

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***EFFECTO PROTUMORAL DEL ÁCIDO OKADAICO Y SUS ANÁLOGOS DTX-1 Y DTX-2 EN LÍNEAS CELULARES DE EPITELIO DE COLON***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica**

***DANAE FRANCISCA JIMÉNEZ CÁRCAMO***

**Directores de Tesis:  
Dr. Héctor Contreras Muñoz y Dr. Carlos García Mansilla**

**Santiago-CHILE**

**Enero 2019**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

**DANAE FRANCISCA JIMÉNEZ CÁRCAMO**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica, en el examen público rendido el día

---

**Directores de Tesis:**

**Dr. Héctor Contreras**

---

**Dr. Carlos García**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Lorena García**

---

**Dr. Alfonso Paredes**

---

**Dr. Luis Quiñones**

---

***“Porque de Él y por Él y para Él son todas las cosas”  
Romanos 11:36  
A Dios, a mis padres, a mi esposo y a mi pequeño Rafael***

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis fue financiada por los proyectos FONDECYT N°1151214 el Dr. Héctor Contreras Muñoz y FONDECYT N°1160168 Dr. Carlos García Mansilla.

Además, la estudiante recibió el apoyo de la beca CONICYT de Magister Nacional N° 22160169 (año 2016).

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en la XV reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (Concón- Chile, 5-8 septiembre, 2018) y en las jornadas de Extensión Seminario Climático y riesgos ambientales en ecosistemas hídricos. 20 de noviembre - Teatro del Lago (anfiteatro). Frutillar.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. Abreviaturas</b> .....	<b>I</b>
<b>2. Resumen</b> .....	<b>II</b>
<b>3. Summary</b> .....	<b>IV</b>
<b>4. Introducción</b> .....	<b>1</b>
4.1. Veneno Diarreico de Mariscos .....	1
4.2. Blancos moleculares de las toxinas de VDM .....	2
4.3. Efectos celulares prooncogénicos de las toxinas de VDM.....	4
<b>5. Hipótesis</b> .....	<b>7</b>
<b>6. Objetivo general</b> .....	<b>7</b>
<b>7. Objetivos específicos</b> .....	<b>7</b>
<b>8. Materiales y métodos</b> .....	<b>8</b>
8.1. Cultivo celular .....	8
8.2. Toxinas .....	8
8.3. Viabilidad celular .....	8
8.4. Extracción de proteína totales.....	9
8.5. Ensayo de inhibición de PP2A .....	9
8.6. Western Blot .....	10
8.7. Ensayos de muerte celular.....	10
8.8. Citotoxicidad .....	11
8.9. Ensayo de cierre de herida .....	11
8.10. Migración e Invasión .....	12
8.11. Extracción de RNA.....	12
8.12. PCR en tiempo real.....	12
8.13. Análisis Estadístico .....	13
<b>9. Resultados</b> .....	<b>14</b>
9.1. Objetivo Específico 1 .....	14
9.1.1. Viabilidad celular.....	14
9.1.2. Determinación actividad PP2A.....	17
9.1.3. Proliferación celular.....	18
9.1.4. Evaluación de muerte celular .....	19
9.2. Objetivo Específico 2 .....	24
9.2.1. Migración e invasión celular.....	24

9.2.2. Ensayo de cierre de herida .....	26
9.2.3. Evaluación de Marcadores de Migración celular.....	27
<b>10. Discusión .....</b>	<b>32</b>
<b>11. Conclusiones .....</b>	<b>38</b>
<b>12. Proyecciones .....</b>	<b>39</b>
<b>13. Bibliografía.....</b>	<b>40</b>
<b>14. Anexos .....</b>	<b>44</b>
14.1. Anexo 1.....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Toxinas marinas utilizadas en los ensayos celulares.....	8
Tabla 2: Valores de IC50 para cada toxina obtenidos a partir de ensayo de MTT. ....	15
Tabla 3: Porcentaje de células viables, en necrosis y apoptosis analizado mediante citometría de flujo para Annexina V/ PI.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de Ácido Okadaico (AO), dinofisistoxina-1 (DTX-1), dinofisistoxina-2 (DTX-2) .....	2
Figura 2: Zonas donde se ha detectado toxinas de VDM provenientes de <i>Dinophysis</i> en Sudamérica.....	5
Figura 3: Viabilidad línea celular Con841 .....	15
Figura 4: Viabilidad línea celular Sw480 .....	16
Figura 5: Viabilidad línea celular Sw620 .....	17
Figura 6: Actividad PP2A en líneas celulares normales y tumorales de colon.....	18
Figura 7: Evaluación de antígeno de proliferación celular PCNA .....	19
Figura 8: Evaluación de Caspasa 8 activada.....	20
Figura 9: Evaluación de actividad Caspasa 3/7. ....	21
Figura 10: Citotoxicidad determinada mediante ensayo de LDH .....	22

Figura 11: Resultados de citometría de flujo de apoptosis analizadas mediante Annexina V/PI.....	23
Figura 12: Evaluación de migración celular .....	25
Figura 13: Evaluación de invasión celular.....	26
Figura 14: Ensayo de cierre de herida en células Con841 y Sw620.....	27
Figura 15: Evaluación de antígeno ILK.....	28
Figura 16: Nivel de expresión relativa de ARNm de ILK.....	29
Figura 17: Evaluación de antígeno FAK y pFAK.....	30
Figura 18: Nivel de expresión relativa de ARNm de FAK .....	31
Figura 19: ANEXO 1 .....	44

## 1. ABREVIATURAS

<b>AO</b>	: Ácido okadaico
<b>AZA</b>	: Azapirácidos
<b>BTX</b>	: Brevetoxinas
<b>BSA</b>	: Albúmina de suero bovino
<b>DMSO</b>	: Dimetilsulfóxido
<b>DTX-1</b>	: Dinofisistoxina 1
<b>DTX-2</b>	: Dinofisistoxina 2
<b>DTX-3</b>	: Dinofisistoxina 3
<b>FANs</b>	: Florecimientos algales nocivos
<b>FAK</b>	: Proteína kinasa de adhesiones focales
<b>FBS</b>	: Suero fetal bovino
<b>FITC</b>	: Fluorescein isothiocyanato
<b>GYM</b>	: Gimnodiminas
<b>ILK</b>	: Proteína kinasa ligada a integrina
<b>LDH</b>	: Lactato Deshidrogenasa
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide / Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
<b>PCNA</b>	: Antígeno celular de células en proliferación
<b>PCR</b>	: Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PI</b>	: Yoduro de propidio
<b>PP1</b>	: Proteína fosfatasa del tipo 1
<b>PP2A</b>	: Proteína fosfatasa del tipo 2A
<b>PP5</b>	: Proteína fosfatasa del tipo 5
<b>PTX</b>	: Pectenotoxinas
<b>RIPA</b>	: Radioimmunoprecipitation assay buffer
<b>SDS</b>	: Dodecilsulfato sódico
<b>TBS</b>	: Solución salina tris-tamponada
<b>YTX</b>	: Yessotoxinas
<b>VDM</b>	: Veneno diarreico de mariscos



## 2. RESUMEN

Los florecimientos algales nocivos (FANs) o “Harmful algal blooms” son condiciones generadas por un aumento de la densidad de microalgas en los océanos. Distintas especies de fitoplancton, bajo ciertas circunstancias, son capaces de producir toxinas, que son acumuladas por los mariscos y gastrópodos, pudiendo ocasionar diversos cuadros tóxicos en quienes los consumen, así como ocasionar problemas ecológicos y económicos. El veneno diarreico de mariscos (VDM) es el síndrome provocado por la ingesta de mariscos contaminados que genera síntomas que incluyen: diarrea, náusea, vómito y dolor abdominal. Este grupo de toxinas que se caracterizan por ser de carácter lipofílico y estables a variaciones de temperatura. Ácido okadaico (AO) es el principal análogo del VDM. Otras toxinas dentro de este grupo son compuestos derivados del AO: dinofisistoxina-1 (DTX-1), dinofisistoxina-2 (DTX-2) y dinofisistoxina-3 (DTX-3), entre otros. Las toxinas del grupo del AO son potentes inhibidores de las Ser/Thr fosfatasa, principalmente fosfatasa del tipo 1 (PP1) y la fosfatasa del tipo 2A (PP2A), lo que produce una hiperfosforilación en las proteínas intracelulares y una desregulación de diferentes procesos celulares.

Se han reportan distintos efectos celulares de este grupo de toxinas sobre distintos sistemas celulares, los que incluyen cambios a nivel celular, molecular y genético. Aunque las toxinas del grupo del AO no se clasifican como neurotoxinas, hay estudios que reportan efectos neurotóxicos inducidos por AO que incluyen apoptosis neuronal y reorganización del citoesqueleto. Incluso, se ha reportado que el AO y las DTXs tienen efectos citotóxicos, genotóxicos, capacidad promotora de tumores y carcinogénicos.

De acuerdo con los antecedentes presentados, la hipótesis de trabajo en este proyecto es: “el AO y sus análogos DTX-1 y DTX-2 potencian la capacidad proliferativa e invasiva de líneas celulares de epitelio de colon normal y tumoral”. El objetivo general es Determinar cambios del fenotipo de células de epitelio de colon (normales y tumorales) inducidos por Ácido Okadaico, DTX-1 y DTX-2. Para esto, se utilizaron las líneas celulares de epitelio colon, un modelo no tumoral (CCD 841 CoN), una línea de tumor primario (Sw480) y otra de tumor metastásico (Sw620), las que serán expuestas a las toxinas comerciales estandarizadas AO, DTX-1 y DTX-2. Se evaluó viabilidad mediante MTT, actividad PP2A,

expresión de PCNA como marcador de proliferación, evaluación de muerte celular mediante la expresión de caspasa-8, actividad de caspasa 3/7 activada, ensayo de AnnexinaV y PI mediante citometría de flujo, liberación de LDH, migración e invasión mediante cámaras *transwell* y expresión de proteínas FAK e ILK.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de MTT muestran que DTX-2 resultó menos tóxico que AO y DTX-1 al comparar los valores de IC50. Esto coincide con lo reportado en literatura, se considera que AO y DTX-1 son igualmente tóxicos, en tanto que DTX-2 es alrededor de un 40% menos tóxico. Además, al comparar las células no tumorales con las líneas tumorales, las primeras resultaron ser mucho más sensibles al efecto de las tres toxinas, obteniendo valores de IC50 (IC50 AO: 54,4 nM; IC50 DTX-1: 43,5 nM; IC50 DTX-2: 81,2 nM) mucho menores en comparación a las líneas Sw480 y Sw620 (IC50 AO Sw480: 89,3 nM; IC50 DTX-1 Sw480: 113,8 nM; IC50 DTX-2 Sw480: 187,2 nM; IC50 AO Sw620: 137,2 nM; IC50 DTX-1 Sw620: 192,9 nM; IC50 DTX-2 Sw620: 202,9 nM). Respecto de los cambios morfológicos posteriores a la incubación con las toxinas, indican que las células se vuelven esféricas y tienden a agruparse, sugiriendo un incremento en la adhesión célula-célula y perdiendo adhesión a la placa, el efecto es mucho más evidente en la línea no tumoral. Considerando los resultados de los ensayos funcionales, de muerte celular y expresión de proteínas asociadas a adhesión celular, es posible observar un efecto dual de las toxinas, ya que en la línea no tumoral hay una mayor inducción de muerte celular presumiblemente anoikis, en tanto que en las líneas tumorales hay una inducción de un fenotipo más agresivo caracterizado por una mayor resistencia a las toxinas, aumento de migración y FAK activado, el cual se relaciona con un recambio de adhesiones focales.

### 3. SUMMARY

Harmful algal blooms (HABs) are natural events that occurs in seas worldwide, HABs are a result of a high density of microalgal in oceans. Many species of phytoplankton, under certain circumstances, are capable of produce phycotoxins, which are accumulated in shellfishes, bivalve mollusk and gastropods. These toxins may cause syndromes that impacts public health, ecology and generate severe economic losses.

Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP) is a gastrointestinal syndrome caused by ingestion of contaminated shellfish, symptoms include: diarrhea, nausea, vomits and abdominal pain. These groups of toxins are characterized by a fat-soluble character and thermostability. Okadaic acid (OA) is the main compound of DSP. Other toxins of this group are acyl derivatives of OA: dinophysistoxin-1 (DTX-1), dinophysistoxin-2 (DTX-2) and dinophysistoxin-3 (DTX-3). Toxins of OA group are potent Ser/Thr protein phosphatases inhibitors, mainly protein phosphatase 1 (PP1) and protein phosphatase 2A (PP2A), the direct consequences of this inhibition produces hyperphosphorylation of cellular proteins and deregulation of many cellular processes.

Many cellular effects of this toxins on different cellular systems are reported in literature, these changes are at cellular, molecular and genetic level. Cytotoxic, genotoxic and carcinogenic effects are reported for some groups due to AO and DTXs toxins. Although toxins of OA group are not classified as neurotoxins, some studies report neurotoxic effects induced by OA including neuronal apoptosis and cytoskeleton reorganization.

The hypothesis of this project was: "OA and its analogues DTX-1 y DTX-2 enhance the proliferative and invasive capacity of normal and tumoral colon epithelial cell lines". The general objective was to determine phenotypical changes on colon epithelial cell lines (normal and tumoral) induced by OA, DTX-1 and DTX-2. To do it we choose CCD 841 CoN cell line as a non-tumoral model, Sw480 cell line as a primary tumor model and Sw620 cell line as a metastatic tumor model. Cell were exposed to commercial toxins OA, DTX-1 and DTX-2. Viability was evaluated by MTT assay, also PP2A activity was quantified, PCNA expression was quantified by western blot, caspase-8 and activated caspase-3/7 were evaluated as

cellular death marks, apoptosis by Annexin V and PI was evaluated by flow cytometry, LDH release as a necrosis marker, migration and invasion were evaluated by transwell chambers, finally, expression of FAK and ILK proteins were evaluated by western blot because of their role in migration process.

MTT assay results show that DTX-2 was less toxic than OA and DTX-1 comparing IC50 values. It is considered that OA and DTX-1 are equally toxic and DTX-2 is 40% less toxic. Furthermore, comparing non tumoral cell line with tumoral cell lines, non-tumoral cells were more sensitive to all toxin effects. IC50 values were smaller than Sw480 and Sw620 IC50 values (IC50 OA Con841: 54,4 nM; IC50 DTX-1 Con841: 43,5 nM; IC50 DTX-2 Con841: 81,2 nM; IC50 OA Sw480: 89,3 nM; IC50 DTX-1 Sw480: 113,8 nM; IC50 DTX-2 Sw480: 187,2 nM; IC50 OA Sw620: 137,2 nM; IC50 DTX-1 Sw620: 192,9 nM; IC50 DTX-2 Sw620: 202,9 nM).. We could see morphological changes after all toxin incubations. Cells took round shaped, tend to group and detach from the plate, these effects are more notorious in non-tumoral cells. Considering functional assays results, cellular death and expression of protein associated to cellular adhesion and motility, we can see a dual effect of this toxins, in non-tumoral cell line there is cellular death induced by the toxins, probably anoikis, while, in tumoral cell lines we see a more aggressive phenotype induced by toxins, characterized by greater resistance to toxins, migration increased and more activated FAK expression levels, which is related to focal adhesions replacement and migration processes.

## 4. INTRODUCCIÓN

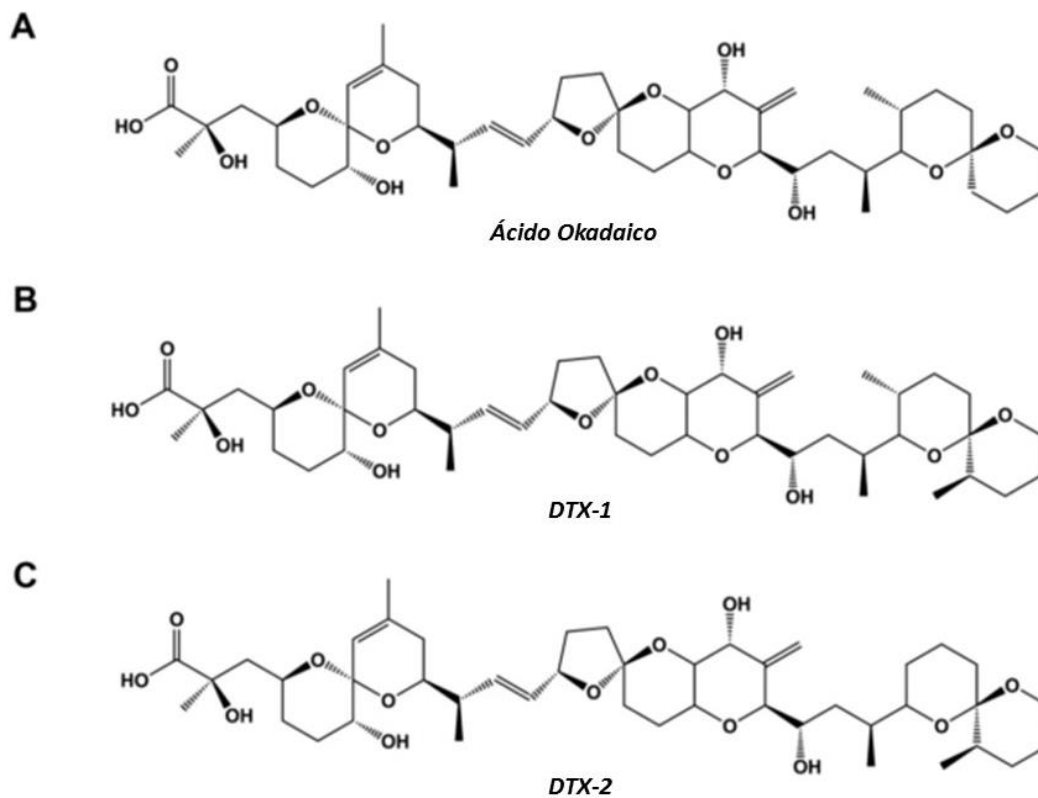
Los florecimientos algales nocivos (FANs) o “Harmful algal blooms”, conocidas popularmente como marea roja, son condiciones generadas por un aumento de la densidad de microalgas en el mar. Algunas especies de fitoplancton, bajo ciertas circunstancias, son capaces de producir toxinas, causando diversos daños a nivel ecológico, económico y sanitario. Los FANs pueden afectar tanto a la fauna marina como a las personas. El aumento de su frecuencia y severidad provoca problemas de salud pública. Estas toxinas se acumulan en mariscos en general, de esta manera las toxinas se van distribuyendo y expandiendo a través de la cadena trófica hasta que, eventualmente, son consumidas por las personas. La intoxicación producida por las toxinas marinas puede provocar severos daños a la salud de las personas e incluso la muerte (García y Contreras, 2014). El mayor problema durante los FANs son las toxinas marinas del tipo lipofílicas, dentro de este grupo se encuentran las biotoxinas del grupo de ácido okadaico (AO), pectenotoxinas (PTX), yessotoxinas (YTX), azapirácidos (AZA), brevetoxinas (BTX) y gimnodiminas (GYM) (García et al, 2016).

### 4.1. Veneno Diarreico de Mariscos

El veneno diarreico de mariscos (VDM) es un síndrome provocado por la ingestión de mariscos contaminados, se desarrolla entre 30 min y 6 h luego de la ingesta y genera síntomas que incluyen: diarrea (60%), náusea (46%), vómito (31%) y dolor abdominal (77%) (del Campo 2013; Reguera et al, 2014), además, genera pérdida de la integridad epitelial, erosión e hipersecreción en el intestino y aumenta la permeabilidad paracelular. Si la intoxicación es leve, evoluciona de manera favorable y la recuperación ocurre luego de 2 o 3 días. (Lopez-Rodas, et al, 2006) Aunque no se registran muertes humanas por toxinas diarreicas de mariscos, se encuentran ampliamente caracterizadas como promotoras de tumores (Fujiki et al, 2013).

Las toxinas causantes de este tipo de intoxicación son producidas por dinoflagelados marinos de los géneros *Prorocentrum* y *Dinophysis*, los que se encuentran distribuidos en todo el mundo. Estas toxinas son de carácter lipofílico y estables a variantes térmicas (García et al, 2016).

El AO es el principal compuesto del VDM. Otras toxinas corresponden a análogos del AO: dinofisistoxina-1 (DTX-1), dinofisistoxina-2 (DTX-2) y las toxinas aciladas en el grupo hidroxilo C7 con una cadena de longitud variable de ácidos grasos se denominan acyl derivados o dinofisistoxina-3 (DTX-3). (Fernández, et al, 2014). Estructuralmente, estas toxinas son largas cadenas de poliéteres con estructura base de 38C (figura 1). El AO es la toxina más estudiada y se han reportado distintos mecanismos de toxicidad, incluyendo disrupción del ciclo celular, inducción de la proliferación celular, daño al DNA, apoptosis y también tiene un rol en la respuesta inflamatoria. (Ferron, et al, 2014)



**Figura 1:** Estructura química de Ácido Okadaico (AO), dinofisistoxina-1 (DTX-1), dinofisistoxina-2 (DTX-2) (Fernández, et al, 2014).

#### 4.2. Blancos moleculares de las toxinas de VDM

Las toxinas del grupo del AO son potentes inhibidores de las Ser/Thr fosfatasa, lo que produce una hiperfosforilación en las proteínas celulares y una desregulación de diferentes

procesos en las células. Los blancos moleculares principales de este grupo de toxinas son las proteínas fosfatasa del tipo 1 (PP1) y la fosfatasa del tipo 2A (PP2A) (Ferreiro et al., 2015). La PP2A es una enzima que regula múltiples vías de señalización intracelular como proliferación, supervivencia, diferenciación y apoptosis, también es considerada un supresor de tumores y un regulador positivo de las vías de apoptosis intrínseca y extrínseca. Algunas investigaciones publicadas indican que la afinidad de DTX-1 por PP2A es 1,6 veces mayor que el AO y la afinidad de DTX-2 es 2 veces menor que el AO (Huhn et al., 2009).

En cuanto a la toxicidad de estos compuestos, se ha investigado la toxicidad aguda in vivo mediante la inyección intraperitoneal en ratones, obteniendo valores de dosis letal 50 (DL50) similares entre DTX-1 y AO, mientras que DTX-2 posee 0,6 veces la potencia de los otros dos compuestos (Valdiglesias et al., 2013). Sin embargo, algunos estudios sostienen que DTX-1 es más tóxico que el AO, considerando su capacidad de destruir la integridad de células epiteliales y generar apoptosis (del Campo et al., 2017). Por otro lado, se ha encontrado que DTX-2 además de ser un inhibidor de PP2A más débil que el AO, es significativamente menos tóxico en bioensayos de ratón (Huhn et al., 2009). Las diferencias en la toxicidad de este grupo de toxinas radican en la estereoquímica de los compuestos, ya que la metilación en C31 y C35 modifican su interacción con los sitios de unión de las distintas fosfatasas (PP1, PP2A y en menor medida PP5) (Twiner et al., 2016).

A pesar de que la mayoría de los efectos de este grupo de toxinas está relacionado a la inhibición de proteínas fosfatasas, existen reportes de otros posibles blancos de acción relevantes para la toxicidad de las toxinas del grupo del AO (Munday, 2013). En este sentido, Louzao et al., (2015) reportan que dosis de 50-100 nM de AO en células de neuroblastoma SH-SY5Y, provocan una disminución en la expresión del neuropéptido Y, el cual tiene un efecto protector contra la diarrea. Por otra parte, Espiña et al., (2010) reportaron que Metil Okadaato, un derivado artificial de AO es capaz de disrumpir la actina del citoesqueleto y es capaz de disminuir el gasto metabólico en hepatocitos de rata normales e inmortalizados, por una vía independiente a la inhibición de PP1 y PP2A. Estos resultados podrían indicar una vía de acción del AO distinta a la inhibición de fosfatasas.

### **4.3. Efectos celulares prooncogénicos de las toxinas de VDM**

Distintos trabajos describen los efectos celulares de este grupo de toxinas, los que incluyen cambios a nivel celular, molecular y genético. Incluso, se ha reportado que el AO y las DTXs tienen efectos citotóxicos, genotóxicos, capacidad promotora de tumores y carcinogénicos (Ferreiro et al., 2015; Fujiki et al., 2018). Aunque las toxinas del grupo del AO no se clasifican como neurotoxinas, hay estudios que reportan efectos neutóxicos inducidos por AO como apoptosis neuronal y reorganización del citoesqueleto (Opshal et al., 2013; Valdiglesias et al., 2011). En relación con los efectos tóxicos de estas toxinas, estudios en las líneas celulares intestinales humanas Caco-2 y HT29-MTX han reportado que, aunque no hay diferencias en cuanto al tipo de daño agudo que estas toxinas producen, DTX-1 es cinco veces más tóxico que el AO y DTX-2 (Ferron, et al, 2014). Por otra parte, del Campo y cols. 2013 demostraron que utilizando células tumorales gástricas y de colon expuestas a niveles letales de AO, por cortos periodos de tiempo (4h), no se activa la muerte celular, lo que sugiere un aumento en el riesgo de que esta toxina pueda actuar como promotor de tumores.

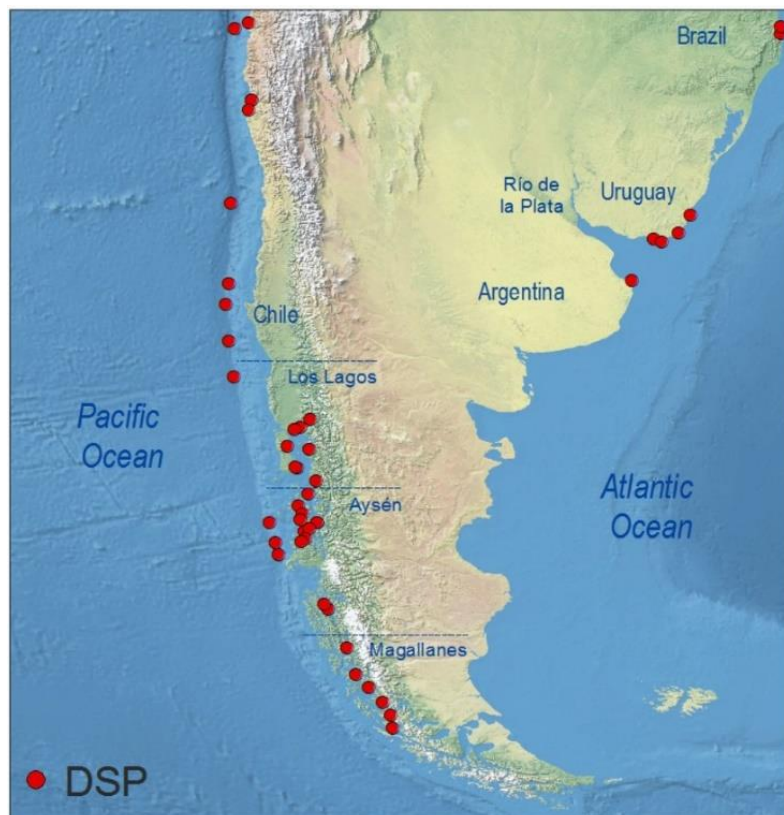
La importancia de estudiar la toxicidad y los mecanismos de acción de AO y sus análogos en células de epitelio intestinal se debe a que el tracto gastrointestinal es su principal blanco de acción y los síntomas generados por el síndrome de VDM afectan principalmente al sistema digestivo. Aunque el organismo utiliza el vómito y la diarrea como métodos de defensa contra la intoxicación por AO, se ha determinado que, a altas dosis, equivalente a intoxicaciones agudas, la barrera intestinal se pierde y las toxinas llegan por el torrente sanguíneo a otros tejidos, produciendo úlceras, hiperplasia, necrosis y atrofia (Ehlers et al., 2011).

En este sentido, existen estudios que correlacionan estadísticamente el consumo de mariscos con la incidencia del cáncer colorrectal en población española. Es así como un incremento de 7 veces en el consumo de moluscos se asoció con un riesgo 2 veces mayor de desarrollar cáncer colorrectal (Lopez-rodas et al., 2006). Otro estudio sugiere una asociación entre la exposición a toxinas del grupo de AO y el riesgo de cáncer en el tracto gastrointestinal, colon y estómago principalmente, en población de las costas francesas (Cordier et al, 2000). Para estudiar la relación entre cáncer y toxinas del grupo de AO, Valdiglesias y cols. (2013) estudiaron la expresión de 10 genes relacionados a procesos



carcinogénicos en células neuronales SHSY5Y expuestas a AO, obteniendo alteraciones en el patrón de expresión, lo que confirma la asociación entre el consumo de mariscos contaminados y la incidencia de cáncer en humanos.

En Chile, el VDM es un problema que impacta fuertemente, ya que las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes son las regiones de América del Sur más afectadas por estos eventos (Figura 2), ya que los FANs causante de VDM afectan la producción y exportación de mariscos, así como la salud pública (Reguera et al., 2014).



**Figura 2:** Zonas donde se ha detectado toxinas de VDM provenientes de *Dinophysis* en Sudamérica. Reguera et al (2014) Marine Drugs, 12, 394-461

Los tumores malignos son la segunda causa de muerte en Chile luego de las enfermedades cardiovasculares. Las estadísticas de cáncer en Chile publicadas por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (2018) indican que el cáncer colorrectal ocupa el segundo lugar en incidencia para ambos sexos (11,1%), luego del cáncer de próstata (12,3%) y, el cáncer de estómago ocupa el cuarto lugar en incidencia (9,7%). En relación

con la presentación geográfica de tumores malignos en Chile, se observa que en el norte del país las tasas más altas corresponden a cánceres del sistema respiratorio, piel y vejiga, mientras que en el sur predominan los cánceres del aparato digestivo (estomago, vesícula biliar y colon) (Minsal, 2016).

La identificación de factores de riesgo es importante en la prevención e incidencia de cáncer y, aunque no hay estudios a la fecha sobre el riesgo real del consumo de mariscos contaminados con VDM, los hallazgos indican que las toxinas del grupo del AO se comportan como agentes tumorigénicos. En este contexto, el estudio utilizó células epiteliales normales podría aportar más información acerca de lo que ocurre tras una intoxicación en individuos normales. Como consecuencia del cambio climático y otros factores como, por ejemplo, la contaminación, el surgimiento y detección de estas toxinas es más frecuente, lo que puede aumentar en el futuro el riesgo de cáncer de tipo digestivo asociado al consumo de mariscos contaminados.

## **5. HIPÓTESIS**

Ácido Okadaico y sus análogos DTX-1 y DTX-2 potencian la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva de líneas celulares de epitelio de colon normales y tumorales.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar cambios inducidos por Ácido Okadaico, DTX-1 y DTX-2 en la sobrevivencia y movilidad celular, en las líneas celulares de cáncer de colon Sw480 y Sw620 y en la línea no tumoral de epitelio de colon CCD 841 CoN.

## **7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Comparar los efectos en viabilidad y muerte celular del Ácido Okadaico, DTX-1 y DTX-2, formulación comercial estandarizada, sobre líneas celulares de epitelio de colon (no tumoral y cancerosas).
2. Determinar la capacidad migratoria e invasiva de cada línea celular de epitelio de colon luego de la exposición a Ácido Okadaico, DTX-1 y DTX-2.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Cultivo celular

Las líneas celulares utilizadas corresponden a las líneas SW480 (ATCC® CCL-228™), SW620 (ATCC® CCL-227™) y CCD 841 CoN (ATCC® CRL-1790™). Los viales de las células fueron descongelados a baño maría a 37°C. El contenido fue traspasado a una placa T25 con 6 ml de medio Leibovitz's L-15 y RPMI-1640 suplementado, según cada línea, con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de Penicilina/Estreptomicina. Los cultivos de Sw480 y Sw620 fueron mantenidas a 37°C sin CO<sub>2</sub> y las células CCD 841 CoN (Con841) se deben mantener a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, según recomendación de la empresa ATCC.

### 8.2. Toxinas

En la siguiente tabla se encuentran las tres toxinas marinas de VDM utilizados en los ensayos celulares.

**Tabla 1: Toxinas marinas utilizadas en los ensayos celulares**

Toxina Estandarizada	Presentación	Procedencia
Ácido Okadaico (805,01 g/mol)	25ug Liofilizado	Cat. Ab120375, Abcam
DTX-1 (819,03 g/mol)	10,4 uM en MeOH 100%	Lot # 20151209, Certified Reference Materials Program, Canada
DTX-2 (805,00 g/mol)	4,7 uM en MeOH 100%	Lot # 20150819, Certified Reference Materials Program, Canada

### 8.3. Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. Se sembraron las células por triplicado en placas de 96 pocillos a una densidad de  $8 \times 10^3$  células/100 µl de medio de cultivo RPMI o DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS, dependiendo de la línea celular. Luego de un periodo de adhesión de 18 h, las células fueron tratadas con los distintos

extractos en concentraciones de 0, 20, 50, 100, 150 y 200 nM. Al término de 12 h se adicionaron 50 µl del reactivo MTT + solución Locke (NaCl 24 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4mM, KCl 5mM, HEPES 10mM, Glucosa 5mM, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2,3 mM, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1mM) a cada pocillo. Se incubó 3 h a 37°C en oscuridad, se descartó el MTT y se adicionó 50 µl de DMSO a cada pocillo, se volvió a incubar 20 min en agitación y se determinó la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de placas (Synergy HT, Biotek). El porcentaje de viabilidad se calculó utilizando la siguiente fórmula: (%) = (X\*100%)/Y, donde X es la absorbancia de las células tratadas e Y es la absorbancia de las células no tratadas. A partir de este ensayo, se determinaron valores de IC50 para cada toxina. Los valores de IC50 fueron utilizados para los ensayos posteriores.

#### **8.4. Extracción de proteína totales**

Las células fueron sembradas a confluencia en placas de 60mm, fueron tratadas por 12h con las toxinas en concentraciones equivalentes a la IC50 obtenidos en el ensayo de MTT. Para la ruptura celular se utilizó buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, EGTA 1mM, NP-40 1% v/v, a pH 7,4) en presencia de inhibidores de proteasas (Roche, Cat 11-836-170-001) a 4°C. Los homogeneizados fueron centrifugados a 13500rpm por 15min a 4°C. Los sobrenadantes fueron recolectados y cuantificados por el método de Bradford.

#### **8.5. Ensayo de inhibición de PP2A**

El ensayo de inhibición de PP2A se realizó mediante el kit PP2A Immunoprecipitation Phosphatase Assay (Merck), según las instrucciones del fabricante. Las células fueron expuestas a las toxinas en concentraciones equivalentes a la IC50 obtenidos en el ensayo de MTT por 12h, luego fueron cosechadas y se extrajeron las proteínas con buffer RIPA e inhibidor de proteasas, según el procedimiento descrito anteriormente. Muestras fueron cuantificadas utilizando reactivo de Bradford. Se tomaron 50µg de proteína de cada muestra, las muestras se incubaron con 4 µg de anticuerpo Anti-PP2A, subunidad C, clon 1D6 y 25 µL de Proteína A agarosa y se incubó por 2h a 4°C en movimiento constante. Luego de 3 lavados, se agregó el fosfopéptido diluido al inmuprecipitado y se incubó nuevamente 10min a 30°C en movimiento constante. Se centrifugaron las muestras y se transfirieron 25 µL de

muestra a la placa de 96 pocillos, se adicionó 100  $\mu$ L de Solución de detección verde malaquita fosfato. Se incubaron las muestras por 15min y se realizó la lectura a 650nm en lector de placas (Synergy HT, Biotek).

## **8.6. Western Blot**

Para los análisis se utilizaron 25  $\mu$ g de proteínas totales. Las muestras fueron calentadas a 95°C por 5min, se cargaron en un gel denaturante de SDS-poliacrilamida al 10% y se sometieron a electroforesis a 100V por 2,5h. Luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (poro 0,45  $\mu$ m BioRad) a 300 mA por 1,5h la cual, posteriormente, se bloqueó en BSA 5% en TBS- Tween 0,1%. La incubación con el anticuerpo primario se realizó toda la noche con agitación a 4°C, mientras que la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a HRP- anti- ratón (Jackson Immunoresearch, Cat. 115-035-003) y anti- conejo (Jackson Immunoresearch, Cat. 111-035-003) fue por 1,5h a temperatura ambiente. Para revelar la actividad de la enzima HRP se agregó el sustrato quimioluminiscente ECL (EZ- ECL kit, Biological Industries), cuya luminiscencia fue detectada en un revelador automático Fusion FX (Vilber Lourmat, France). Las bandas se cuantificaron utilizando el programa Image-J (USA). Para los ensayos se utilizaron los siguientes anticuerpos: PCNA (PC10: sc-56, Santa Cruz), Caspasa 8 (4.1.20: sc-7356, Santa Cruz), ILK1 (4G9) mAb (#3856, Cell Signaling), FAK Ab Sampler Kit (#9330, Cell Signaling) y  $\beta$ -actina como control de carga (Immuno MP Bio, Cat. 69100).

## **8.7. Ensayos de muerte celular**

Para analizar el efecto de AO, DTX-1 y DTX-2 sobre las distintas líneas, se utilizó el ensayo AnexinV por citometría de flujo, se utilizó el kit FITC AnnexinV (BD Pharmingen™) según las instrucciones del fabricante. Las células fueron sembradas a una densidad de  $10^6$  y fueron tratadas con las toxinas por 12h. Luego del tratamiento, las células fueron tripsinizadas, lavadas con PBS frío y centrifugadas a 2500 rpm por 5min. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 1x Binding Buffer a una concentración de  $10^6$  células/mL. Se transfirieron 100  $\mu$ L de suspensión celular a un tubo de citometría y se adicionaron 5  $\mu$ L de FITC AnnexinV y 10  $\mu$ L de PI, los tubos fueron incubados por 15min a temperatura ambiente

en oscuridad. Finalmente, se agregaron 400ul de 1x Binding Buffer a cada tubo y se realizó el análisis mediante citometría de flujo.

Además, se evaluó apoptosis mediante el kit Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de  $10^4$  células/pocillo, luego de un periodo de adhesión de 18h, fueron tratadas con las toxinas. Terminado el periodo de incubación, se removió el medio y se agregaron 50 µL de medio fresco y 50 µL de Reactivo Caspase-Glo® 3/7, la placa fue agitada por 30 seg y posteriormente se incubó a temperatura ambiente 1,5h y luego, se realizó la medición de luminiscencia en lector de placas (Synergy HT, Biotek).

### **8.8. Citotoxicidad**

Para evaluar la citotoxicidad, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de  $10^4$  células por pocillo, se utilizó el kit Pierce LDH Citotoxicity Assay (Cat. 88954, Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, luego de 12h de incubación con las toxinas, se agregaron 10 µL de Buffer de Lisis (10x) a los controles de actividad máxima de LDH y la placa se volvió a incubar por 45min en estufa a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. Luego se transfirieron 50 µL de medio a un pocillo nuevo y se agregaron 50 µL de Mix de reacción, las placas fueron incubadas por 30min a temperatura ambiente, protegidas de la luz, finalmente, se agregó 50 µL de Solución de Stop y se midió absorbancia a 490 y 680nm. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como porcentaje del control de actividad máxima incluido en el kit.

### **8.9. Ensayo de cierre de herida**

Para estudiar el efecto de las toxinas marinas AO, DTX-1 y DTX-2 sobre las capacidades migratorias e invasivas de las células se utilizó el ensayo de cierre de herida. El ensayo de herida se realizó cultivando las células en placas de 24 pocillos hasta alcanzar una confluencia >90%, momento en que se hizo la herida con un tip estéril. El cierre o cicatrización de la herida se monitoreó por fotografía a las 6, 12 y 24h.

## 8.10. Migración e Invasión

Para determinar las capacidades migratorias e invasivas de las células se realizaron ensayos utilizando un kit basado en el ensayo de cámara de Boyden. El ensayo de migración en *transwell* se realizó en placas CytoSelect™ (CellBiolabs) de 96 pocillos con poros de 8 µm. Se sembraron 10000 células por pocillo en la cámara superior, con la base de la cámara cubierta por una membrana de policarbonato. Después de la incubación, las células que migraron a la superficie inferior de los filtros fueron teñidas y cuantificadas por lectura a 560 nm en lector de placas (Synergy HT, Biotek). Para el ensayo de invasión en cámaras *transwell* se utilizaron placas CytoSelect™ (CellBiolabs) de 96 pocillos con poros de 8 µm cubiertas con matrigel siguiendo el mismo protocolo utilizado para el ensayo de migración.

## 8.11. Extracción de RNA

Las células fueron sembradas a confluencia en placas de 60mm y tratadas con las toxinas por 12h en las concentraciones de IC50 obtenidas mediante el ensayo de MTT. Luego de la incubación las células fueron lisadas con trizol (Gibco, Cat. 15596-026) y la extracción se realizó de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La concentración de RNA y su pureza fueron medidas por espectrofotometría a 260 y 280nm en lector de placas (Synergy HT, Biotek).

## 8.12. PCR en tiempo real

Se utilizaron 2 µg de RNA para la obtención de cDNA utilizando el kit Affinity Script QPCR CDNA Synthesis de Agilent Tech (Cat. 600559), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidos el cDNA se realizó la reacción de PCR en tiempo real para determinar la expresión de los siguientes genes, utilizando los siguientes partidores: ILK (s): 5' – CTT CCC TGG ATC ACT CCA CAG- 3', (a): 5'- GGG AGA AGC CAT GAT CGT CC- 3', FAK (s): 5'- CAG GGT CCG ATT GGA AAC CA- 3', (a): 5' – CTG AAG CTT GAC ACC CTC GT – 3', como control se ocupó el gen PUM1 (Pumilio) (s): 5'-CGG TCG TCC TGA GGA TAA A- 3', (a): 5'- CGT ACG TGA GGC GTG AGT AA-3'. Se utilizó el kit Brilliant II SYBR green QPCR Master Mix de Agilent Tech (Cat. 600828) y el equipo Aria Mx Real Time PCR de Agilent



Tech (Modelo 68830A) que incluye el programa AriaMX 1.0 para análisis y cuantificación de los datos.

### **8.13. Análisis Estadístico**

Los datos serán compilados y analizados utilizando el programa GraphPad Prism 6.0. Para variables con distribución normal, la comparación de las medias se realizará con el test t de Student. Para variables sin distribución normal, la comparación de las medias se realizará con el test no paramétrico de los signos de Wilcoxon. El intervalo de confianza a utilizar para todas las pruebas será de un 95% con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Objetivo Específico 1

Objetivo específico 1: 1. *Comparar los efectos celulares y citotóxicos del Ácido Okadaico, DTX-1 y DTX-2, formulación comercial estandarizada, sobre líneas celulares de epitelio de colon (no tumoral y cancerosas).*

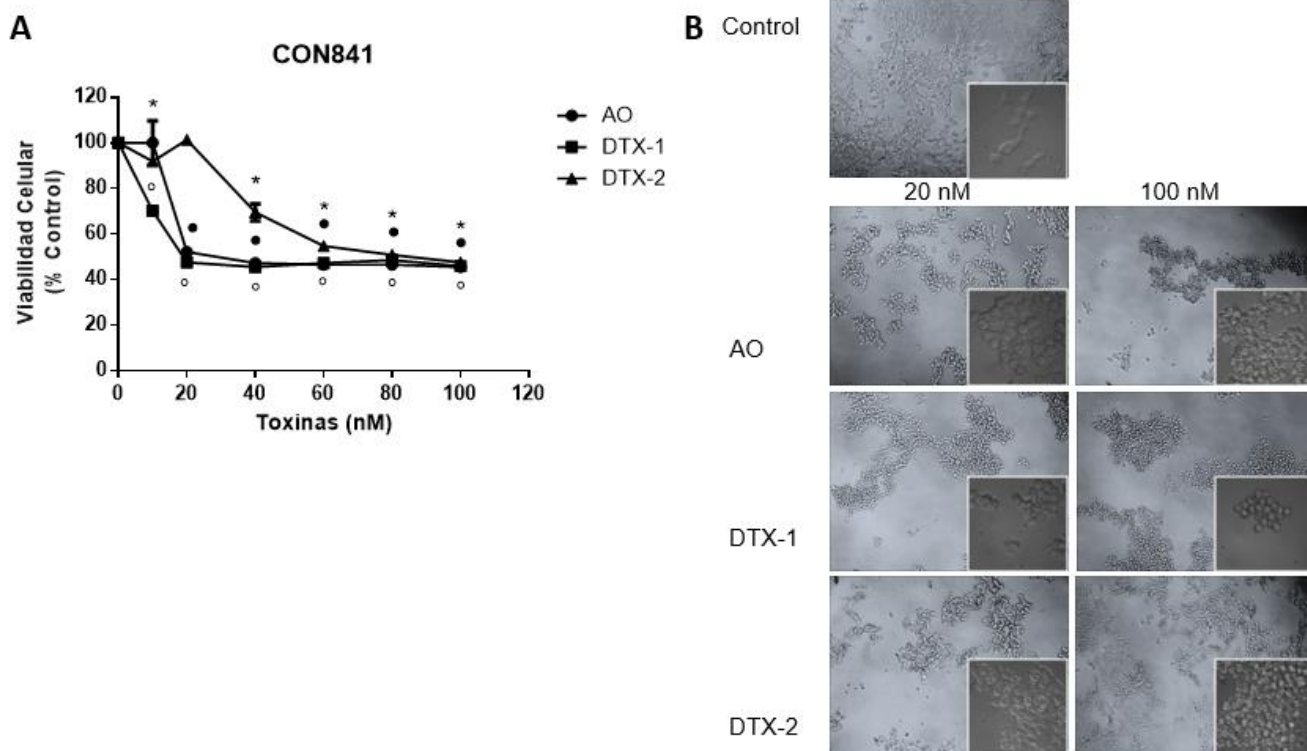
#### 9.1.1. Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT y la lectura se realizó al término de 12h de incubación, los porcentajes fueron obtenidos con respecto a la media de los controles sin toxina. En las figuras 3A, 4A y 5A se pueden apreciar las curvas de viabilidad de las líneas Con841, Sw480 y Sw620 respectivamente, luego del tratamiento de 12h con AO, DTX-1 y DTX-2. Al aplicar una dosis de 20nM de las tres toxinas, sobre células Con841, éstas pierden adhesión, se vuelven esféricas y tienden a agruparse (Ver figura 3B); en tanto que, en las líneas tumorales (Sw480 y Sw620) a 20nM de toxina no se observan diferencias, sin embargo, luego de la aplicación de una dosis de 100nM se puede apreciar que las células se vuelven esféricas, y algunas se desprenden, como respuesta al efecto de estas toxinas sobre las proteínas del citoesqueleto (Ver figuras 4B y 5B).

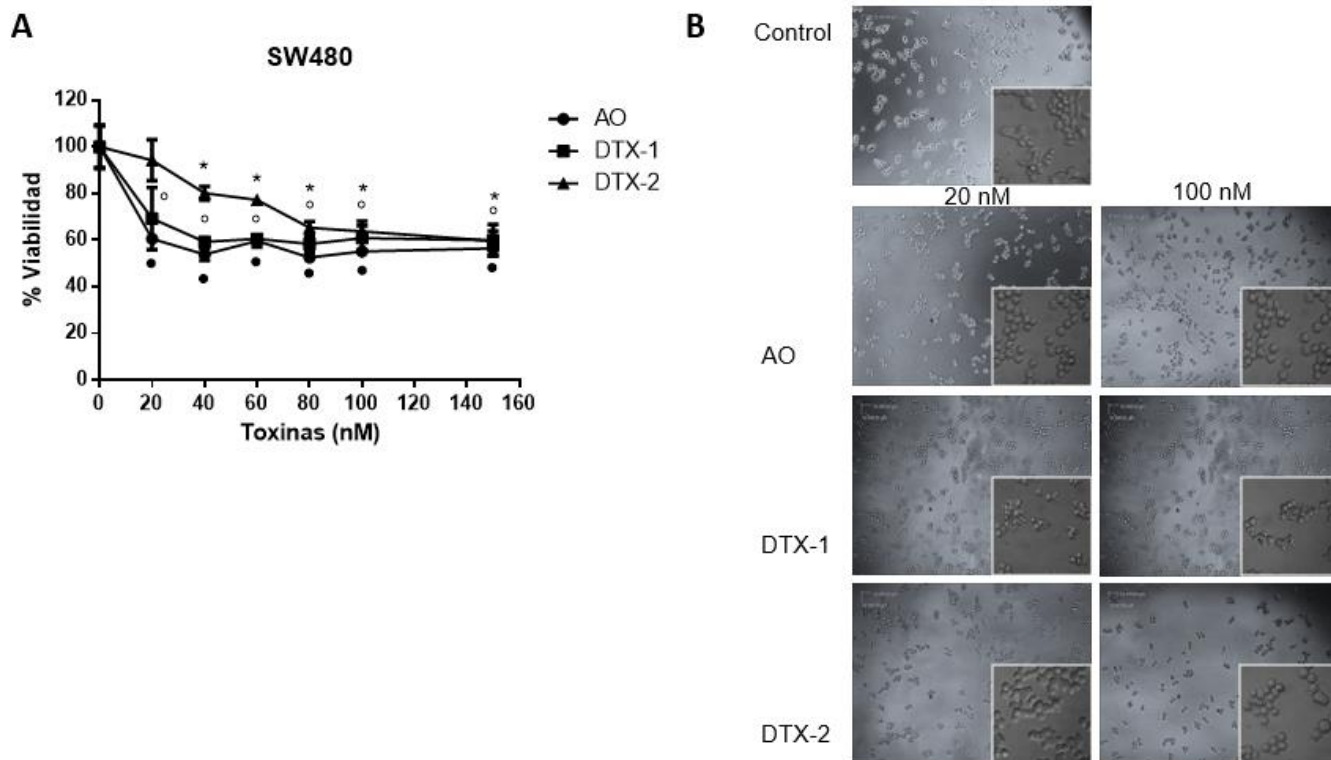
De manera comparativa, los resultados de viabilidad mostraron que la línea Sw620 es más resistente a las tres toxinas, ya que los valores de IC50 son mayores que los valores de IC50 de las otras líneas celulares (Ver tabla 2). DTX-2 es la toxina menos potente, lo cual concuerda con la literatura y, por otra parte, las toxinas AO y DTX-1 son más tóxicas para las células, tanto las líneas tumorales como la línea no tumoral. Las concentraciones que se muestran en la Tabla N°2 fueron las utilizadas para los ensayos posteriores.

**Tabla 2: Valores de IC50 para cada toxina obtenidos a partir de ensayo de MTT**

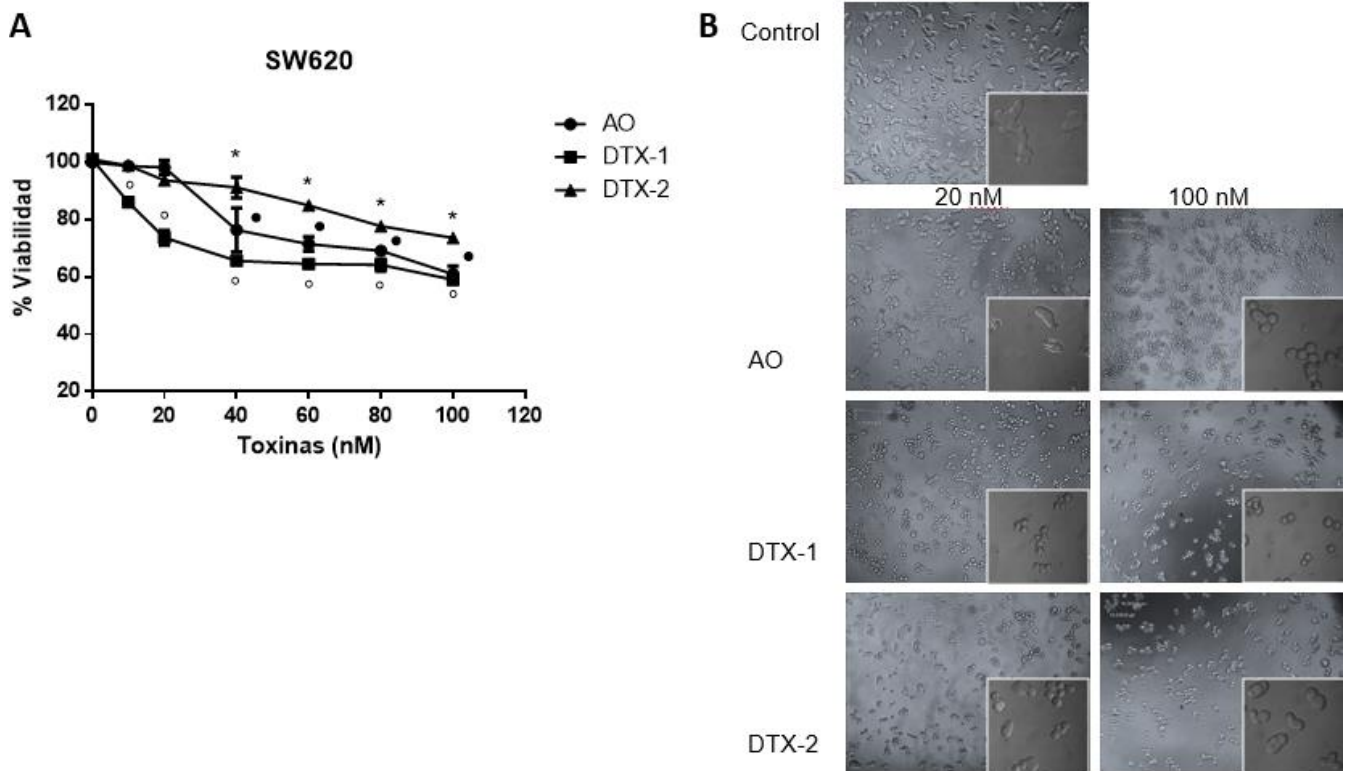
Línea Celular	IC50 AO (nM)	IC 95%	IC50 DTX-1 (nM)	IC (95%)	IC50 DTX-2 (nM)	IC (95%)
Con 841	<b>54.4</b>	36,58- 80,84	<b>43.5</b>	29,71- 63,78	<b>81.2</b>	70,28- 93,75
Sw480	<b>89.1</b>	65,31- 121,6	<b>113.8</b>	83,86- 154,3	<b>187.2</b>	163,6- 214,2
Sw620	<b>137.8</b>	99,96- 189,9	<b>192.9</b>	150,6- 247,0	<b>202.9</b>	179,6- 229,2



**Figura 3:** Viabilidad línea celular Con841. A. Gráfico de viabilidad línea Con841 luego de 12h de incubación AO, DTX-1 y DTX-2. ● Diferencia significativa AO vs. control no tratado ° Diferencia significativa DTX-1 vs. control no tratado \* Diferencia significativa DTX-2 vs. control no tratado. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student.  $p < 0,05$ ,  $n=3$ . B. Microscopía de campo claro de cultivo celular Con841 post tratamiento, concentraciones de 20 y 100 nM de cada toxina. 100x y 400x inserto inferior.



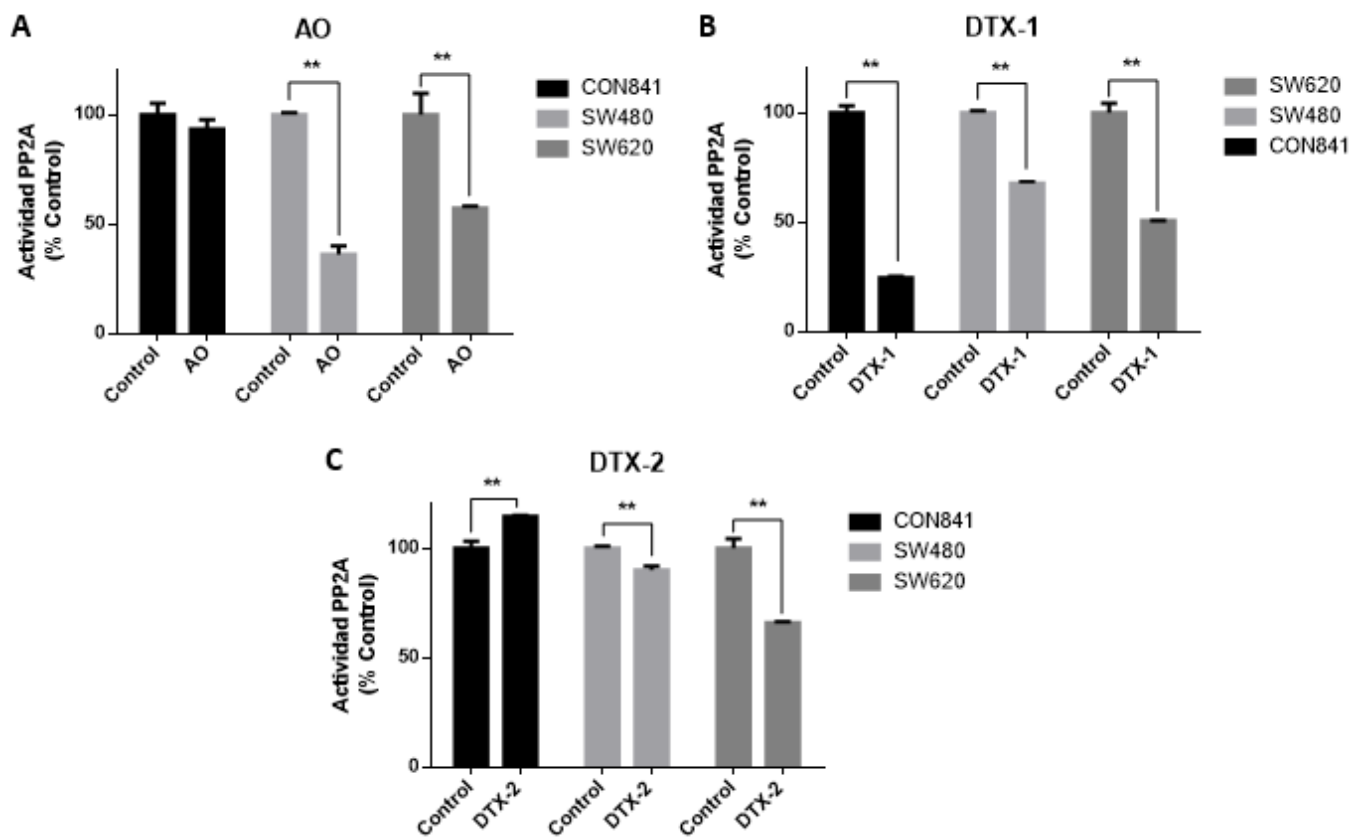
**Figura 4:** Viabilidad línea celular Sw480. A. Gráfico de viabilidad línea Sw480 luego de 12h de incubación AO, DTX-1 y DTX-2. ● Diferencia significativa AO vs. control no tratado ° Diferencia significativa DTX-1 vs. control no tratado \* Diferencia significativa DTX-2 vs. control no tratado. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student.  $p < 0,05$ ,  $n=3$ . B. Microscopía de campo claro de cultivo celular SW480 post tratamiento, concentraciones de 20 y 100 nM de cada toxina. 100x y 400x inserto inferior.



**Figura 5:** Viabilidad línea celular Sw620. A. Gráfico de viabilidad línea Sw620 luego de 12h de incubación AO, DTX-1 y DTX-2. ● Diferencia significativa AO vs. control no tratado ° Diferencia significativa DTX-1 vs. control no tratado \* Diferencia significativa DTX-2 vs. control no tratado. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student.  $p < 0,05$ ,  $n=3$ . B. Microscopía de cultivo celular SW620 post tratamiento, concentraciones de 20 y 100 nM de cada toxina. 100x y 400x inserto inferior.

### 9.1.2. Determinación actividad PP2A

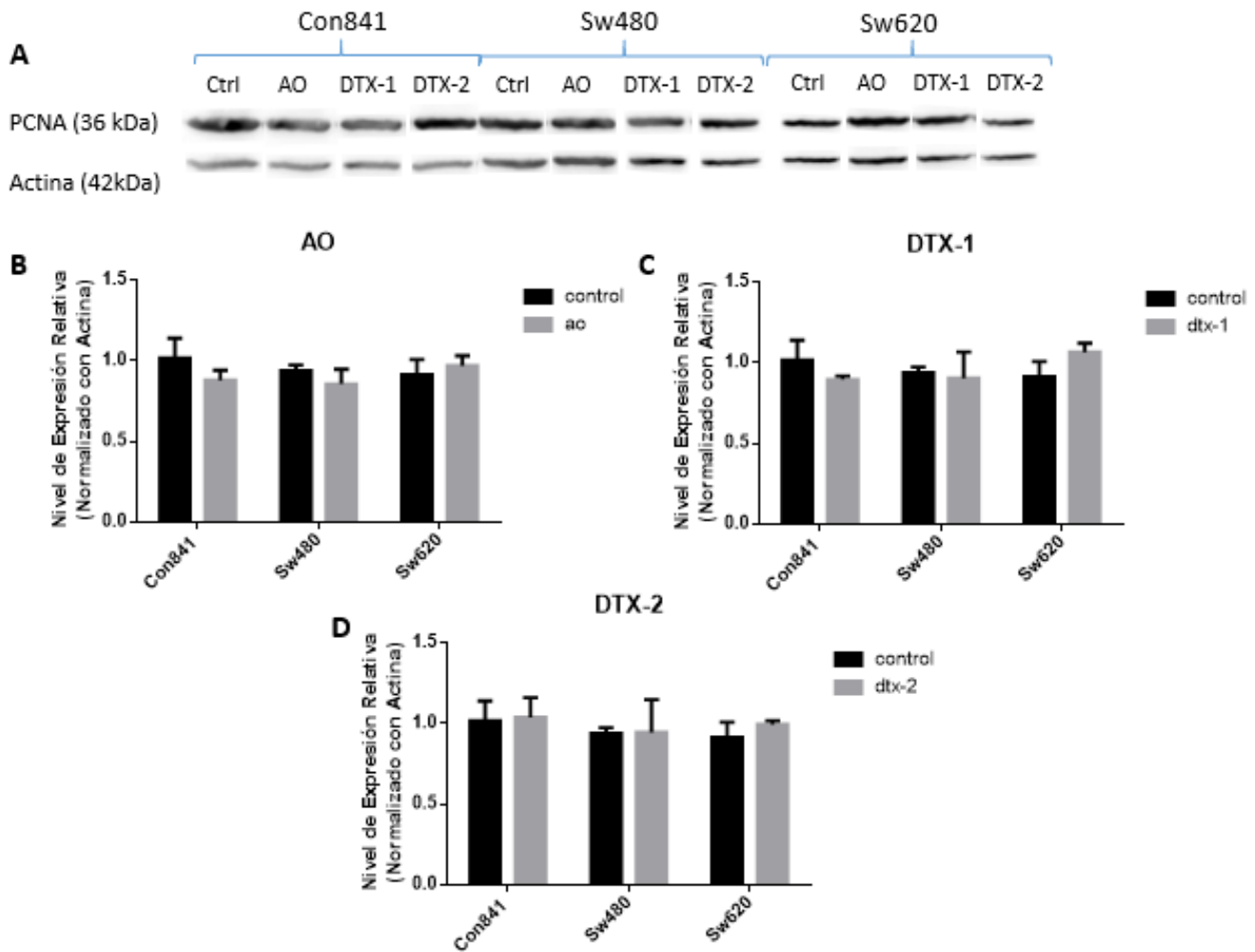
Los porcentajes de inhibición de actividad PP2A fueron obtenidos con respecto a la media de los controles sin toxina. Según los resultados obtenidos, al tratar las líneas celulares con AO, se constató que la actividad PP2A sólo se vio significativamente disminuida en las líneas celulares tumorales (Sw480 y Sw620). Con el tratamiento DTX-1 se observó la disminución importante de la actividad PP2A en las tres líneas celulares (Con841: 24,6%; Sw480: 67,8%; Sw620: 50,7%) y con el tratamiento DTX-2 se evidenció que la disminución de la actividad PP2A fue menor para las líneas celulares tumorales (Sw480: 90% y Sw620: 66%), en contraste con el aumento de actividad para la línea no tumoral (Con841: 114,5%) como se observa en la figura 6.



**Figura 6:** Actividad PP2A en líneas celulares normales y tumorales de colon. Las células de las líneas Con841, Sw480 y Sw620 se trataron 12h con las toxinas AO (A), DTX-1 (B) y DTX-2 (C) en concentraciones equivalentes al IC50 obtenidos por ensayo de MTT, posteriormente se utilizó el kit PP2A Immunoprecipitation Phosphatase Assay (Merck) según las instrucciones del fabricante para medir actividad PP2A. Las barras indican promedio con respecto al control  $\pm$  Error estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. n=3, \*\* p< 0,01

### 9.1.3. Proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada a través del marcador PCNA mediante western blot. Los resultados muestran que no hubo variaciones estadísticamente significativas en la expresión proteica de PCNA para las dosis de toxinas y tiempo de incubación aplicado. Sin embargo, se observa una tendencia a aumentar la expresión de PCNA en línea Sw620 y una tendencia a disminuir la expresión de la proteína en la línea Con841. Los resultados de los resultados de la expresión de PCNA mediante western blot se muestran en la figura N° 7.

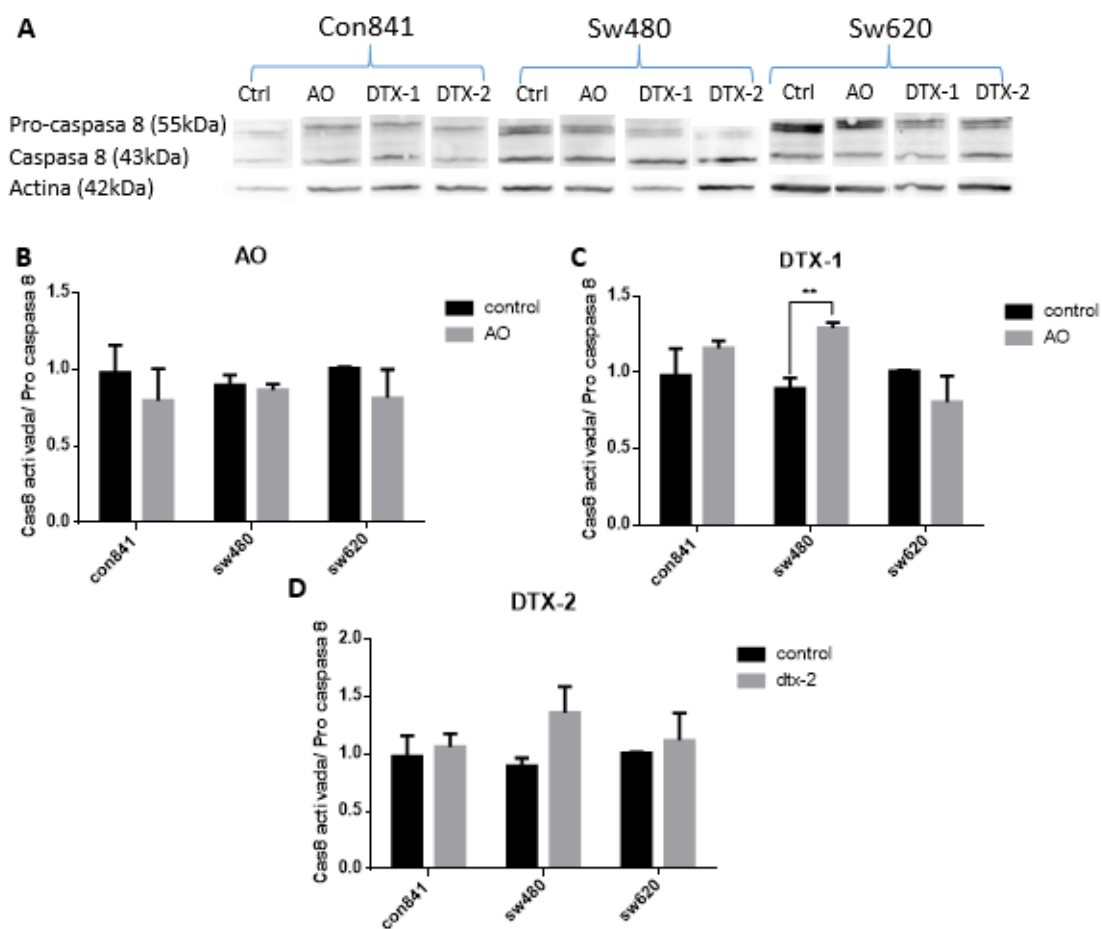


**Figura 7:** Evaluación de antígeno de proliferación celular PCNA. A. Resultados de western blot PCNA de líneas celulares Con841 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2), Sw480 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2) y Sw620 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2). Las células fueron tratadas con concentraciones equivalentes al IC50 obtenidos por ensayo de MTT. B. Nivel de expresión relativa de PCNA en células tratadas con AO (n=3). C. Nivel de expresión relativa de PCNA en células tratadas con DTX-1 (n=3). D. Nivel de expresión relativa de PCNA en células tratadas con DTX-2 (n=3). Las barras indican promedio  $\pm$  Error estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. \*p< 0,05

#### 9.1.4. Evaluación de muerte celular

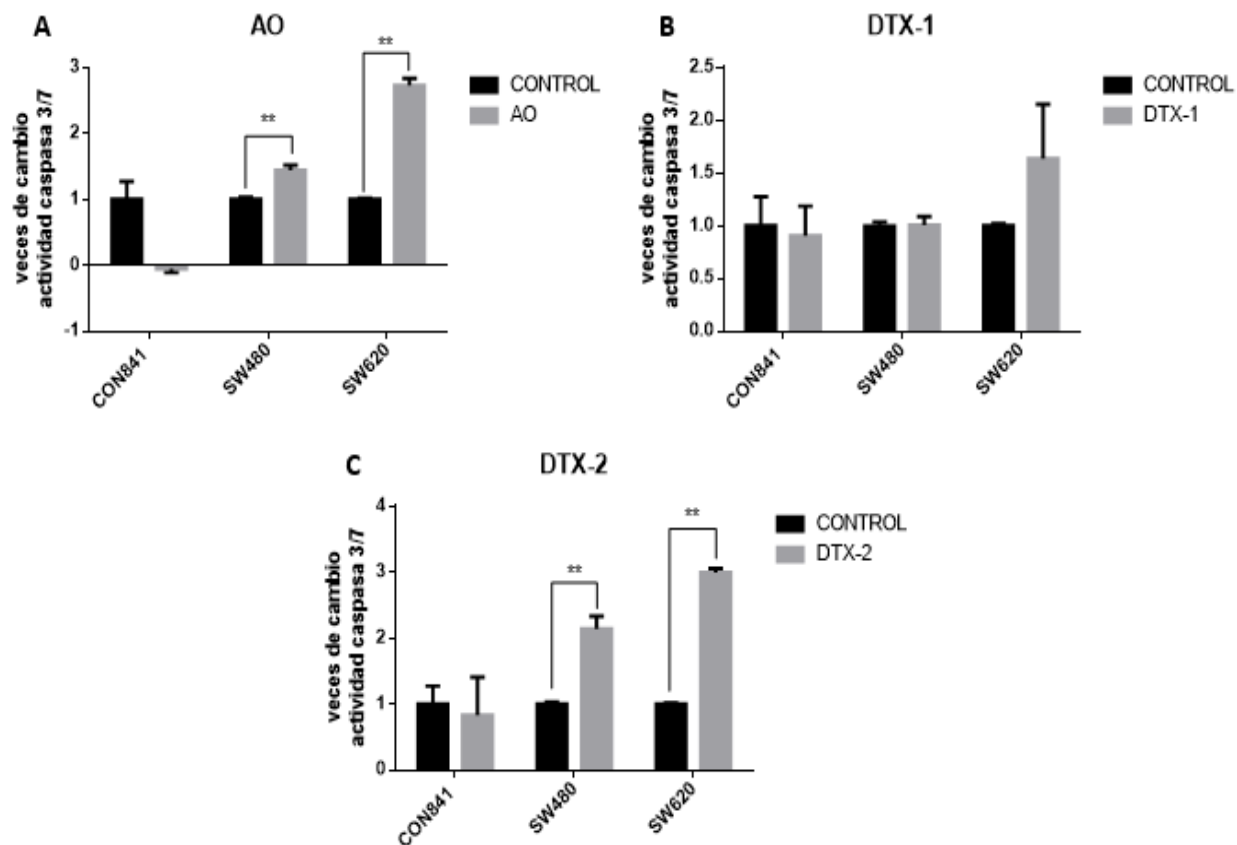
En la figura 8 se puede observar que la expresión proteica de Caspasa-8 activada no cambia en ninguno de los tratamientos para las líneas Con841 y Sw620, solo hay un aumento significativo de la expresión en la línea Sw480 luego del tratamiento con DTX-1. Los

resultados de Caspasa 3/7 activada muestran aumentos significativos en las líneas tumorales (Sw480 y Sw620) luego de los tratamientos con AO y DTX-2 (figura 9).



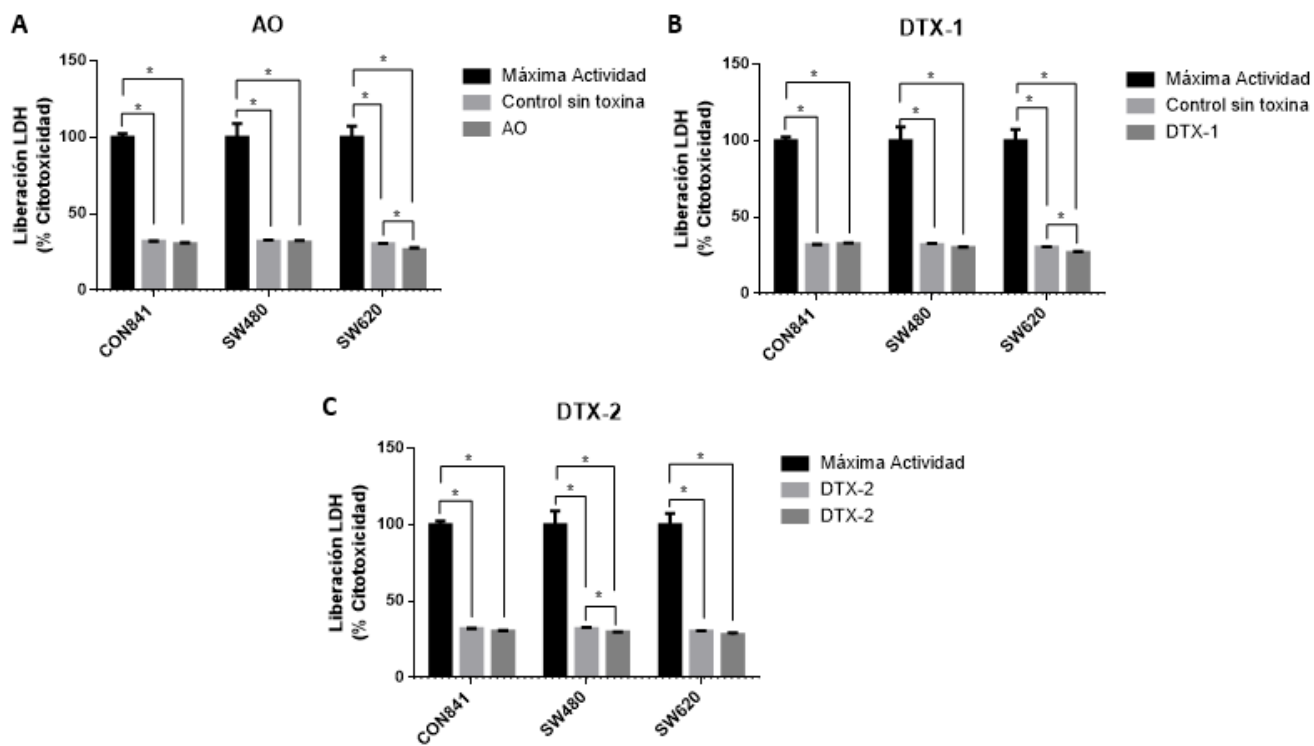
**Figura 8:** Evaluación de Caspasa 8 activada. A. Resultados de western blot PCNA de líneas celulares Con841 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2), Sw480 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2) y Sw620 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2). Las células fueron tratadas con concentraciones equivalentes al IC50 obtenidos por ensayo de MTT. B. Nivel de expresión relativa de Caspasa 8 en células tratadas con AO (n=3). C. Nivel de expresión relativa de Caspasa 8 en células tratadas con DTX-1 (n=3). D. Nivel de expresión relativa de caspasa 8 en células tratadas con DTX-2 (n=3). Las barras indican promedio ± Error estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. \*\*p<0,01



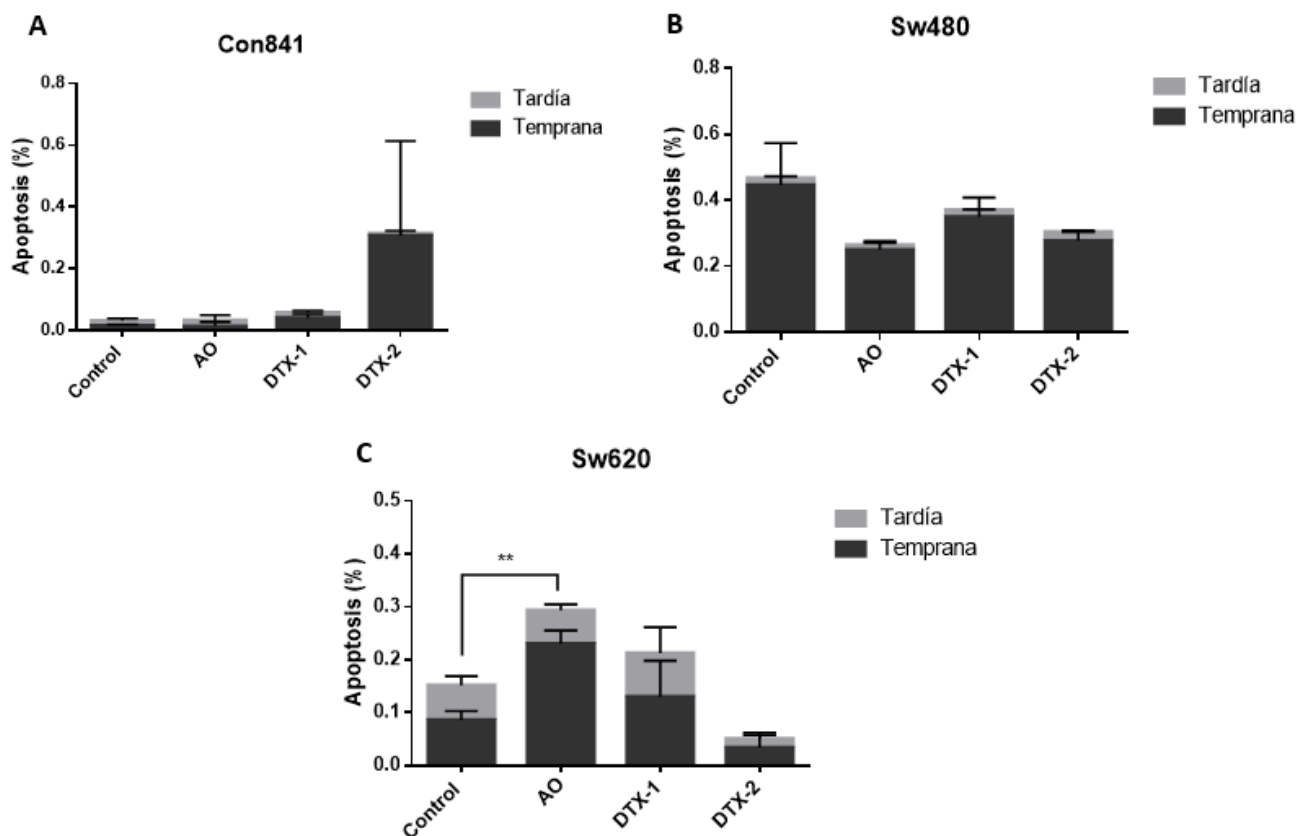


**Figura 9:** Evaluación de actividad Caspasa 3/7. Las líneas celulares Con841, Sw480 y Sw620 fueron incubadas por 12h con AO (A), DTX-1 (B) y DTX-2(C) con concentraciones equivalentes al IC50 de cada toxina obtenidos por ensayo de MTT, luego la apoptosis celular fue medida mediante Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega). Los valores se expresan como porcentaje del control. Las barras indican promedio  $\pm$  Error estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. n=3, \*\*p<0,001.

La figura 10 muestra los resultados de citotoxicidad medido mediante el ensayo de LDH, los porcentajes fueron obtenidos con respecto a la media del control máximo de actividad LDH. Los resultados muestran aumentos una disminución de la liberación de LDH en todas las muestras, tratadas y no tratadas, valores cercanos al 30% respecto al control de máxima actividad. Existiendo incluso una disminución de la actividad LDH en las líneas tumorales luego del tratamiento con las toxinas, tendencia que llega a ser estadísticamente significativa para la línea Sw620 tratamientos con AO y DTX-1 y para la línea Sw480 tratamiento con DTX-2.



**Figura 10:** Citotoxicidad determinada mediante ensayo de LDH. Las células fueron tratadas por 12h con AO (A), DTX-1 (B) y DTX-2(C) con concentraciones equivalentes al IC50 de cada toxina obtenidos por ensayo de MTT, posteriormente, se midió LDH en el medio utilizando el kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay según instrucciones del fabricante. Las barras indican promedio con respecto al control máximo de actividad LDH  $\pm$  Error estándar, Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. n=4, \*p< 0,05.



**Figura 11:** Evaluación de apoptosis mediante Annexina V / PI por citometría de flujo. Las células Con841, Sw480 y Sw620 tratadas por 12h con AO, DTX-1, DTX-2 en concentraciones iguales a IC50 obtenidas mediante MTT. La población de apoptosis temprana es caracterizada por Annexina V (+) y PI (-), la población de apoptosis tardía es caracterizada por Annexin V (+) y PI (+). Las barras representan media  $\pm$  Error Estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. N= 3, \*\*p < 0.01

Al observar los resultados de la tabla 3, el ensayo de AnnexinaV / PI por citometría de flujo muestra que en los controles sin toxina existe un porcentaje de muy bajo de células en estado activo de apoptosis temprana (Annexina V (+) y PI (-)), apoptosis tardía (Annexina V (+) y PI (+)) y necrosis (Annexina V (-) y PI (+)). En la figura 11 es posible ver que no se ven cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de células apoptóticas (tardía y temprana) luego de los tratamientos en todas las líneas celulares, solo es posible observar un aumento significativo en las células Sw620 luego del tratamiento con AO.

**Tabla 3: Porcentaje de células viables, en necrosis y apoptosis analizado mediante citometría de flujo para Annexina V/ PI.**

Tratamientos		%Células Viables	%Células en necrosis	%Células en apoptosis
<b>Con841</b>	Control	99,80	0,20	0,03
	AO	99,90	0,06	0,03
	DTX-1	99,90	0,10	0,06
	DTX-2	99,67	0,03	0,31
<b>Sw480</b>	Control	99,53	0,00	0,47
	AO	99,70	0,00	0,26
	DTX-1	99,60	0,00	0,37
	DTX-2	99,70	0,00	0,30
<b>Sw620</b>	Control	99,80	0,02	0,15
	AO	99,70	0,01	0,29
	DTX-1	99,70	0,10	0,21
	DTX-2	99,90	0,08	0,05

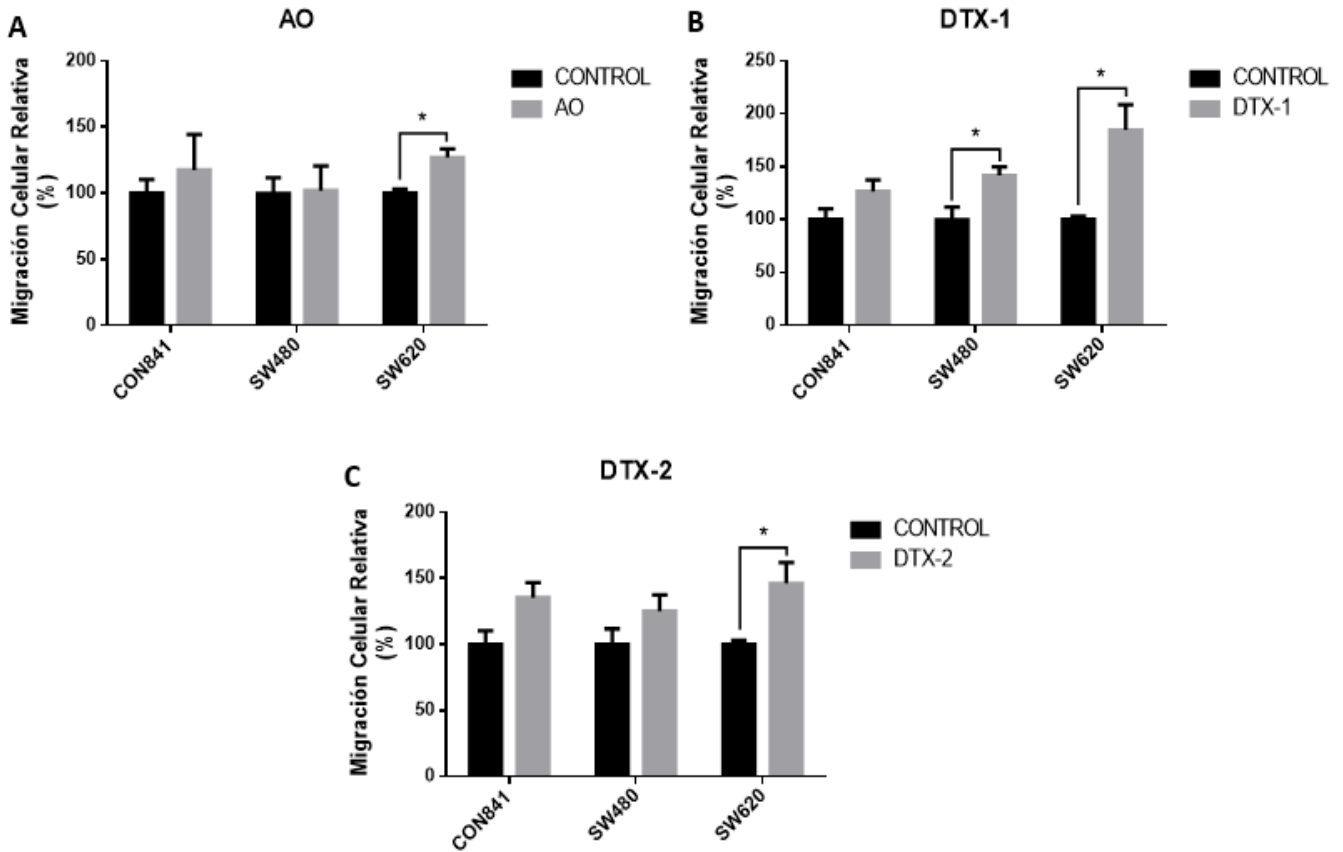
Las tres líneas celulares fueron incubadas con los distintos tratamientos por 12h en concentraciones equivalentes al IC50 calculado mediante el ensayo de MTT. Los datos representan el promedio de los datos (n=3).

## 9.2. Objetivo Específico 2

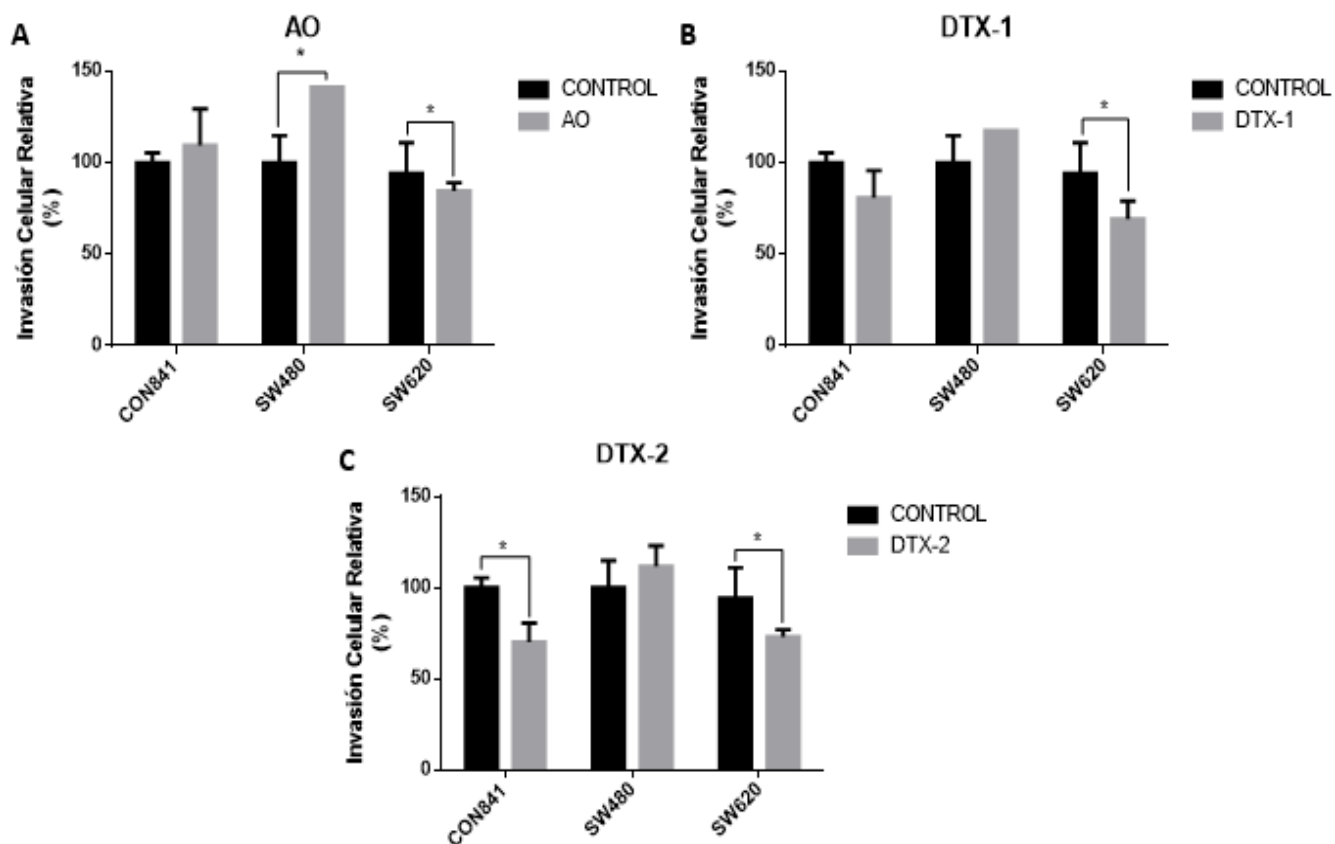
*Objetivo específico 2: Determinar la capacidad migratoria e invasiva de cada línea celular de epitelio de colon luego de la exposición a Ácido Okadaico, DTX-1 y DTX-2.*

### 9.2.1. Migración e invasión celular

De acuerdo con los resultados, la capacidad migratoria aumenta significativamente en las líneas tumorales luego de la exposición de DTX-1. Es posible observar en la figura 12 que en la línea Sw620 aumenta la migración luego del tratamiento con las 3 toxinas, lo que podría indicar la inducción de un fenotipo más agresivo por parte de las toxinas. Para el ensayo de invasión, solo se ve un aumento significativo de la capacidad invasiva en Sw480 luego del tratamiento con AO. Además, se encontró una disminución significativa en la capacidad invasiva de la línea Sw620 luego de la aplicación con las 3 toxinas (figura 13).



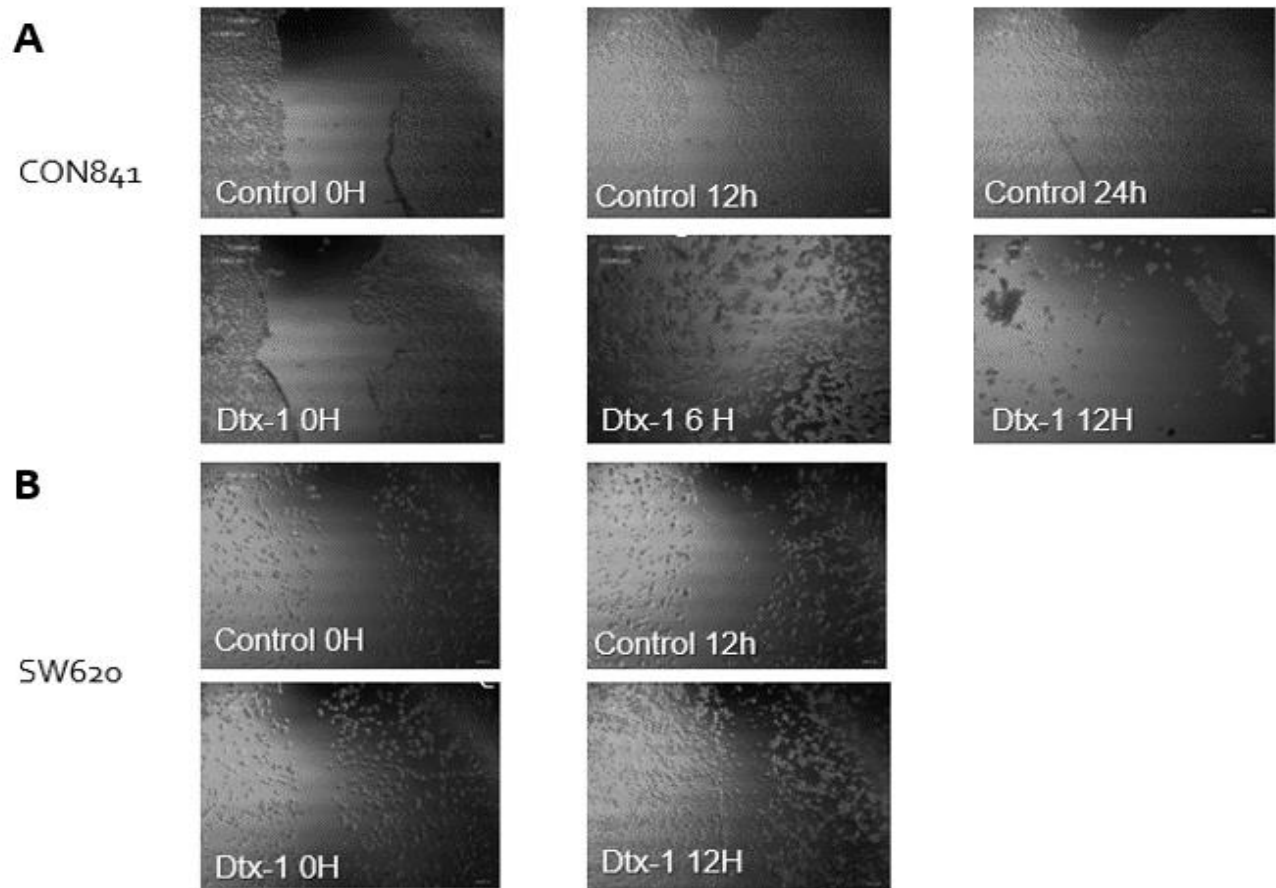
**Figura 12:** Evaluación de migración celular. Para evaluar la capacidad migratoria de las células se utilizaron cámaras *transwell*. Las células se incubaron 12h con las toxinas AO (A), DTX-1 (B) y DTX-2 (C) con concentraciones equivalentes al IC50 obtenidos por ensayo de MTT, luego se utilizó el kit CytoSelect™ (CellBiolabs) de 96 pocillos con poros de 8µm de migración. Las barras indican promedio ± Error estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. n= 4, \*p < 0,05



**Figura 13:** Evaluación de invasión celular. Para evaluar la capacidad invasiva de las células se utilizaron cámaras *transwell*. Las células se incubaron 12h con las toxinas AO (A), DTX-1 (B) y DTX-2 (C) con concentraciones equivalentes al IC50 obtenidos por ensayo de MTT, luego se utilizó el kit CytoSelect™ (CellBiolabs) de 96 pocillos con poros de 8µm de invasión. Las barras indican promedio ± Error estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. n = 4, \*p < 0,05.

### 9.2.2. Ensayo de cierre de herida

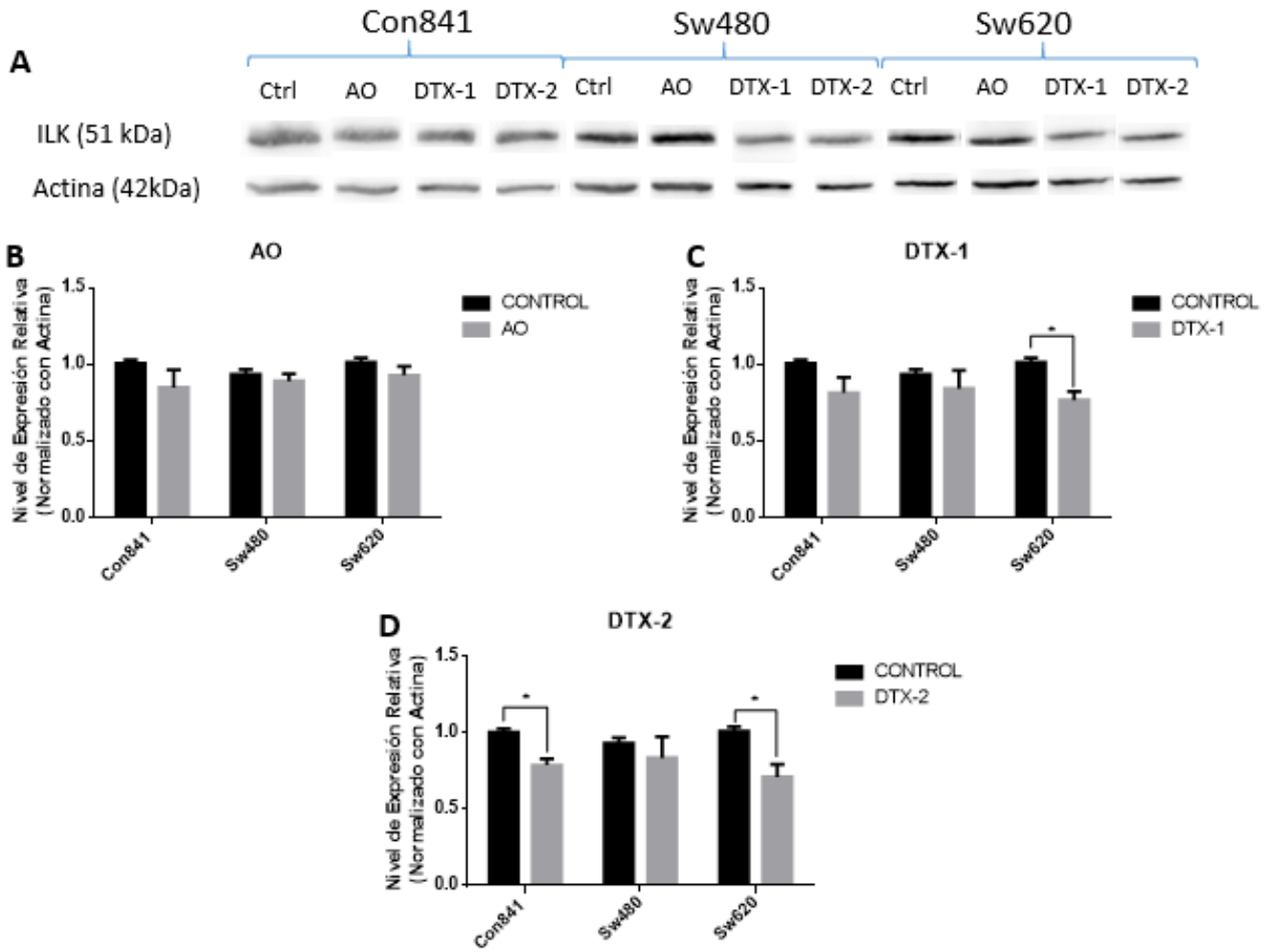
Para el ensayo de herida, se realizaron ensayos con células Con841 y Sw620. Estas células se sembraron en placas de 12 pocillos, incubándose por 12h con DTX-1 una vez que el cultivo se encontraba confluyente. Terminado el período de incubación se realizó la herida, las células se despegaron de la placa luego de la exposición a DTX-1, por lo que no es posible realizar el ensayo de herida. Como se observa en la figura 14, la herida cierra en los pocillos control (sin toxina), sin embargo, en los pocillos con tratamiento las células se desprenden, se vuelven esféricas y posteriormente mueren, como producto del efecto directo de la aplicación de la toxina, la que provoca un reordenamiento del citoesqueleto y posteriormente la muerte celular.



**Figura 14:** Ensayo de cierre de herida en células Con841 y Sw620. 200x. Ensayo de prueba en líneas celulares Con841 y Sw620 tratadas 12h con DTX-1. A. Para células Con841 se observa que las células se despegan completamente a las 6h post tratamiento. En la placa control, la herida cierra casi completamente a las 24h. B. En las células Sw620, se observa que las células expuestas a DTX-1 se despegan casi en su totalidad a las 12h post tratamiento.

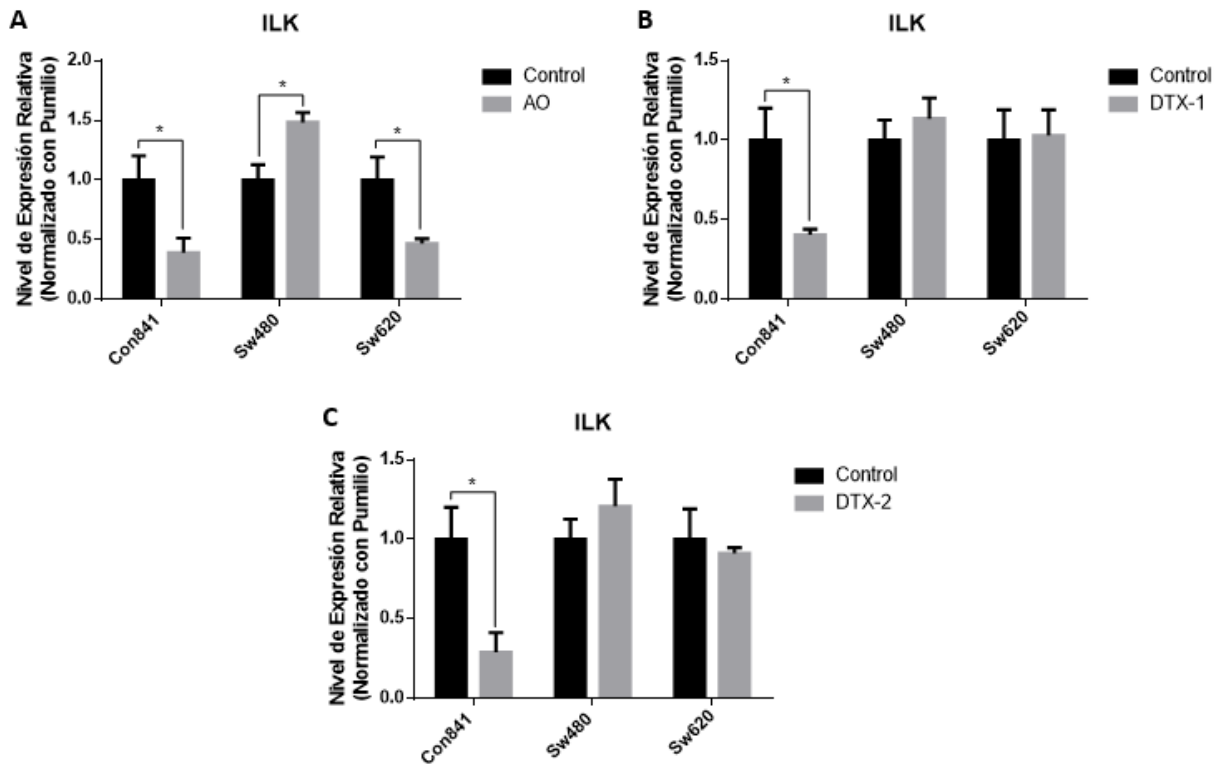
### 9.2.3. Evaluación de Marcadores de Migración celular

En relación con la expresión proteica de ILK, se observó una disminución significativa en su expresión en células Sw620 luego de la aplicación de DTX-1 y DTX-2, en tanto, que el tratamiento con AO no produjo cambios significativos (figura 15). En la figura 16 se puede observar que la expresión de ARNm de ILK se ve significativamente disminuido (>50%) en todos los tratamientos. Para las líneas tumorales, solo hay cambios significativos de la expresión de ARNm en el tratamiento con AO.



**Figura 15:** Evaluación de antígeno ILK A. Resultados de western blot ILK de líneas celulares Con841 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2), Sw480 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2) y Sw620 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2). Gel poliacrilamida 10%. B. Nivel de expresión relativa de ILK en células tratadas con AO (n=3). C. Nivel de expresión relativa de ILK en células tratadas con DTX-1 (n=3). D. Nivel de expresión relativa de ILK en células tratadas con DTX-2 (n=3). Las barras indican promedio  $\pm$  Error estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. \*p<0,05.

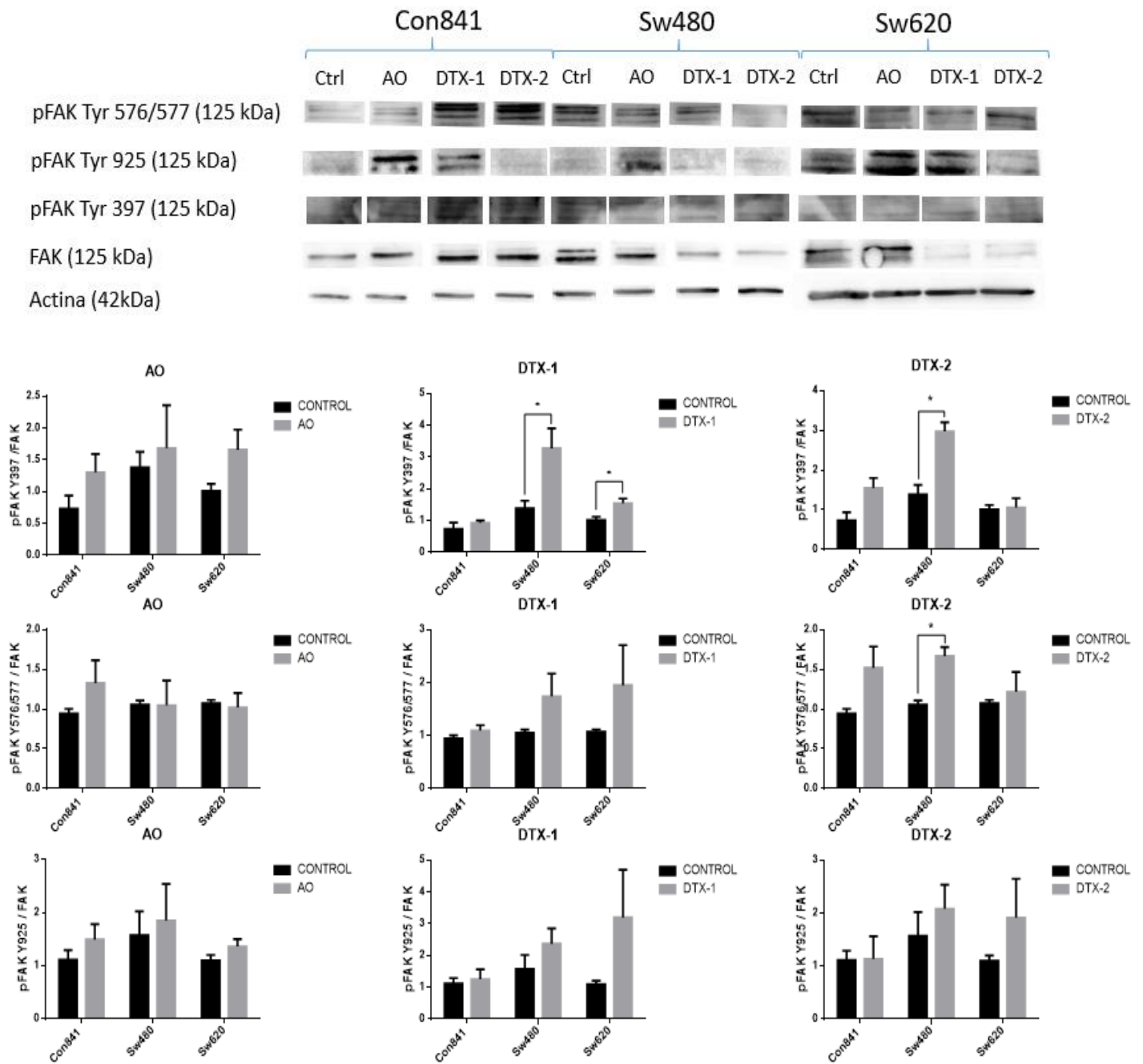




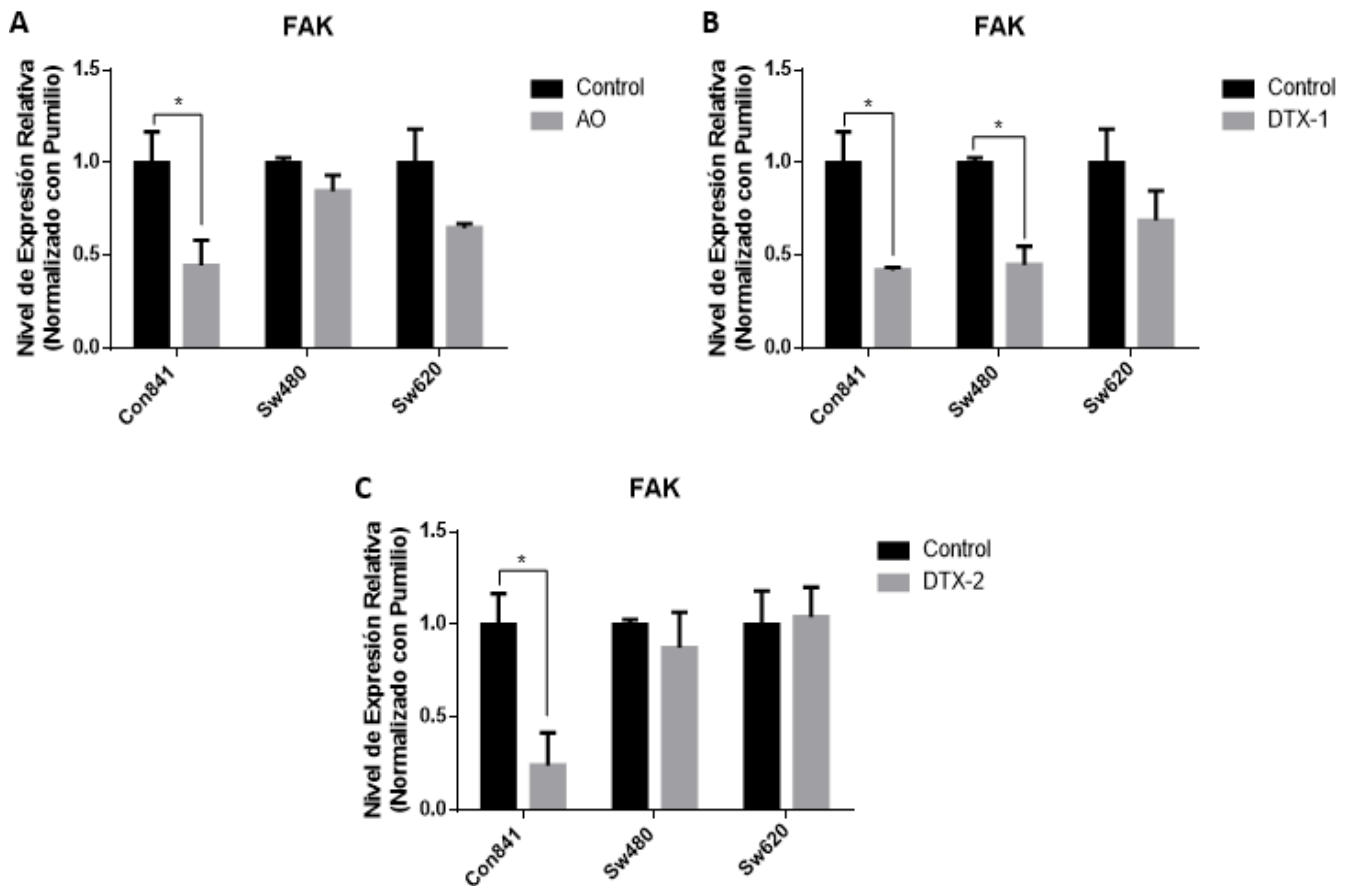
**Figura 16:** Nivel de expresión relativa de ARNm de ILK. Las células Con841, Sw480 y Sw620 fueron tratadas por 12h con las toxinas AO, DTX-1, DTX-2 en concentraciones equivalentes al IC50 obtenidos por ensayo de MTT. La cuantificación se realizó mediante RT-qPCR. Las barras indican promedio  $\pm$  Error estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. n=6, \*p<0,05.

Con relación a la expresión proteica de FAK y pFAK (Figura 17), se observa un aumento significativo en la línea Sw480, luego de tratamiento con DTX-1 que solo es estadísticamente significativo para pFAK397 y en el tratamiento con DTX-2 se ve un aumento estadísticamente significativo para pFAK397 y pFAK576/577. Para la línea Sw620 se ve un aumento significativo de pFAK397 luego del tratamiento con DTX-1.

En cuanto a la expresión de ARNm de FAK en células Con841, se observó una disminución estadísticamente significativa (>50%) de las células tratadas con respecto al control sin toxina (Figura 18). Y solo una disminución significativa en células Sw480 luego del tratamiento con DTX-1.



**Figura 17:** Evaluación de antígeno FAK y pFAK. Arriba: Resultados de western blot FAK y pFAK Tyr 576/577, pFAK Tyr 925 y pFAK Tyr 397 de líneas celulares Con841 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2), Sw480 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2) y Sw620 (Control sin toxina, AO, DTX-1, DTX-2). Gel poliacrilamida 10%. (n= 3). Abajo: Cuantificación relativa de pFAK Y397/FAK, pFAK Y576/577/ FAK y pFAK Y925/ FAK para cada línea celular luego de los tratamientos con AO, DTX-1 y DTX-2. Las barras indican promedio  $\pm$  Error estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. \*  $p < 0,05$ .



**Figura 18:** Nivel de expresión relativa de ARNm de FAK. Las células Con841, Sw480 y Sw620 fueron tratadas por 12h con las toxinas AO, DTX-1, DTX-2 en concentraciones equivalentes al IC50 obtenidos por ensayo de MTT. La cuantificación se realizó mediante RT-qPCR. Las barras indican promedio  $\pm$  Error estándar. Las diferencias significativas se calcularon usando test t de Student. n=6, \*p<0,05

## 10. DISCUSIÓN

El AO, DTX-1 y DTX-2 son toxinas lipofílicas producidas por dinoflagelados, con diferentes niveles de toxicidad entre sí, y son los principales compuestos asociados a los episodios de VDM. Los resultados obtenidos durante esta tesis mediante el ensayo de MTT muestran que DTX-2 resultó menos tóxico que AO y DTX-1 al comparar los valores de IC50. Esto coincide con lo reportado en literatura, donde se considera que AO y DTX-1 son igualmente tóxicos, en tanto que DTX-2 es alrededor de un 40% menos tóxico (Vilariño et al., 2018). Sin embargo, algunos trabajos consideran que DTX-1 es más tóxico que AO y DTX-2 (Ferron et al., 2014).

En este contexto, es importante destacar que, al comparar las células no tumorales con las líneas tumorales, las primeras resultaron ser mucho más sensibles al efecto de las tres toxinas, obteniendo valores de IC50 mucho menores en comparación a las líneas Sw480 y Sw620. No obstante, lo anterior, se sabe que la toxicidad de este grupo de compuestos varía entre distintas líneas, donde la mayor resistencia de las líneas tumorales sugiere que durante la exposición a las toxinas, no se activa la muerte celular y, por lo tanto, están más expuestas a efectos tóxicos a largo plazo, como, por ejemplo, la inducción de un fenotipo más agresivo.

En cuanto a los cambios morfológicos observados posterior a la incubación con las toxinas, el efecto es mucho más notorio en la línea no tumoral, las células se vuelven esféricas y tienden a agruparse lo que deviene en una pérdida de adhesión a la placa. Estos cambios observados, pueden ser debido a la reorganización del citoesqueleto y, han sido reportados en diferentes sistemas celulares luego del tratamiento con AO. Por ejemplo en células MCF-7 y Hela S3 tratadas con AO (Rossini et al., 2001) y en células SH-EP tratadas por 4h con 250nM de AO (Kim et al., 2003). Valdiglesias et al., (2011) reportaron cambios morfológicos inducidos por AO en tres tipos celulares distintos: leucocitos de sangre periférica, células de hepatoma HepG2 y células de neuroblastoma SHSY5Y. En estos modelos, las células adquieren una forma esférica y pierden adhesión y terminan despegándose de la placa.

En este aspecto, es importante destacar que, el citoesqueleto es fundamental para la mantención de la arquitectura celular, adhesión, migración, diferenciación y transporte de

organelos. Por otra parte, los cambios en la reorganización del citoesqueleto inducidos por AO, mediados principalmente por la inhibición de la desfosforilación, anteceden a procesos apoptóticos, pero también están presentes en proliferación y movilidad celular, sin embargo, aún no está claro si los efectos en el citoesqueleto son inducidos directamente por el AO o son consecuencia de procesos apoptóticos normales (España et al., 2010).

Se ha descrito que este grupo de toxinas puede actuar tanto como inductoras de muerte celular, como promotoras de tumores (Opsahl et al., 2013). Del Campo et al., (2013) postula que este efecto dual del AO depende de la dosis administrada y el tiempo de exposición, ya que en los modelos de epitelio gástrico (AGS y MKN45) y de epitelio de colon (Caco 2), dosis subletales de AO promovieron la proliferación celular y activaron vías oncogénicas, sin embargo, ese trabajo solo estudió efectos sobre modelos tumorales y no se consideraron modelos no tumorales. Los antecedentes anteriormente mencionados podrían explicar que, en nuestros resultados, para células más sensibles como Con841, se active muerte celular y para células más resistentes como las células tumorales (Sw480 y Sw620), se activen vías relacionadas a la oncogénesis, aumentando, por ejemplo, la capacidad migratoria de las células. Al analizar proliferación celular, se ve una tendencia a disminuir la expresión de PCNA en la línea Con841, lo va de la mano con una mayor sensibilidad al efecto citotóxico de las toxinas, en tanto que, en la línea Sw620, que resultó más resistente, fue posible observar una tendencia a aumentar la expresión de PCNA. Esto además se correlaciona con los resultados de migración en cámaras *transwell*, ya que las células tumorales aumentan su capacidad migratoria en comparación al control, de forma significativa, en tanto que, para la línea no tumoral, no hay diferencias estadísticamente significativas en la migración con respecto a su control. En cuanto a la capacidad invasiva, los resultados muestran una tendencia al aumento en la línea celular Sw480 y una disminución en la línea celular Sw620 al igual que la línea no tumoral, sin embargo, a diferencia de la migración, el proceso invasivo implica la activación de vías más complejas para la célula que le permitan degradar el sustrato que imita la matriz extracelular.

Las toxinas del VDM son potentes inhibidores de PP2A, y en menor medida de PP1, las cuales son las fosfatasa más abundantes en las células (España et al., 2010). Las proteínas fosfatasa modulan una gran cantidad de vías de señalización celular como proliferación,

diferenciación y apoptosis (Del Campo et al., 2017). Debido a lo anterior, se evaluó la actividad PP2A en las tres líneas celulares luego del tratamiento con las toxinas marinas. Los resultados obtenidos muestran una inhibición significativa de la actividad PP2A luego de los tratamientos para las líneas tumorales (Sw480 y Sw620), sin embargo, para la línea no tumoral, no hay inhibición de PP2A en el tratamiento con DTX-2. Debido a las diferencias estructurales entre AO y sus análogos, se ha demostrado que poseen afinidad distinta por el sitio catalítico de PP2A (Ferron et al., 2014). En cuanto a las diferencias estructurales entre los análogos, Twiner et al., (2016) demostró que las diferencias estructurales en la metilación de la cola de la estructura en C31 y C35 reducen la toxicidad de las toxinas, que DTX-2 tiene mayor afinidad por PP5 que los análogos AO y DTX-1 y, al comparar los efectos de DTX-2 de origen natural y sintético en linfocitos T, la toxina de origen natural resultó mucho más tóxica que la de origen sintético. Estos hallazgos, sumado a que cada tipo celular posee diferente metabolismo y absorción diferencial de las toxinas, podrían explicar la baja inhibición o nula inhibición de PP2A luego de los tratamientos con DTX-2. Sin embargo, las diferencias en la afinidad por las PPs no explican completamente todos los efectos de las toxinas del grupo del AO (Munday, 2013), por lo que puede haber otros blancos celulares para éstas toxinas que expliquen los resultados obtenidos.

Louzao et al., (2015) estudió la relación entre el neuropéptido Y y la exposición a AO, determinando que este neuropéptido inhibe la movilidad gastrointestinal y la secreción de agua y electrolitos, principalmente Cl<sup>-</sup>, a lo largo del intestino. Sus resultados muestran que dosis de AO de 50-100nM disminuyen la expresión del neuropéptido Y y, por otra parte, induce una reducción de la resistencia eléctrica trans epitelial en células Caco 2 y se asocia a una baja del nivel de neuropéptido Y secretado por células SHSY5Y.

Estudios sobre el Metil Okadaato, un metil ester artificial derivado del AO, demuestran que es capaz de inducir la reorganización de la actina del citoesqueleto en células humanas de neuroblastoma, también es capaz de disrumpir la actina del citoesqueleto y disminuir el gasto metabólico en hepatocitos de rata normales e inmortalizados, de manera independiente a la inhibición de PP1 y PP2A (España et al., 2010). Estos resultados pueden ser relevantes para entender el efecto diarreico de las toxinas de VDM y demuestran que existen blancos celulares distintos a las proteínas fosfatasa para este grupo de toxinas.

Las caspasas son proteasas que se activan en respuesta a procesos apoptóticos. Las caspasas existen normalmente en las células como precursores inactivos (pro-caspasa), los cuales son procesados para liberar la forma activa (Xu & Shi, 2007). Los resultados no muestran cambios significativos en la expresión proteica de Caspasa 8 activada luego de los tratamientos para ninguna de las líneas celulares. Por otra parte, resultados de la evaluación Caspasas 3/7 activadas muestran aumentos significativos para las líneas tumorales, luego de los tratamientos con AO y DTX-2, lo que se correlaciona con los resultados de Rossini et al. (2001), ya que en ese trabajo se trataron células HeLa y MCF-7 con 50nM de AO por 24h y no se vieron cambios en la expresión proteica de pro-caspasa 8, indicando que hay muy poco procesamiento de esta caspasa por acción de la toxina pero, si se encontraron diferencias en las isoformas de Caspasa -2, -3, -7 y -9 luego del tratamiento en células HeLa. Estos resultados son esperables ya que la caspasa 8 es una caspasa iniciadora de la vía extrínseca, por lo que tiene un papel mayor en la apoptosis inducida por TNF y Fas (Rossini et al., 2001). El aumento en la activación de Caspasa-3 ha sido reportado en células de fibroblastos normales de pulmón humano luego de la incubación por 48h con concentraciones de 1-1000 nM de AO, concluyendo que la activación de caspasa-3 depende tanto del tiempo de incubación como de la concentración de toxina usada (Leira Sanmartin et al., 2001).

Los resultados de la liberación de LDH no muestran aumentos significativos en los tratamientos con respecto a los controles, para las tres líneas celulares evaluadas. Lo mismo ocurre para los resultados de la citometría, donde no se ven incrementos en el porcentaje de células positivas para PI y negativas para AnnexinaV. Esto indica que no hay muerte celular por necrosis atribuible al efecto de las toxinas. Resultados similares se han reportado por Leira et al., (2001). Ellos demostraron que no hay diferencias en la liberación de LDH ni en la absorción de PI en células de fibroblastos normales de pulmón humano luego de 48h de incubación con concentraciones de 1-1000nM de AO. También, Davis et al., (1994) demostraron que células epiteliales de riñón de rata tratadas con 1  $\mu$ M de AO eran capaces de excluir PI, demostrando, con ello, que fueron capaces de mantener la integridad de membrana a pesar de las alteraciones morfológicas que se observaron.

Una de las quinasas principales implicadas en la adhesión focal es FAK. FAK está involucrada en la remodelación de adhesiones focales durante la migración y su activación requiere de la fosforilación en distintos residuos de tirosina (Hamadi et al., 2005). En células endoteliales se ha demostrado que AO estimula la movilidad celular. Por otra parte, AO causa una pérdida de la estabilidad de adhesiones focales y la consecuente pérdida de la organización del citoesqueleto en keratinocitos debido a la alteración en el estado de fosforilación de los residuos de tirosina en proteínas FAK y paxilina (Vale & Botana, 2008).

Los resultados de la expresión proteica de pFAK Y397, pFAK Y576/577 y pFAK Y925 muestra una tendencia a aumentar en células tumorales con respecto al control. Este incremento es estadísticamente significativo para pFAK Y397 en la línea Sw480, luego de los tratamientos con DTX-1 y DTX-2, y para pFAK Y576/577 en la línea Sw480 posterior al tratamiento con DTX-2, en tanto que, para la línea no tumoral, no hay diferencias significativas, situación opuesta respecto del nivel de ARNm, donde hay una disminución del transcrito de FAK. El aumento de pFAK Y397 se correlaciona con un aumento en la capacidad migratoria, ya que la fosforilación de FAK en este sitio es relevante para el proceso migratorio (Hamadi et al., 2005). Sin embargo, estudios reportan que los tratamientos con AO disminuyen la fosforilación de FAK en Y397 de forma dependiente de la concentración y tiempo de incubación (Kim et al., 2003).

ILK es una proteína intracelular involucrada directamente en la vía de señalización de integrinas, uniéndose directamente a éstas. ILK tiene un papel fundamental en múltiples cascadas de señalización importantes para mantener la homeostasis (Shishido, Böning, & Kim, 2014). La activación de ILK tiene efectos en la sobrevivencia, invasión, proliferación celular y protección contra la anoikis, donde cumple un rol importante. En relación con la adhesión Célula- Matriz extracelular, ILK interactúa con los receptores de integrinas y fosforila su blanco PKB/Akt en Ser473, estimulando su actividad. La sobreexpresión de FAK y de ILK bloquea la anoikis en células en suspensión, lo que respalda su rol como protectores de la anoikis (Paoli, Giannoni, & Chiarugi, 2013). Los resultados obtenidos en la línea no tumoral muestran una disminución de los niveles de ARNm y proteico de ILK y del nivel de ARNm de FAK, lo que sumado a la pérdida de adhesión a la placa y cambios morfológicos podría sugerir que en esta línea la causa de muerte puede deberse a anoikis, la cual es un tipo de muerte celular programada inducida por una falta de adhesión de la célula



a la matriz extracelular (Paoli et al., 2013). A pesar de que la anoikis y la apoptosis poseen características similares, durante la anoikis las caspasas son activadas más tardíamente que en apoptosis (Kim et al., 2003), lo que explicaría los bajos niveles de Caspasa3/7 activada en células Con841.

Finalmente, como se ve en literatura, los efectos de las toxinas sobre una línea celular particular, es dependiente tanto del tiempo de incubación como de la línea celular y la dosis aplicada. Para las dosis y tiempo de incubación aplicados en esta tesis, fue posible observar que la línea no tumoral es más sensible al efecto de las toxinas, con una fuerte disminución de actividad PP2A solo en el tratamiento con DTX-1, con una tendencia a disminuir la proliferación celular y la expresión de proteínas asociadas a la adhesión y migración celular (ILK y FAK), no se encontró actividad caspasa 3 y 7 aumentadas respecto del control, sugiriendo muerte por anoikis, lo que podría ser confirmado con el uso de otros marcadores como por ejemplo, marcadores mitocondriales de la vía intrínseca como Bcl-2, cuya sobreexpresión inhibe la anoikis (Gilmore, 2005) o Bim, el cual se acumula al perderse la adhesión celular (Paoli et al., 2013).

Por otro lado, para las condiciones estudiadas, las células tumorales resultaron más resistentes al efecto citotóxico de las toxinas, hubo una fuerte inhibición de la actividad PP2A (cerca al 50%), sin embargo, se ve una tendencia a aumentar la expresión de PCNA, se vieron aumentadas la capacidad migratoria e invasiva y aumentada la activación de FAK con respecto a los controles, lo que sugiere una inducción de un fenotipo más migratorio y más agresivo luego de la incubación con las toxinas.

## 11. CONCLUSIONES

- La línea celular no tumorales (Con841) es mucho más sensible que las líneas tumorales estudiadas (Sw480 y Sw620) a los efectos citotóxicos de las toxinas AO, DTX-1 y DTX-2, ya que posee valores de IC50 menores y cambios morfológicos más evidentes.
- Para las tres líneas celulares estudiadas, la toxina DTX-2 resultó menos tóxica que AO y DTX-1, ya que los valores IC50 son mayores, lo cual está en concordancia con lo reportado en la literatura.
- Existe un efecto dual de las toxinas, ya que en la línea no tumoral hay una mayor inducción de muerte celular presumiblemente anoikis, en tanto que en las líneas tumorales hay una inducción de un fenotipo más agresivo caracterizado por una mayor resistencia a las toxinas, aumento de migración y FAK activado.

## 12. PROYECCIONES

- Se sugiere que la intoxicación con estas toxinas ya sea que alcancen a no el umbral para desencadenar el síndrome VDM, podría tener efectos nocivos en el tracto digestivo a largo plazo en personas con lesiones neoplásicas no neoplásicas.
- Además, se sugiere considerar que el consumo crónico de toxinas en población de riesgo, por ejemplo, población cercana a sitios con casos de VDM reportados, puede tener un impacto en la salud pública, ya que, en dosis subletales, estas toxinas pueden ser capaces de generar daño celular más allá del cuadro agudo, ya que son capaces de generar un fenotipo más agresivo en modelos celulares tumorales.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer: GLOBOCAN (2018). <http://gco.iarc.fr>
- Cordier, S., Monfort, C., Miossec, L., Richardson, S., & Belin, C. (2000). Ecological Analysis of Digestive Cancer Mortality Related to Contamination by Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins along the Coasts, 150, 145–150. <http://doi.org/10.1006/enrs.2000.4103>
- Davis, M. A., Smith, M. W., Chang, S. H., & Trump, B. F. (1994). Characterization of a renal epithelial cell model of apoptosis using okadaic acid and the NRK-52E cell line. *Toxicologic Pathology*, 22(6), 595–605.
- del Campo, M., Toledo, H., Lagos, N., (2013). Okadaic Acid Toxin at Sublethal Dose Produced Cell Proliferation in Gastric and Colon Epithelial Cell Lines. 11, 4751-4760. <http://doi:10.3390/md11124751>
- del Campo, M., Zhong, T., Tampe, R., García, L. (2017). Toxicon Sublethal doses of dinophysistoxin-1 and okadaic acid stimulate secretion of inflammatory factors on innate immune cells: Negative health consequences, 126, 23–31. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.12.005>
- Ehlers, A., Scholz, J., These, A., Hessel, S., Preiss-weigert, A., & Lampen, A. (2011). Analysis of the passage of the marine biotoxin okadaic acid through an in vitro human gut barrier, 279, 196–202. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2010.11.001>
- Espiña, B., Louzao, M., Cagide, E., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Yasumoto, T., & Botana, L. M. (2010). The methyl ester of okadaic acid is more potent than okadaic acid in disrupting the actin cytoskeleton and metabolism of primary cultured hepatocytes, 337–344. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00512.x>
- Fernández, D. A., Louzao, M. C., Fraga, M., Vilariño, N., Vieytes, M.R., Botana, L.M. (2014). Experimental Basis for the High Oral Toxicity of Dinophysistoxin 1: A Comparative Study of DSP, 211–228. <http://doi.org/10.3390/toxins6010211>
- Ferreiro, S. F., Carrera, C., Vilariño, N., Louzao, M. C., Santamarina, G., Cantalapiedra, A. G., & Botana, L. M. (2015). Acute Cardiotoxicity Evaluation of the Marine Biotoxins OA, DTX-1 and YTX, 1030–1047.

<http://doi.org/10.3390/toxins7041030>

- Ferron, P., Hogeveen, K., Fessard, V., Le Hégarat, L. (2014). Comparative Analysis of the Cytotoxic Effects of Okadaic Acid-Group Toxins on Human Intestinal Cell Lines, 4616–4634. <http://doi.org/10.3390/md12084616>
- Fujiki, H., Sueoka, E., Watanabe, T., Suganuma, M. (2018). The concept of the okadaic acid class of tumor promoters is revived in endogenous protein inhibitors of protein phosphatase 2A, SET and CIP2A, in human cancers. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144: 2339. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2765-7>
- Fujiki, H., Sueoka, E., & Suganuma, M. (2013). Tumor promoters: from chemicals to inflammatory proteins. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*, 1603–1614. <http://doi.org/10.1007/s00432-013-1455-8>
- García, C., Contreras, H. (2014). Effects of both Paralytic Shellfish Toxins and Diarrhetic Shellfish Toxins in Human Poisoning: Toxicity, Distribution and Biotransformation. *Shellfish Human Consumption, Health Implications and Conservation Concerns*. Nova Science Publishers.
- García, C., Oyaneder-Terrazas, J., Contreras, C., Torres, R., & Contreras, H. R. (2016). Food Additives & Contaminants: Part A Determination of the toxic variability of lipophilic biotoxins in marine bivalve and gastropod tissues treated with an industrial canning process. *Food Additives Contaminants: Part A*, 0(0), 1–17. <http://doi.org/10.1080/19440049.2016.1239032>
- Hamadi, A. (2005). Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *Journal of Cell Science*, 118(19), 4415–4425. <http://doi.org/10.1242/jcs.02565>
- Huang, C., Lv, B., & Wang, Y. (2015). Protein Phosphatase 2A Mediates Oxidative Stress Induced Apoptosis in Osteoblasts, 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/804260>
- Huhn, J., Jeffrey, P. D., Larsen, K., Rundberget, T., Rise, F., Cox, N. R., Arcus, V., Shi, Y., Miles, C. O. (2009). A Structural Basis for the Reduced Toxicity of Dinophysistoxin-2, 1782–1786. <http://doi.org/10.1021/tx9001622>
- Kim, B., van Golen, C. M., & Feldman, E. L. (2003). Degradation and dephosphorylation of focal adhesion kinase during okadaic acid-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 5(5), 405–16.

[http://doi.org/10.1016/S1476-5586\(03\)80043-X](http://doi.org/10.1016/S1476-5586(03)80043-X)

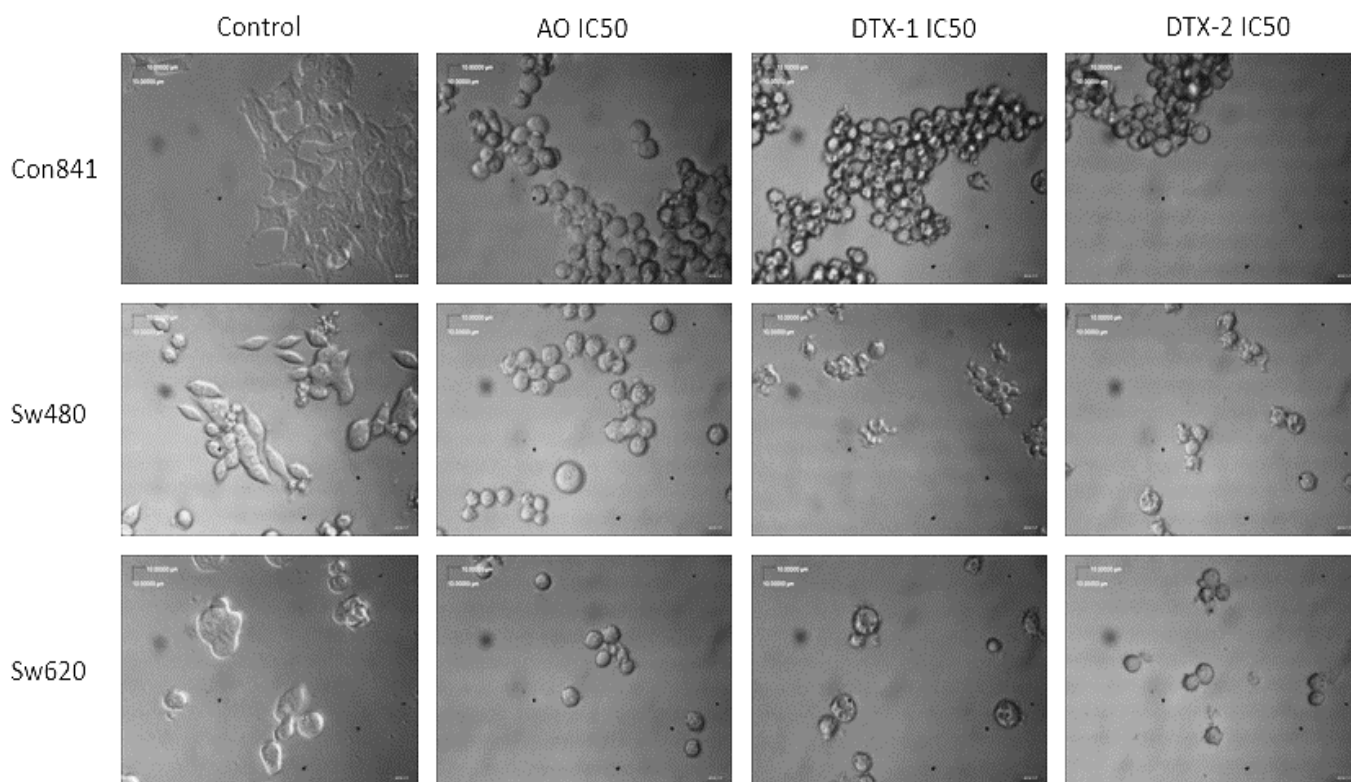
- Leira Sanmartin, F., Vieites, J. M., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2001). Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 15, 199–208.
- Lopez-rodas, V., Maneiro, E., Martinez, J., Navarro, M., & Costas, E. (2006). Harmful algal blooms, red tides and human health: Diarrhetic shellfish poisoning and colorectal cancer, 391–408.
- Louzao, M. C., Fernández, D. A., Abal, P., Fraga, M., Vilariño, N., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2015). Diarrhetic effect of okadaic acid could be related with its neuronal action: Changes in neuropeptide Y. *Toxicology Letters*, 237(2), 151–160. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.06.004>
- Minsal (2016). *Estrategia Nacional del Cancer: Chile 2016*. Santiago- Chile. 72p.
- Munday, R. (2013). Is Protein Phosphatase Inhibition Responsible for the Toxic Effects of Okadaic Acid in Animals?, 2, 267–285. <http://doi.org/10.3390/toxins5020267>
- Opsahl, J. A., Ljostveit, S., Solstad, T., Risa, K., Roepstorff, P., & Fladmark, K. E. (2013). Identification of Dynamic Changes in Proteins Associated with the Cellular Cytoskeleton after Exposure to Okadaic Acid, 1763–1782. <http://doi.org/10.3390/md11061763>
- Paoli, P., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3481–3498. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026>
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P. A., Pizarro, G., Paz, B., Franco, J.M., Blanco, J. (2014). Dinophysis Toxins: Causative Organisms, Distribution and Fate in Shellfish, 394–461. <http://doi.org/10.3390/md12010394>
- Rossini, G. P., Sgarbi, N., Malaguti, C., Biomediche, S., & Biologica, C. (2001). The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms, 39, 763–770.
- Shishido, S., Böning, H., & Kim, Y.-M. (2014). Role of integrin alpha4 in drug resistance of leukemia. *Frontiers in Oncology*, 4(May), 99. <http://doi.org/10.3389/fonc.2014.00099>
- Twiner, M. J., Doucette, G. J., Pang, Y., Fang, C., Forsyth, C. J., & Miles, C. O. (2016). Structure – Activity Relationship Studies Using Natural and Synthetic Okadaic Acid /

Dinophysistoxin Toxins. <http://doi.org/10.3390/md14110207>

- Valdíglesias, V., Prego-Faraldo, M.V., Pásaro, E., Méndez, J., Laffon, B. (2013). Okadaic Acid: More than a Diarrheic Toxin, 4328–4349. <http://doi.org/10.3390/md11114328>
- Valdíglesias, V., Fernández-tajes, J., Pásaro, E., & Laffon, B. (2013). The marine toxin okadaic acid induces alterations in the expression level of cancer-related genes in human neuronal cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 303–311.
- Valdíglesias, V., Laffon, B., Pásaro, E., & Méndez, J. (2011). Okadaic acid induces morphological changes, apoptosis and cell cycle alterations in different human cell types. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(6), 1831–1840. <http://doi.org/10.1039/c0em00771d>
- Vale, C., & Botana, L. M. (2008). Marine toxins and the cytoskeleton : okadaic acid and dinophysistoxins, 275, 6060–6066. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06711.x>
- Vilariño, N., Louzao, M., Abal, P., Cagide, E., Carrera, C., Vieytes, M., & Botana, L. (2018). Human Poisoning from Marine Toxins: Unknowns for Optimal Consumer Protection. *Toxins*, 10(8), 324. <http://doi.org/10.3390/toxins10080324>
- Xu, G., & Shi, Y. (2007). Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Research*, 17(9), 759–771. <http://doi.org/10.1038/cr.2007.52>

## 14. ANEXOS

### 14.1. Anexo 1



**Figura 19:** ANEXO 1. Fotografía de campo claro de células Con841, Sw480 y Sw620 tratadas con AO, DTX-1 Y DTX-2 con concentraciones equivalentes al IC50 obtenidos por ensayo de MTT. 400x.