R, Beckmann MP, Cerami A, Ralph P. Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells. Interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression. *Journal of Immunology*, 1993, 150, 3448-3458.

**Chung HW**, Lim JB. Role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, 20, 1667-1680

**Chung HY**, Cha B, Kim H. Inhibition of serine-threonine protein phosphatases in monocyte chemoattractant protein-1 expression in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric epithelial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007, 1095, 220-227.

**del Campo M**, Toledo H, Lagos N. Okadaic acid toxin at sublethal dose produced cell proliferation in gastric and colon epithelial cell lines. *Marine Drugs*. 2013, 11, 4751-4760.

**Daranas AH**, Cruz PG, Creus AH, Norte M, Fernández JJ. Self-assembly of okadaic acid as a pathway to the cell. *Organic Letters*. 2007, 9, 4191-4194.

**Domínguez HJ**, Paz B, Daranas AH, Norte M, Franco JM, Fernández JJ. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicon*. 2010, 56, 191-217.

**EFSA Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain**. Opinion on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish -okadaic acid and analogues. *The EFSA Journal*. 2008, 589, 1-62.

**Eissa S**, Ng A, Siaj M, Tavares AC, Zourob M. Selection and identification of DNA aptamers against okadaic acid for biosensing application. *Analytical Chemistry*. 2013, 85, 11794-11801.

**Ellington AD**, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990, 346, 818-822.

**Espiña B**, Louzao MC, Cagide E, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM. The methyl ester of okadaic acid is more potent than okadaic acid in disrupting the actin cytoskeleton and metabolism of primary cultured hepatocytes. *British Journal of Pharmacology*. 2010, 159, 337-344.

**Fernández DA**, Louzao MC, Fraga M, Vilariño N, Vieytes MR, Botana LM. Experimental basis for the high oral toxicity of dinophysistoxin 1: a comparative study of DSP. *Toxins (Basel)*. 2014, 6, 211-228.

**Fisher D**, Krasinska L, Coudreuse D, Novák, B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *Journal of Cell Science*. 2012, 125, 4703-4711.

**Fujiki H**, Sueoka E, Suganuma M. Tumor promoters: from chemicals to inflammatory proteins. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2013, 139, 1603-1614.

**García C**, Mardones P, Sfeir A, Lagos N. Simultaneous presence of paralytic and diarrhetic shellfish poisoning toxins in *Mytilus chilensis* samples collected in the Chiloé Island, austral Chilean fjords. *Biological Research*. 2004a, 37, 721-731.

**García C**, González V, Cornejo C, Palma-Fleming H, Lagos N. First evidence of dinophysistoxin-1 ester and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked bivalves collected in the Patagonia fjords. *Toxicon*. 2004b, 43, 121-131.

**García C**, Truan D, Lagos M, Santelices JP, Díaz JC, Lagos N. Metabolic transformation of dinophysistoxin-3 into dinophysistoxin-1 causes human intoxication by consumption of O-acyl-derivatives dinophysistoxins contaminated shellfish. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2005, 30, 287-296.

**García C**, Schonstedt V, Santelices JP, Lagos N. High amount of dinophysistoxin-3 in *Mytilus chilensis* collected in Seno de Reloncaví, Chile, during massive human intoxication associated with outbreak of *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2006, 31, 305-314.

**Garibo D**, de la Iglesia P, Diogène J, Campàs M. Inhibition equivalency factors for dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 in protein phosphatase assays: applicability to the analysis of shellfish samples and comparison with LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61, 2572-2579

**GeneCards**, [www.genecards.org](http://www.genecards.org)

**Guénin S**, Schwartz L, Morvan D, Steyaert JM, Poignet A, Madelmont JC, Demidem A. PP2A activity is controlled by methylation and regulates oncoprotein expression in melanoma cells: A mechanism which participates in growth inhibition induced by chloroethylnitrosourea treatment. *International Journal of Oncology*. 2008, 32, 49–57.

**Guzmán L**, Campodonico I. Marea roja en la región de Magallanes. *Publ. Inst. Pat. Ser. Mon.* 1975, 9, 44.

**Heo SJ**, Jang J, Ye BR, Kim MS, Yoon WJ, Oh C, Kang DH, Lee JH, Kang MC, Jeon YJ, Kang SM, Kim D, Kim KN. Chromene suppresses the activation of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Food and Chemical Toxicology* 2014, 67, 169-175.

**James KJ**, Carey B, O'Halloran J, van Pelt, FN, Skrabakova Z. Shellfish toxicity: human health implications of marine algal toxins. *Epidemiology and Infection*. 2010, 138, 927-940.

**Jayaraj R**, Gupta N, Rao PV. Multiple signal transduction pathways in okadaic acid induced apoptosis in HeLa cells. *Toxicology*. 2009, 256, 118-127.

**Kawahara Y**, Nakase Y, Isomoto Y, Matsuda N, Amagase K, Kato S, Takeuchi K. Role of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)-dependent macrophages in gastric ulcer healing in mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2011, 62, 441-448.

**Komori A**, Yatsunami J, Suganuma M, Okabe S, Abe S, Sakai A, Sasaki K, Fujiki H. Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Research*. 1993, 53, 1982-1985

**Lagos, N.** Microalgal blooms: a global issue with negative impact in Chile. *Biological Research*. 1998, 31, 375- 386.

- Lauridsen LH**, Veedu RN. Nucleic acid aptamers against biotoxins: a new paradigm toward the treatment and diagnostic approach. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2012, 22, 371-379.
- Lee JS**, Igarashi T, Fraga S, Dahl E, Hovgaard P, Yasumoto T. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of Applied. Phycology*. 1989, 1, 147–152.
- Leira F**, Álvarez C, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM. Study of cytoskeletal changes induced by okadaic acid in BE(2)-M17 cells by means of a quantitative fluorimetric microplate assay. *Toxicology In Vitro*. 2001, 15, 277-282.
- Lembeye G**, Yasumoto Y, Zhao J, Fernández R. DSP Outbreak in Chilean Fjords. In *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*; Smayda, T.J., Shimizu, Y., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1993; pp. 525–529.
- Letourneux C**, Rocher G, Porteu F. B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *EMBO Journal*. 2006, 25, 727–738.
- Lu Y**, Zhu M, Chen W, Yin L, Zhu J, Chen N, Chen W. Oleanolic acid induces apoptosis of MKN28 cells via AKT and JNK signaling pathways. *Pharmaceutical Biology*. 2014, 52, 789-795.
- Manerio E**, Rodas VL, Costas E, Hernández JM. Shellfish consumption: A major risk factor for colorectal cancer. *Medical Hypotheses*. 2008, 70, 409–412.
- Mantovani A**, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. 2004, 25, 677-686.
- McConnell EL**, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J Pharm Pharmacol*. 2008, 60, 63-70.
- Munday R**. Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic acid in animals? *Toxins (Basel)*. 2013, 5, 267-285.
- Park DJ**, Thomas NJ, Yoon C, Yoon SS. Vascular Endothelial Growth Factor A Inhibition in Gastric Cancer. *Gastric Cancer*. 2014, 4.
- Picot C**, Nguyen TA, Roudot AC, Parent-Massin D. A preliminary risk assessment of human exposure to phycotoxins in shellfish: a review. *Human and Ecological Risk Assessment International Journal*. 2011, 17, 328–366.
- Murata M**, Shimatani M, Sugitani H, Oshima Y, Yasumoto T. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 1982, 48, 549–552
- Ray P**, White RR. Aptamers for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceuticals*. 2010, 3, 1761-1778.
- Reguera B**, Riobó P, Rodríguez F, Díaz PA, Pizarro G, Paz B, Franco JM, Blanco J. Dinophysins toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine Drugs*. 2014, 12, 394-461.

**Rivas M**, García C, Liberona JL, Lagos N. Biochemical characterization and inhibitory effects of dinophysistoxin-1, okadaic acid and microcystine 1-r on protein phosphatase 2a purified from the mussel *Mytilus chilensis*. *Biological Research*. 2000, 33, 197-206

**Sérandour AL**, Ledreux A, Morin B, Derick S, Augier E, Lanceleur R, Hamlaoui S, Moukha S, Furger C, Biré R, Krysz S, Fessard V, Troussellier M, Bernard C. Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part I: screening strategy and pre-validation study with lipophilic marine toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, 403, 1983-1993.

**Sernapesca**: Estadísticas Servicio Nacional de Pesca y Agricultura (1998-2008): [http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_remository&Itemid=54&func=fileinfo&id=3496](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=54&func=fileinfo&id=3496)

**Soud-Mensi G**, Moukha S, Mobio TA, Maaroufi K, Creppy EE. The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicol*. 2008, 51, 1338-1344.

**Stoltenburg R**, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX: A (r)evolutionary method to generate high affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*. 2007, 24, 381–403.

**Takai A**, Murata M, Torigoe K, Isobe M, Mieskes G, Yasumoto T. Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship. *Biochemical Journal*. 1992, 284, 539–544.

**Thomas J**, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Current Opinion in Hematology*. 2002, 9, 183–189.

**Thompson EJ**, MacGowan J, Young MR, Colburn N, Bowden GT. A dominant negative c-jun specifically blocks okadaic acid-induced skin tumor promotion. *Cancer Research*, 2002, 62, 3044-3047.

**Westermarck J**, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends in Molecular Medicine*. 2008, 14, 152-160.

**Xing H**, Hwang K, Li J, Torabi SF, Lu Y. DNA aptamer technology for personalized medicine. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2014, 4, 79-87.

**Xing Y**, Xu Y, Chen Y, Jeffrey PD, Chao Y, Lin Z, Li Z, Strack S, Stock JB, Shi Y. Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*. 2006, 127, 341-353.

**Yasumoto T**, Fukui M, Sasaki K, Sugiyama K. Determinations of marine toxins in foods. *Journal of AOAC International*. 1995, 78, 574-582.

**Yuasa H**, Yoshida K, Iwata H, Nakanishi H, Suganuma M, Tatematsu M. Increase of labeling indices in gastrointestinal mucosae of mice and rats by compounds of the okadaic acid type. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1994, 120, 208-212.

**Zhong TY**. Patrón de expresión de citoquinas y quimioquinas de células presentadoras de antígeno murinas en respuesta a estímulos in vitro con hemocianinas de moluscos. 2014. Memoria de Magister en Bioquímica. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 51p.



Article

## Okadaic Acid Toxin at Sublethal Dose Produced Cell Proliferation in Gastric and Colon Epithelial Cell Lines

Miguel del Campo <sup>1</sup>, Héctor Toledo <sup>2</sup> and Néstor Lagos <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Membrane Biochemistry, Program of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, University of Chile, Independencia 1027, Correo 7, Santiago 8380000, Chile; E-Mail: Miguel.delcampo@fucited.cl

<sup>2</sup> Laboratory of Molecular Microbiology, Program of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Chile, Independencia 1027, Correo 7, Santiago 8380000, Chile; E-Mail: htoledo@med.uchile.cl

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: nlagos@med.uchile.cl; Tel./Fax: +56-02-2978-6309.

Received: 31 August 2013; in revised form: 29 October 2013 / Accepted: 12 November 2013 / Published: 2 December 2013

---

**Abstract:** The aim of this study was to analyze the effect of Okadaic Acid (OA) on the proliferation of gastric and colon epithelial cells, the main target tissues of the toxin. We hypothesized that OA, at sublethal doses, activates multiple signaling pathways, such as Erk and Akt, through the inhibition of PP2A. To demonstrate this, we carried out curves of doses and time response against OA in AGS, MKN-45 and Caco 2 cell lines, and found an increase in the cell proliferation at sublethal doses, at 24 h or 48 h exposure. Indeed, cells can withstand high concentrations of the toxin at 4 h exposure, the time chosen considering the maximum time before total gastric emptying. We have proved that this increased proliferation is due to an overexpression of Cyclin B, a cyclin that promotes the passage from G2 to mitosis. In addition, we have demonstrated that OA induces activation of Akt and Erk in the three cells lines, showing that OA can activate pathways involved in oncogenesis. In conclusion, this study contributes to the knowledge about the possible effects of chronic OA consumption.

**Keywords:** okadaic acid; gastric cancer; colon cancer; PP2A; proliferation

---

## 1. Introduction

Okadaic acid (OA) is the principal component of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins [1]. The symptomatology of DSP is developed within 30 min to 6 h after contaminated bivalve consumption and includes diarrhea (60%), nausea (46%), vomiting (31%), and abdominal pain (77%). In addition, it generates loss of epithelial integrity, erosion and hypersecretion in the intestines and increases the paracellular permeability. If the level of intoxication is mild, the syndrome evolves favorably toward total recovery in two to three days [2,3]. While there are no records of death, these toxins have been widely described as tumor promoters [4]. In fact, it has been speculated that consumption of seafood in areas where red tide is endemic increases the risk of gastro-intestinal cancer [5]. Currently, European standard maximum levels for total DSP toxins, cannot exceed 160 µg OA equivalent/kg shellfish meat [1]. Therefore, it is permitted to consume DST in chronically at low concentrations.

OA is a potent inhibitor against Ser/Thr Protein Phosphatase 2A (PP2A) and Protein Phosphatase 1 (PP1), with an IC<sub>50</sub> of 0.1–1 ng/mL for PP2A and 100-fold higher IC<sub>50</sub> for PP1 [6]. The PP2A plays a key role in the regulation of major cell metabolic pathways, such as translation, transcription and control of transition from G<sub>2</sub> to the M phase of the cell cycle; it is a tumor suppressor protein and a positive regulator of apoptosis [7]. Through the inhibition of PP2A, OA generates cellular hyperphosphorylation, which can activate multiple signaling pathways, including the expression and secretion of inflammatory agents that can act as endogenous tumor promoters such as TNF-α [8]. Experimentally, it has been demonstrated that repeated exposure of OA induces tumor formation in mouse skin, glandular stomach and rat liver [4]. While OA has been reported to increase cell proliferation [9,10], it is unknown whether it has the same effect on the gastric epithelium, the main target following oral administration of the toxin after acute doses [11–13]. Indeed, this effect is contradictory to its broad description as toxic agent, able to arrest the mitotic cycle, form DNA adducts and activate Caspases 3, 8 and 9, in many cell lines [14–17].

We hypothesize that the dual effect of OA is dose and time exposure dependent and that it activates cell proliferation signaling at sublethal doses. For this, the effect of OA on the viability of two models of gastric epithelium (AGS and MKN-45) and colon epithelium (Caco 2) was analyzed, studying the expression of Cyclin B1, a cyclin that promotes the passage from G<sub>2</sub> to mitosis [18], and the activation of Akt and Erk, two canonical pathways of cell survival and proliferation, that are regulated by PP2A [19,20]. It is postulated that OA, in sublethal doses, can promote cellular proliferation and activate oncogenic pathways.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. OA Generate Cellular Proliferation at Sublethal Doses in Gastric and Colon Epithelium

The effect of OA on cell proliferation was analyzed in AGS, MNK-45 and Caco 2 cell lines, for 24 h or 48 h. For this, two different methodologies were used: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and AlamarBlue Cell Viability Assay. No substantial differences were observed between AlamarBlue (Figure 1A,C,E) and MTT assay (data not shown). To display easier cell proliferation to sublethal concentrations, a bar chart with the significant differences

is shown (Figure 1B,D,F). To see this effect during longer periods, we used Tripan blue exclusion for seven days (Figure 1G,H,I). Sublethal concentrations showed an increase in the cell proliferation, which in some cases was significant. At concentrations equal to or greater than 10 nM, at longer durations, cells tended to decrease or equate with the control. It was difficult to observe significant differences in this experiment due to the high proliferative rate of these cell lines or to the method limitations. Interestingly, gastric epithelial cells had a similar behavior, but not Caco 2, which showed increased resistance to toxicity of OA, compared with AGS and MKN-45, proving that the cytotoxicity and genotoxicity of OA are cell-line dependent [21].

**Figure 1.** Effect of Okadaic Acid (OA) treatment on cell proliferation. AGS (A), MKN-45 (B) and Caco 2 (C) were incubated for 24 h or 48 h with different concentrations of OA, and the proliferation was measured by AlamarBlue cell viability assay. In B, D–F, the chart bars show significant differences compared to the control ( $N = 12$ ). G–I show the effect of treatment with OA for 7 days, in AGS, MKN-45 and Caco 2, respectively, using the Trypan blue method exclusion ( $N = 8$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ .

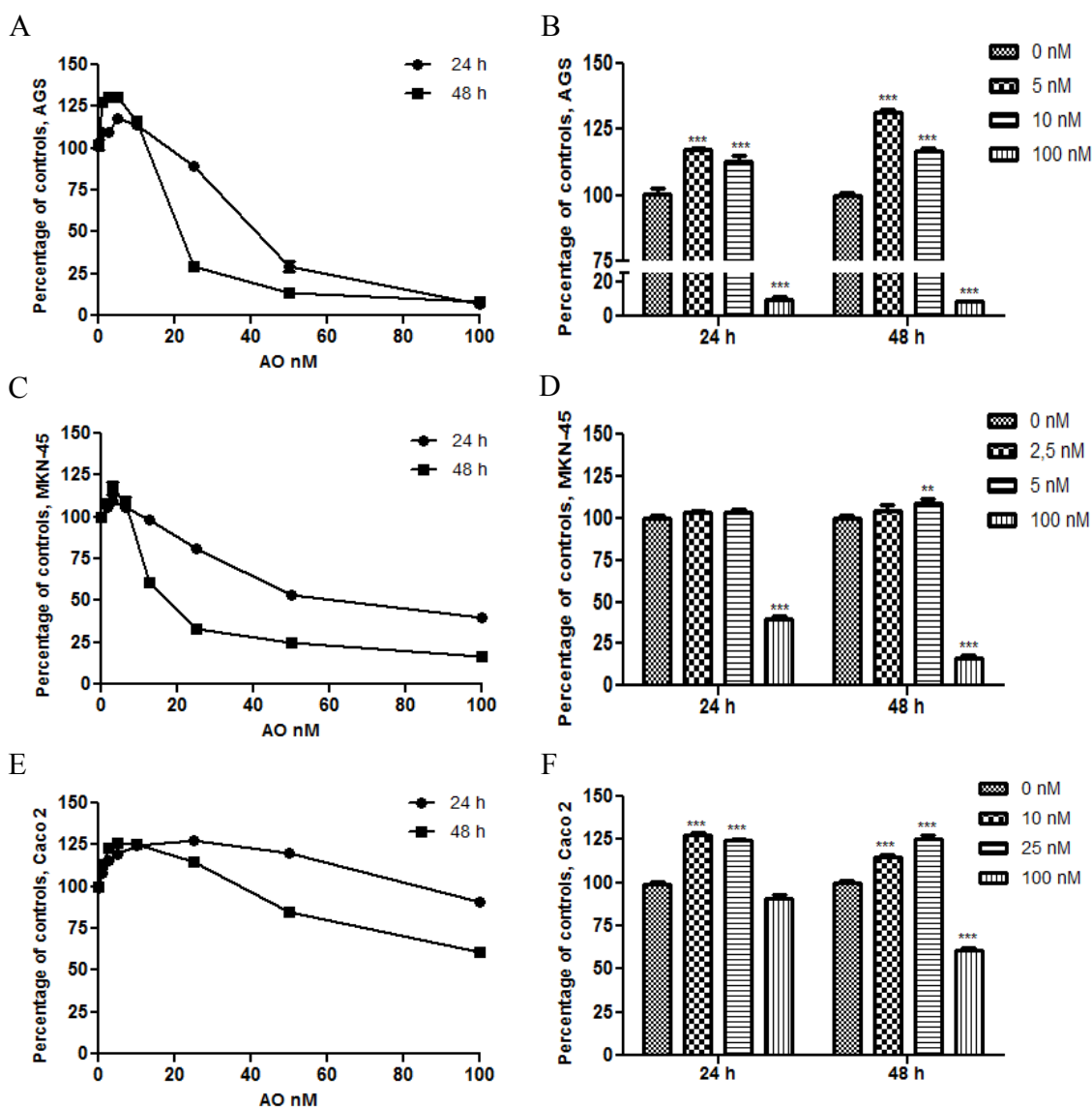
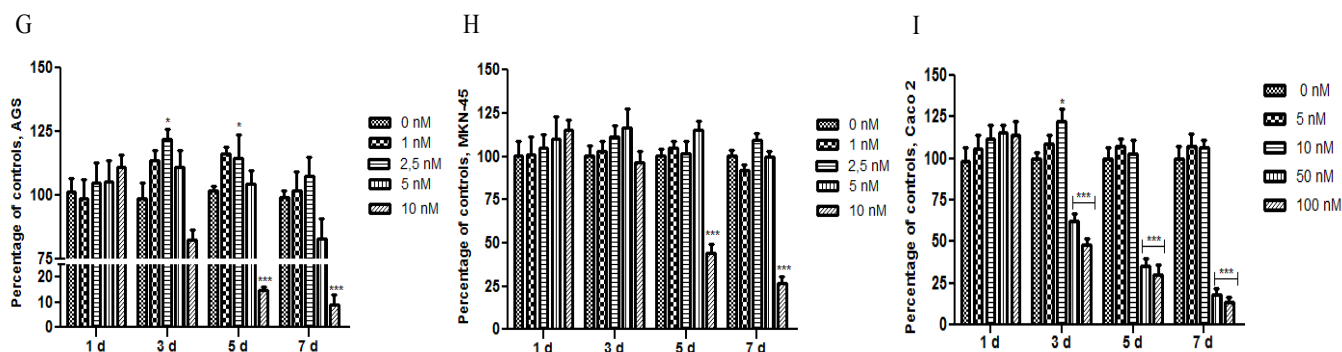


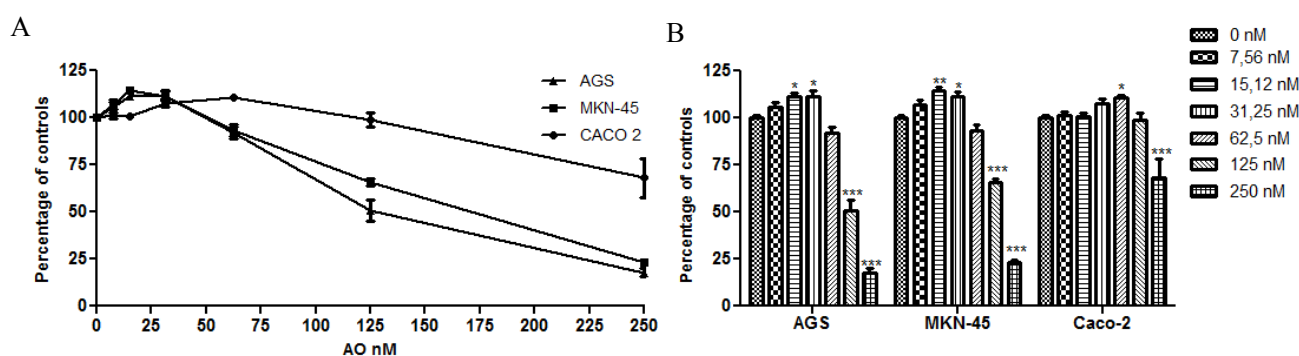


Figure 1. Cont.



In order to see the effects of OA on cell proliferation in a more close physiological condition, the cells were exposed for 4 h to the toxin, a point in time at which the stomach presents a complete emptying of the food meal [22], and was analyzed at 48 h. As the with previous results, the cultures showed an increase in cell proliferation at sublethal concentrations, with Caco 2 being more resistant to the toxicity of OA. In fact, the cultures can withstand higher concentrations and remain viable compared with no pulse experiment (Figure 2). These results demonstrate that gastric and colon epithelia can be exposed to lethal levels of OA for short periods of time without activating cellular death, increasing the risk of acting as a tumor promoter.

**Figure 2.** Effect of OA treatment for 4 h on cell viability. The viability was analyzed using the Alamarblue method. The three cell lines show increased resistance to the toxicity of OA with Caco 2 being the most resistant. In **B**, the chart bar shows the significant differences compared to the control ( $N = 12$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ .

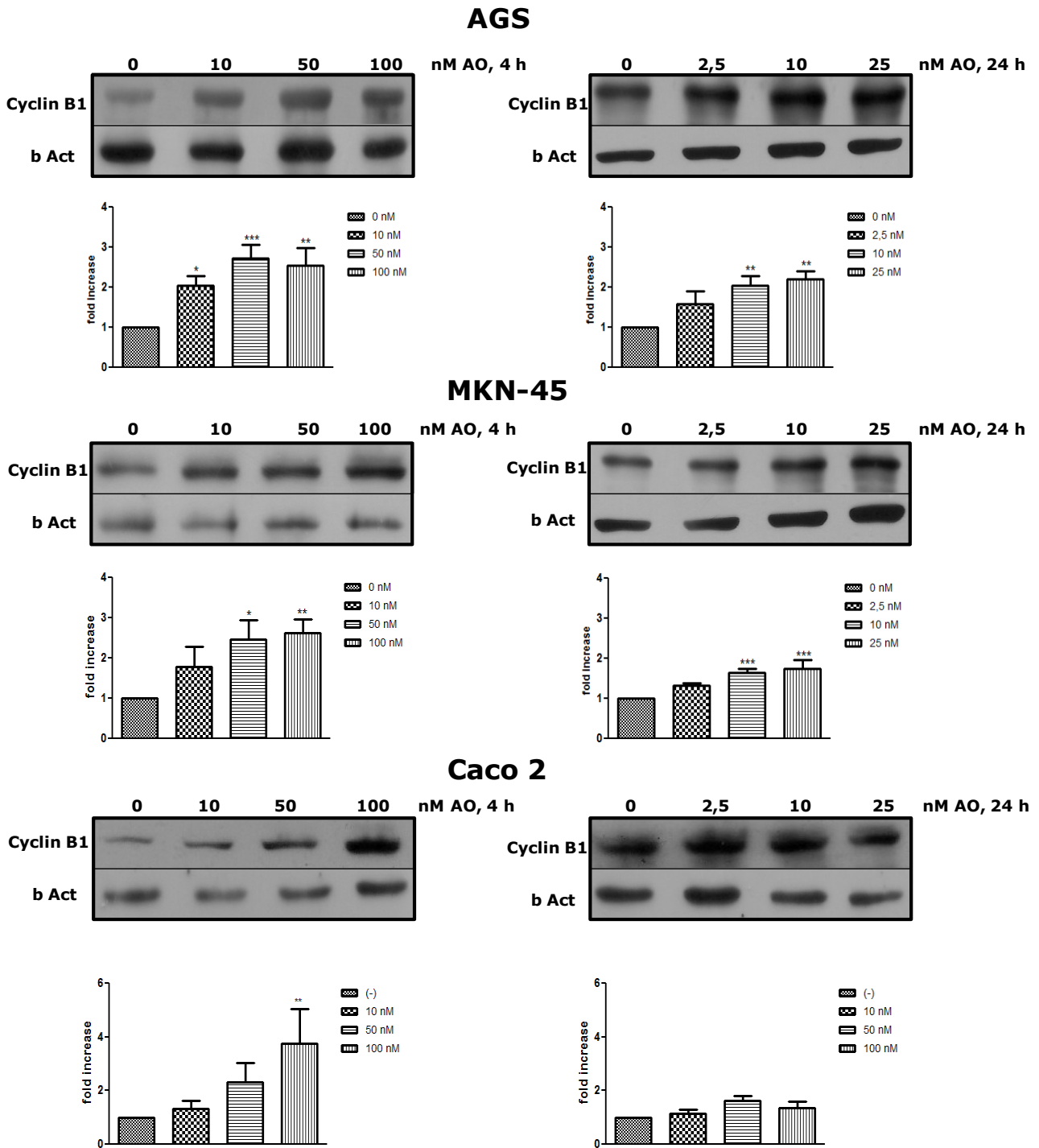


### 2.2. Overexpression of Cyclin B as an OA Effect

To prove that OA can increase the cell mitotic rate at sublethal concentrations, the expression of Cyclin B was analyzed. After treatment for 4 h or 24 h with OA at different concentrations, Cyclin B increased its expression in the three cells lines, with a dose response effect, even at concentrations in which culture viability was lower (Figure 3). This latter result is interesting since the cells have the input signal to the mitotic cycle; however, deregulation produced by OA could activate apoptosis or other forms of cell death. For the three cell lines, the increase in expression was greater at 4 h than at 24 h, the time at which the cells tend to normalize in respect to the control. The expression of Cyclin B

is regulated for multiple pathways, most of them deactivated by PP2A [18]. Therefore, OA would intensify inductive signals of Cyclin B, through inhibition of PP2A.

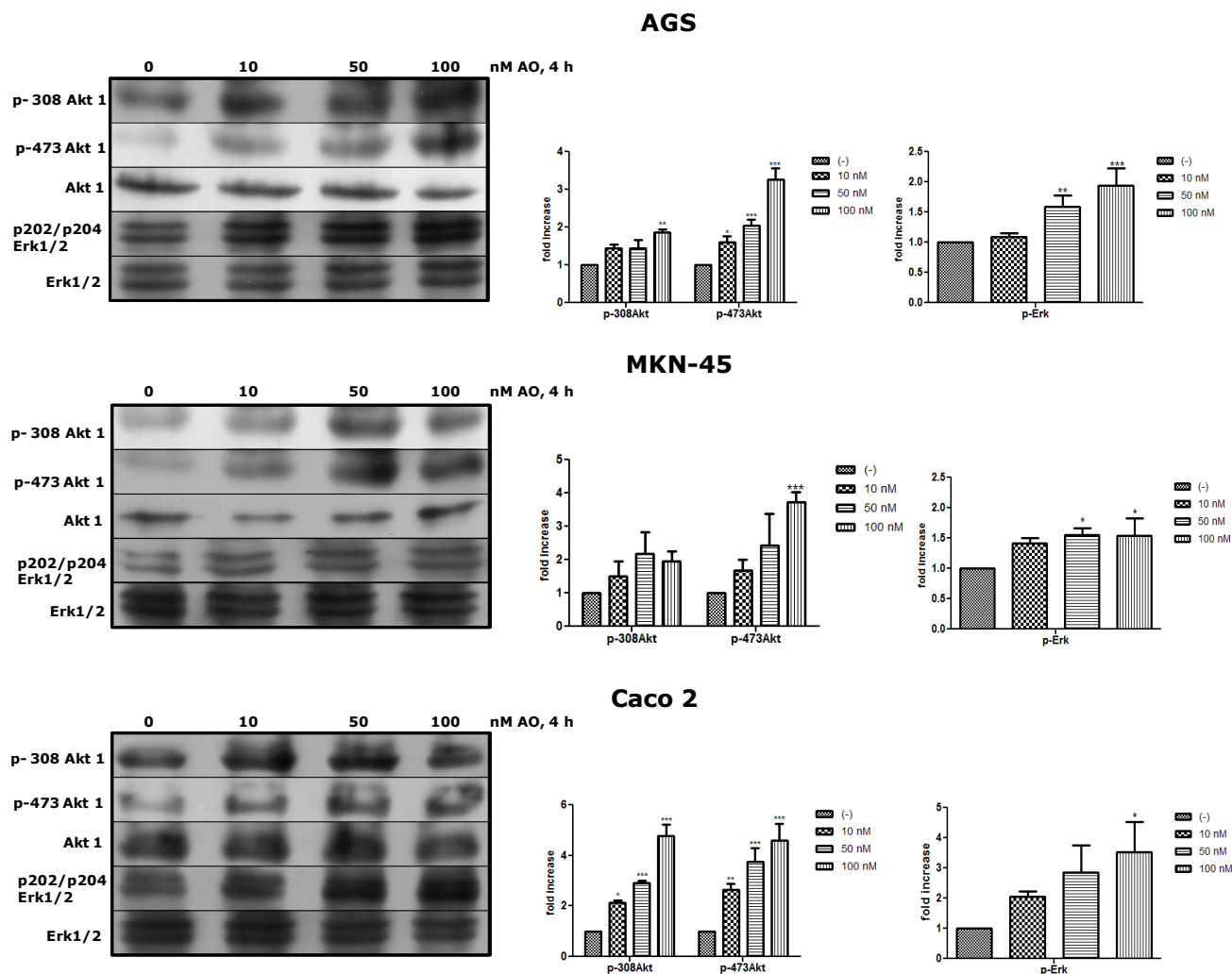
**Figure 3.** Treatment with OA generates overexpression of Cyclin B. By western blot, an increased expression of Cyclin B after exposure to OA for 4 h or 24 h is shown in all three cell lines. ( $N = 4$  for AGS and MKN-45;  $N = 3$  for Caco 2). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .



2.3. Activation of Akt and Erk Pathways as an OA Effect

Next, we wanted to see whether OA could activate canonical pathways of proliferation such as Akt and Erk. Akt is the major downstream effector in the PI3-kinase pathway and requires the phosphorylation of Thr308 and Ser473 to be fully active [19]. Erk is central to signaling by growth factors. Their activation involves a cascade of phosphorylation events initiated by stimulation of Ras and ending by MAPK kinases (MEK1/2)-mediated dual phosphorylation of Erk1/2 at Thr and Tyr residues [20]. Both Akt and Erk are essential regulators of cell survival, proliferation, and metabolism and are substrates of PP2A, who acts as deactivator of them. After treatment with OA for 4 h, the three cell lines showed that the phosphorylated forms of Akt and Erk were increased, being significant in some cases (Figure 4).

**Figure 4.** Treatment with OA generates activation of Akt and Erk pathways. By WB, an increased of p308-Akt1, p-473-Akt1 and p-Erk1/2 is shown relative to basal levels of Akt and Erk as an effect of OA after 4 h (N = 3). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .



### 3. Experimental Section

#### 3.1. Reagents and Chemicals

Okadaic acid (OA; NRC CRM-OA-c) was purchased from National Research Council (Halifax, Nova Scotia, Canada); Antibodies against Cyclin B1 were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, CA, USA); Anti Rabbit IgG Peroxidase conjugate was obtained from Thermo (Rockford, Illinois, IL, USA); Anti Mouse IgG peroxidase conjugate was obtained from Sigma (Saint Louis, Missouri, MO, USA); Erk1 + Erk2, Erk1 + Erk2 (phospho Y204/187 + T202/185), Akt-1, Akt-1 (phospho T308), Akt-1 (phospho S473) and  $\beta$ -Act were obtained from Abcam (Cambridge, Massachusetts, MA, USA). Bovine Serum Albumin (BSA), BCA protein assay, “AlamarBlue cell Viability assay Reagent”, MTT, RIPA Buffer, Halt protease inhibitor cocktail, Phosphatase inhibitor cocktail, BupH Tris-Glycine-SDS Buffer, Surfact-Amp 20, BupH Phosphate Buffered Saline Packs, Nitrocellulose membrane 0.22  $\mu$ m, Super Signa West Pico Chem iluminescent Substrate and Restore Western blot Stripping Buffer were obtained from Thermo (Rockford, Illinois, IL, USA).

#### 3.2. Cell Culture

AGS, MKN-45 and Caco 2 (ATCC) cell lines were cultured in Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) containing penicillin (100  $\mu$ g/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL), 1% non-essential amino acids were from Invitrogen (Grand Island, New York, NY, USA), and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) were from HyClone (South Logan, Utah, UT, USA). Cells were incubated in 10% CO<sub>2</sub> at 37 °C and harvested when they reach 70%–90% confluence using 0.25% trypsin/EDTA, from Invitrogen (Grand Island, New York, NY, USA).

#### 3.3. Cell Viability Assay

##### 3.3.1. MTT Assay and AlamarBlue Assay

Cells ( $1 \times 10^4$  per well) were cultured in 100  $\mu$ L of free SFB medium for 24 h. Then the medium was removed and replaced by fresh medium supplemented with OA at different concentrations and incubated at the indicated times. For the MTT assay, cells were incubated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), at a final concentration of 0.5 mg/mL for 2 h. Then, 200  $\mu$ L of 0.1 N HCl-Isopropanol was added, and the plates were agitated for 15 min. The AlamarBlue assay was used according to manufacturer’s recommendations, 10% of reagent was incubated for 2 h. In both assays, optical density of medium in each well was measured with an automatic microplate reader at a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 690 nm for MTT assay and 600 nm for AlamarBlue assay.

##### 3.3.2. Trypan Blue Assay

Cells ( $1 \times 10^5$ ) were cultured in 500  $\mu$ L free SFB medium per well for 24 h. The medium was removed and replaced by fresh medium supplemented with OA at different concentrations and incubated at the indicated times. Cells were detached from the well using 1% trypsin/EDTA, washed

once with PBS, and resuspended in 1 mL of medium. Then, cells were counted in a Neubauer chamber, 1:1 with Trypan blue.

The data are expressed considering 100% to the control condition, without OA.

### 3.4. Cell Extracts

For western blot analysis,  $3 \times 10^5$  cells/ well were seeded in six-well plates in 2 mL of free SFB medium for 24 h. Then, the medium was removed and replaced by fresh medium supplemented with OA at different concentrations and incubated for 4 or 24 h. The cell extracts were prepared removing the medium from plates, washing with cold PBS, and adding RIPA buffer with protease inhibitor and phosphatase inhibitors  $1\times$ . After centrifugation ( $14,000\times g$  for 15 min at 4 °C), the protein concentration was determined with BCA protein assay at  $\lambda = 595$  nm with BSA as standard. Then, the samples were heated for 5 min at 100 °C in the presence of SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol.

### 3.5. Western Blotting

Ten micrograms of proteins from total cells were subjected to SDS-PAGE on 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with PBS-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (PBST) and 1% BSA for 60 min at room temperature and probed with antibodies against Cyclin B1 (1:2,500), Akt-1 (1:5000), Akt-1 (phospho T308) (1:5000), Akt-1 (phospho S473) (1:5000), Erk1 + Erk2 (1:5000), Erk1 + Erk2 (phospho Y204/187 + T202/185) (1:5000) and  $\beta$ -actin (1:7500) overnight at 4 °C and washed three times with PBST. The membranes were probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies at 1:5000 for 1 h at room temperature and washed with PBST three times. The immunoblots were visualized by enhanced chemiluminescence. Densitometrical measurement of the band of interest was done using the GelPro 31 software (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA). Normalization was done using  $\beta$ -actin, Akt-1 or Erk1 + Erk2 values.

### 3.6. Statistical Analyses

The results of the experiments were expressed as the mean  $\pm$  SE. Comparisons between the groups were made using a two-way ANOVAs and the Bonferroni post-test. The statistical significance was defined as a *P* value smaller than 0.05. The analyses were performed using GraphPad Prism software (La Jolla, California, CA, USA).

## 4. Conclusions

Our results demonstrate that sublethal concentrations of OA can promote the cellular mitotic rate, overexpression of Cyclin B and activation of cell proliferation pathways such as Akt and Erk. In the consumption of shellfish contaminated with diarrheal toxins, the bioavailability of these molecules is very different from the experimental model used. Nevertheless, we believe that our work is a contribution to the elucidation of why these toxins are considered to be tumor promoters.

## Acknowledgments

We would like to thank Carlos García and Cristobal Contreras, for all their support and help in the development of this work, María Inés Becker and “Science and Technology for the developed” Foundation for their generous assistance in providing the facilities of the Foundation and giving us the Caco 2 cell line, and Alejandro Corvalán, of the Pathology and Molecular Epidemiology Laboratory, PUC, for his support and for providing us the AGS and MKN-45 cells lines. The project was funded by Fondecyt 1130037 (M.d.C.; N.L.) and Fondecyt 1120126 (H.T.).

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Alexander, J.; Audunsson, G.A.; Benford, D.; Cockburn, A.; Cradevi, J.P.; Dogliotti, E.; Domenico, A.D.; Fernandez-Cruz, M.L.; Fink-Gremmels, J.; Furst, P.; *et al.* Marine biotoxins in shellfish—okadaic acid and analogues—Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA J.* **2008**, *589*, 1–62.
2. Aune, T.; Stabell, O.B.; Nordstoga, K.; Tjøtta, K. Oral toxicity in mice of algal toxins from the diarrheic shellfish toxin (DST) complex and associated toxins. *J. Nat. Toxins* **1998**, *7*, 141–158.
3. Tripuraneni, J.; Koutsouris, A.; Pestic, L.; De Lanerolle, P.; Hecht, G. The toxin of diarrheic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology* **1997**, *112*, 100–108.
4. Fujiki, H.; Suganuma, M. Carcinogenic aspects of protein phosphatase 1 and 2A inhibitors. *Prog. Mol. Subcell Biol.* **2009**, *46*, 221–254.
5. Manerio, E.; Rodas, V.L.; Costas, E.; Hernandez, J.M. Shellfish consumption: A major risk factor for colorectal cancer. *Med. Hypotheses* **2008**, *70*, 409–412.
6. Bialojan, C.; Takai, A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.* **1988**, *256*, 283–290.
7. Westermarck, J.; Hahn, W.C. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 152–160.
8. Fujiki, H.; Suganuma, M. Tumor promoters—microcystin-LR, nodularin and TNF- $\alpha$  and human cancer development. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11*, 4–18.
9. Baharians, Z.; Schonthal, A. Reduction of Ha-ras-induced cellular transformation by elevated expression of protein phosphatase type 2A. *Mol. Carcinog.* **1999**, *24*, 246–254.
10. Guénin, S.; Schwartz, L.; Morvan, D.; Steyaert, J.M.; Poignet, A.; Madelmont, J.C.; Demidem, A. PP2A activity is controlled by methylation and regulates oncoprotein expression in melanoma cells: A mechanism which participates in growth inhibition induced by chloroethylnitrosourea treatment. *Int. J. Oncol.* **2008**, *32*, 49–57.
11. Matias, W.G.; Traore, A.; Creppy, E.E. Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome. *Hum. Exp. Toxicol.* **1999**, *18*, 345–350.

12. Aune, T.; Espenes, A.; Aasen, J.A.; Quilliam, M.A.; Hess, P.; Larsen, S. Study of possible combined toxic effects of azaspiracid-1 and okadaic acid in mice via the oral route. *Toxicon* **2012**, *60*, 895–906.
13. Ito, E.; Yasumoto, T.; Takai, A.; Imanishi, S.; Harada, K. Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method. *Toxicon* **2002**, *40*, 159–165.
14. Fessard, V.; Grosse, Y.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Puiseux-Dao, S. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes. *Mutat. Res.* **1996**, *36*, 133–141.
15. Jayaraj, R.; Gupta, N.; Rao, P.V. Multiple signal transduction pathways in okadaic acid induced apoptosis in HeLa cells. *Toxicology* **2009**, *256*, 118–127.
16. Kitazumi, I.; Maseki, Y.; Nomura, Y.; Shimanuki, A.; Sugita, Y.; Tsukahara, M. Okadaic acid induces DNA fragmentation via caspase-3-dependent and caspase-3-independent pathways in Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells. *FEBS J.* **2010**, *277*, 404–412.
17. Ravindran, J.; Gupta, N.; Agrawal, M.; Bala Bhaskar, A.S.; Lakshmana Rao, P.V. Modulation of ROS/MAPK signaling pathways by okadaic acid leads to cell death via, mitochondrial mediated caspase-dependent mechanism. *Apoptosis* **2011**, *16*, 145–161.
18. Fisher, D.; Krasinska, L.; Coudreuse, D.; Novák, B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 4703–4711.
19. Rodgers, J.T.; Vogel, R.O.; Puigserver, P. Clk2 and B56 $\beta$  mediate insulin-regulated assembly of the PP2A phosphatase holoenzyme complex on Akt. *Mol. Cell* **2011**, *41*, 471–479.
20. Letourneux, C.; Rocher, G.; Porteu, F. B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *EMBO J.* **2006**, *25*, 727–738.
21. Souid-Mensi, G.; Moukha, S.; Mobio, T.A.; Maaroufi, K.; Creppy, E.E. The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicon* **2008**, *51*, 1338–1344.
22. Parkman, H.P.; Jones, M.P. Tests of gastric neuromuscular function. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 1526–1543.