



UNIVERSITÀ' DEGLI STUDI DI TRIESTE

**XXVIII CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE E
FARMACEUTICHE**

**TOSSICITA' *IN VIVO* ED *IN VITRO*
DI AZASPIRACIDI**

Settore scientifico-disciplinare: **BIO/15**

**DOTTORANDA
ELISABETTA D'ORLANDO**

**COORDINATORE
PROF. MAURO STENER**

**SUPERVISORE DI TESI
PROF. AURELIA TUBARO**

ANNO ACCADEMICO 2014 / 2015

RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1. ORIGINI DEGLI AZASPIRACIDI ED ORGANISMI PRODUTTORI	6
1.2. STRUTTURA E PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE	9
1.3. INTOSSICAZIONI UMANE	14
1.4. TOSSICITA' <i>IN VIVO</i>	16
1.4.1. Tossicità per via intraperitoneale	16
1.4.2. Tossicità acuta per via orale	17
1.4.3. Tossicità ripetuta per via orale	19
1.4.4. Studi di relazione struttura-attività	20
1.4.5. Tossicità orale indotta dagli AZAs in associazione con altre tossine algali	20
1.5. TOSSICITA' <i>IN VITRO</i>	21
1.5.1. Effetti sull'attività delle protein-fosfatasi	21
1.5.2. Effetti citotossici	21
1.5.3. Effetti sulla morfologia cellulare	22
1.5.4. Effetti sul citoscheletro	22
1.5.5. Effetti apoptotici e necrotici	23
1.5.6. Effetti sul signaling cellulare	23
1.5.7. Effetti sulle proteine	24
1.5.8. Effetti su canali ionici	25
1.6. METODI ESTRATTIVI	26
1.7. METODI DI RILEVAMENTO	26
1.8. REGOLAMENTAZIONE DEGLI AZAs	29
2. SCOPO	31
3. MATERIALI E METODI	33
3.1. STUDI DI TOSSICITA' <i>IN VIVO</i>	34
3.1.1. Tossine ed altri reagenti	34
3.1.2. Animali	34
3.1.3. Studio di tossicità orale acuta nel topo	34
3.1.4. Analisi ematochimiche	35
3.1.5. Analisi istologiche	35
3.1.6. Quantificazione degli AZAs nei principali organi/tessuti	36
3.1.7. Analisi statistica	36
3.2. STUDI DI TOSSICITA' <i>IN VITRO</i>	37
3.2.1. Linee cellulari stabilizzate	37
3.2.1.1. Linea cellulare IHH	37
3.2.1.2. Linea cellulare HepG2	37

3.2.2. Trattamento con le tossine	38
3.2.3. Test di riduzione dell'MTT	38
3.2.4. Test della sulforodamina B	39
3.2.5. Inibizione della catena di trasporto degli elettroni	40
3.2.5.1. Inibizione con rotenone	40
3.2.5.2. Inibizione con tenoiltrifluoroacetone	41
3.2.5.3. Inibizione con antimicina-A	41
3.2.5.4. Inibizione con sodio azide	42
3.2.5.5. Inibizione con oligomicina A	42
3.2.6. Valutazione del ruolo dello squilibrio protonico	43
3.2.7. Terreni <i>ion-free</i> per cellule IHH	44
3.2.7.1. Terreno di controllo	44
3.2.7.2. Terreno Na ⁺ -free	45
3.2.7.3. Terreno Ca ²⁺ -free	45
3.2.7.4. Terreno K ⁺ -free	46
3.2.7.5. Terreno Cl ⁻ -free	46
3.2.8. Valutazione del ruolo di specifici trasportatori per lo ione K ⁺	47
3.2.8.1. Modulazione dei canali K _{ATP}	47
3.2.8.2. Modulazione dei canali hERG	48
3.2.8.3. Modulazione della NaKA	49
3.2.9. Analisi statistica	50
4. RISULTATI	51
4.1. STUDI DI TOSSICITA' IN VIVO	52
4.1.1. Letalità	52
4.1.2. Segni e sintomi di tossicità	53
4.1.3. Esame necroscopico	53
4.1.4. Analisi ematochimiche	55
4.1.5. Analisi istologica	58
4.1.6. Quantificazione degli AZAs negli organi/tessuti	59
4.2. STUDI DI TOSSICITA' IN VITRO	61
4.2.1. Effetti degli AZAs sulle cellule IHH	61
4.2.2. Effetti degli AZAs sulle cellule HepG2	65
4.2.3. Effetto degli inibitori della catena di trasporto degli elettroni sull'attività mitocondriale stimolata dagli AZAs	69
4.2.4. Effetti dello squilibrio protonico sull'attività mitocondriale stimolata dagli AZAs	73
4.2.5. Effetti dello squilibrio ionico sull'attività mitocondriale stimolata dagli AZAs	75
4.2.6. Ruolo dei canali K _{ATP} , hERG e della Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi nell'alterata attività mitocondriale indotta dagli AZAs	77
5. DISCUSSIONE	82
BIBLIOGRAFIA	88

RIASSUNTO

Gli azaspiracidi (AZAs) sono delle tossine marine lipofile, comprendenti più di 30 analoghi prodotti dal dinoflagellato *Azadinium spinosum* o derivanti dal metabolismo di alcuni AZAs nei molluschi. Essi possono contaminare i molluschi eduli e provocare un'intossicazione alimentare (*Azaspiracid Shellfish Poisoning*, AZP), caratterizzata da nausea, vomito, diarrea e crampi allo stomaco. Attualmente, solo tre AZAs (AZA1, 2 e 3) sono regolamentati nell'Unione Europea ed il massimo livello ammissibile nei molluschi è pari a 160 µg di equivalenti di AZA1/kg di parti edibili. La concentrazione totale degli AZAs è calcolata dai relativi fattori di equivalenza tossica (*Toxic Equivalency Factors*, TEFs), pari a 1.0, 1.8 e 1.4 per AZA1, 2 e 3, derivati in base alla letalità per via intraperitoneale nel topo. Tuttavia, poiché l'esposizione alle tossine avviene per ingestione, i TEFs dovrebbero derivare da studi comparativi di tossicità per via orale, tuttora mancanti.

Pertanto, è stato condotto uno studio di tossicità acuta per via orale di AZA1-3 nel topo. Entro 24 h dalla somministrazione, la relativa DL₅₀ (dose letale nel 50% dei topi trattati) è risultata pari a 443, 626 e 875 µg/kg per AZA1, 2 e 3, da cui si sono derivati i valori di TEFs, pari a 1.0 (AZA1), 0.7 (AZA2) e 0.5 (AZA3), diversi da quelli derivati dopo inoculazione intraperitoneale. Lo studio ha inoltre evidenziato alterazioni macroscopiche entro 24 h dalla somministrazione a carico del fegato (dosi pari o superiori a 175 µg AZA1/kg, 500 µg AZA2/kg, 600 µg AZA3/kg) e, alle dosi letali, anche del tratto gastrointestinale. Inoltre, le analisi ematochimiche hanno rilevato che le tossine, a tutte le dosi, determinavano un significativo aumento delle transaminasi e della glutammato deidrogenasi, indici di danno epatico, mentre aumentati livelli dello ione potassio sono stati rilevati a dosi a partire da 500 µg/kg. Lo studio *in vivo* ha quindi evidenziato il fegato come uno dei bersagli delle tossine.

Sono stati quindi studiati gli effetti *in vitro* di queste tossine nei confronti degli epatociti umani (cellule non tumorali IHH e tumorali HepG2). Valutando l'attività mitocondriale (test dell'MTT) e la proliferazione delle cellule (test della sulforodamina B) esposte agli AZAs (1.0×10^{-7} - 5.08×10^{-12} M) per 24, 48 e 72 h, è emerso che le tossine stimolavano l'attività mitocondriale a 24 h senza influenzare la proliferazione, che invece era ridotta a 72 h. Ulteriori studi hanno evidenziato che l'effetto degli AZAs sui mitocondri sembra coinvolgere i complessi I e II della catena di trasporto degli elettroni e sembra essere strettamente correlato a squilibri ionici, in particolare a carico del K⁺, con coinvolgimento di alcuni canali e pompe ionici (K_{ATP}, hERG e Na⁺/K⁺-ATPasi). Tuttavia, resta da definire se questi effetti possano riguardare un meccanismo d'azione generale di queste tossine oppure un meccanismo limitato a livello delle cellule epatiche.

1. INTRODUZIONE

1.1. ORIGINI DEGLI AZASPIRACIDI ED ORGANISMI PRODUTTORI

Gli azaspiracidi (AZAs) sono un gruppo di tossine polieteree marine, che possono contaminare i molluschi bivalvi eduli. Furono identificati per la prima volta in seguito ad un'intossicazione umana, avvenuta in Olanda nel Novembre del 1995, legata all'ingestione di molluschi contaminati provenienti da Killary Harbour, Irlanda. Sebbene le 8 persone intossicate mostrassero sintomi gastrointestinali, quali nausea e vomito, tipici delle intossicazioni da acido okadaico (OA) e dinophysitossina (DTX), note come *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP), le analisi condotte sui mitili non rilevarono quantitativi di OA o DTX superiori ai limiti regolatori, tali da generare i sintomi d'intossicazione. Inoltre, nelle acque di origine non si trovarono i microrganismi produttori delle tossine DSP e il test biologico effettuato per via intraperitoneale (i.p.) nel topo (*mouse bioassay*), condotto con gli estratti acetonicici di epatopancreas dei molluschi contaminati, mostrò nei topi sintomi di neurotossicità non tipici della sintomatologia da DSP (McMahon and Silke, 1996; Ito et al. 2000). Nei due anni successivi, si stabilì che questi mitili erano contaminati da una tossina del tutto nuova, che inizialmente fu chiamata *Killary toxin 3* o KT-3 (Satake et al., 1998a). Ulteriori studi portarono, poco dopo, all'identificazione e all'isolamento dell'agente responsabile, rinominato azaspiracido (AZA), a riflettere la sua peculiare struttura: un gruppo amminico ciclico (aza), un gruppo spiranico a tre anelli (spiro) ed un gruppo carbossilico terminale (acido) (Satake et al., 1998b). La nuova sindrome, caratterizzata da nausea, vomito, diarrea severa e crampi allo stomaco, prese il nome di *Azaspiracid Shellfish Poisoning* (AZP) (Ofuji et al., 1999a).

Poco dopo la delucidazione della struttura del primo azaspiracido (AZA1), durante il secondo episodio di AZP, avvenuto nell'isola Arranmore (Irlanda) nel 1997, furono isolati in minori quantità altri due analoghi: l'azaspiracido-2 (AZA2), un 8-metilazaspiracido, e l'azaspiracido-3 (AZA3), un 22-demetilazaspiracido (Ofuji et al., 1999a). Successivamente, dai mitili contaminati furono isolati anche altri due analoghi idrossilati di AZA3: l'azaspiracido-4 (AZA4), con un ossidrilico in più sul C3, e l'azaspiracido-5 (AZA5), con un ossidrilico in più sul C23 (Ofuji et al., 2001). Finora solo le strutture di questi composti sono state isolate e confermate con tecniche di risonanza magnetica nucleare (NMR). James e collaboratori (2003a) hanno poi scoperto altri 5 analoghi degli AZAs (AZA6-11) usando la cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa in tandem (LC-MS/MS), ma le loro strutture devono ancora essere delucidate. Ad oggi si contano ben 38 analoghi, numerati secondo l'ordine cronologico di scoperta; di questi, alcuni sono prodotti da dinoflagellati, altri sono invece metaboliti ottenuti da processi di bioconversione che avvengono nel tratto digestivo dei molluschi, altri ancora sono risultati artefatti di conservazione (Hess et al., 2014).

Basandosi sulla stagionalità dell'accumulo degli AZAs nei molluschi, fatto comune ad altre tossine algali, e considerato la caratteristica struttura polieterea di questi composti, propria generalmente di metaboliti prodotti da dinoflagellati, il Prof. T. Yasumoto per primo ipotizzò che la fonte primaria degli AZAs potesse essere un dinoflagellato del genere *Protoperidinium* (Yasumoto, 2001). Nel 2003, James et al. descrissero *Protoperidinium crassipes* come microrganismo produttore di AZAs (James et al., 2003a). Tuttavia, gli AZAs vennero rilevati anche in periodi stagionali in cui *P. crassipes* era assente nelle acque, pertanto gli studi continuarono ipotizzando che un altro dinoflagellato potesse esserne l'agente produttore. Nel 2007 venne scoperto nel mare del Nord, *Azadinium spinosum* (Fig. 1), un dinoflagellato preda di *P. crassipes* che, oltre a contenere AZA1 e AZA2 (Tillmann et al., 2009), produceva costitutivamente le tossine anche quando coltivato (Krock et al., 2009).

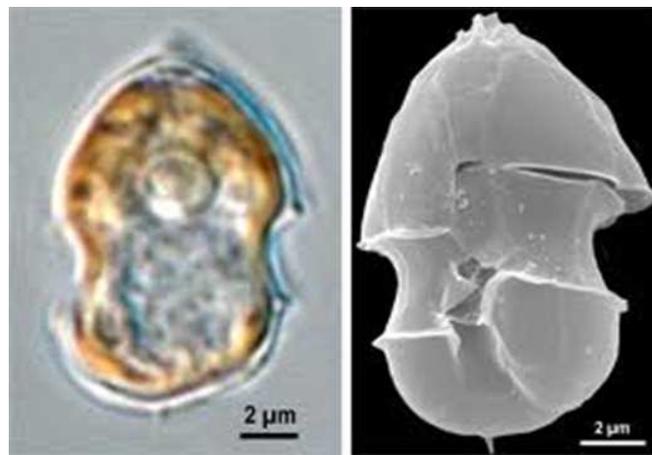


Figura 1. Microscopia ottica (a destra) ed a scansione elettronica (a sinistra) di *Azadinium spinosum* (tratto da Tillmann et al., 2009)

A. spinosum è un dinoflagellato più piccolo degli altri produttori di tossine, lungo 12-16 µm e largo 7-11 µm, dotato di una sottile teca. In tutte le specie di *Azadinium*, l'episoma è più largo dell'iposoma, con lati convessi che terminano in un poro apicale e possiedono un nucleo centrale o dislocato posteriormente, di forma da rotonda ad ellittica. Come tutte le specie di *Azadinium*, anche *A. spinosum* è un dinoflagellato fotosintetico, che possiede un unico cloroplasto parietale, che si estende sia nell'iposoma che nell'episoma. Tutte le specie sono composte da delicati piatti tecali, difficili da identificare al microscopio ottico, con superficie liscia ma ricoperta in modo irregolare da piccoli pori. L'epiteca delle specie di *Azadinium* è costituita da quattro piatti apicali e una fila di sei piatti precingolari. L'ipoteca è formata da una fila di sei piatti postcingolari e due piatti antapicali di misura diversa. Il cingolo, che in *A. spinosum* percorre circa metà della sua larghezza,

è formato da 6 piatti di dimensioni simili. Tutte le specie hanno un poro nell'area ventrale, denominato appunto poro ventrale (Tillman et al., 2014).

Oggigiorno sono state identificate ben 6 diverse specie del genere *Azadinium*, alcune delle quali a loro volta si suddividono in diversi ceppi: *A. spinosum*, *A. obesum*, *A. poporum*, *A. polongum*, *A. caudatum* (2 varianti: var. *margaleffi* e var. *caudatum*), e *A. dexteroporum*; inoltre, il genere *Amphidoma languida* è ritenuto strettamente correlato al precedente. Di questi dinoflagellati, alcuni sono produttori certi di AZAs, alcuni si sono rivelati non tossici e altri hanno tuttora una tossicità da definirsi. Nello specifico, *A. spinosum* è una specie tossica, isolata per la prima volta nel Mar del Nord della Scozia, in grado di produrre AZA1, AZA2 e AZA33. *A. obesum*, rilevato anch'esso nel Mar del Nord scozzese, è risultato essere una specie non tossica. *A. poporum*, rilevato lungo le coste danesi del Mar del Nord, produce una gran varietà di AZAs (AZA2, AZA11, AZA36 e AZA37) ed è pertanto una specie tossica. Invece in *A. polongum* non è stata rilevata presenza di AZAs, pertanto è considerata una specie non tossica. I test su *A. caudatum* non sono del tutto completi, per cui la sua tossicità è ancora da definirsi (Tillman et al., 2014). *A. dexteroporum* è stato recentemente isolato nel Mar Mediterraneo, più precisamente nel Golfo di Napoli, ed è in grado di produrre AZA3 e AZA7 (Tillman et al., 2014; Percopo et al., 2012). *Amphidoma languida* è stata rilevata in concomitanza con *A. spinosum* nella baia di Bantry in Irlanda, dapprima creduta una nuova potenziale specie del genere *Azadinium*, grazie ad accurate analisi morfologiche e filogenetiche è poi stata classificata come una nuova specie del genere *Amphidoma*, diverso se pur strettamente correlato al precedente, tant'è che *A. languida* è in grado di produrre anch'essa AZAs, in particolare due analoghi: AZA34 e AZA38. Va comunque precisato che non si può escludere del tutto la tossicità delle specie in cui finora non sono stati rilevati AZAs, perché potrebbero contenere AZAs non ancora noti o composti correlati agli AZAs non ancora rilevabili (Tillman et al., 2012 e 2014).

Gli AZAs possono contaminare vari organismi tra cui: mitili (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*), ostriche (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*), capesante (*Pecten maximus*), vongole (*Tapes philipinarium*, *Ensis siliqua*, *Donax* spp.), cardi (*Cerastoderma edule*, *Cardium edule*) (Furey et al., 2003; Twiner et al., 2008a), spugne (*Echinoclathria*; Ueoka et al., 2009) e granchi (*Cancer pagurus*; Torgersen et al., 2008). Attraverso questi organismi vettori, entrano nella catena alimentare umana, rappresentando quindi un potenziale rischio per la salute pubblica. Comunque le ostriche sono attualmente le uniche in grado di accumulare tossina a livelli comparabili con i mitili, la specie che ne accumula di più e l'unica che ha generato finora intossicazioni (Furey et al., 2003). Grazie alla possibilità, relativamente recente, di ottenere colture di *A. spinosum*, è stato possibile studiare e dimostrare come i mitili si nutrano del dinoflagellato ed

accumulino e processino le tossine da esso generate. AZA1 e AZA2 ed alcuni loro metaboliti (AZA3, AZA17 e AZA19) sono stati rilevati 24 ore dopo l'esposizione dei mitili alla microalga. AZA17 è stato rilevato come il metabolita maggiormente prodotto (rapporto AZA17:AZA1, 5:1) ed è stato rilevato in altri tessuti del mollusco, mentre AZA1 e AZA2 si sono accumulati nell'epatopancreas. Ulteriori studi hanno decretato AZA17 e AZA19 come i metaboliti maggiormente prodotti a partire da AZA1 e AZA2, rispettivamente. Le tossine possono rimanere nei molluschi per più di otto mesi in quanto, pur essendo l'epatopancreas il primo sito in cui si accumulano, poi migrano negli altri tessuti dell'organismo dove la disintossicazione avviene più lentamente (Jauffrais et al., 2012a e 2012b). Questo pone un doppio problema nella quantificazione degli AZAs: innanzitutto solo AZA1, AZA2 ed AZA3 sono attualmente regolamentati, mentre i loro metaboliti no, in aggiunta, i test analitici finora a disposizione si concentrano sugli estratti delle ghiandole digestive, probabilmente sottostimando in generale il contenuto totale di tossine, ponendo un ulteriore problema per la salute del consumatore finale. Ciò rappresenta un ostacolo anche per la quantificazione della tossina, che non si trova unicamente nelle ghiandole digestive dei molluschi, parte in genere utilizzata nelle analisi (Furey et al., 2010). Inoltre, la lunga permanenza di queste tossine e dei loro metaboliti nei mitili può portare a casi di tossicità in inverno, quando invece nei molluschi non sono presenti OA e DTX e la popolazione di dinoflagellati nelle acque è minore (Ofuji et al., 1999b).

Mentre all'inizio il problema degli AZAs sembrava riguardare la loro presenza solo nelle acque irlandesi e in molluschi in esse coltivate, successivamente gli AZAs sono stati rilevati anche in acque e in organismi vettori di altri paesi. Le prime rilevazioni al di fuori dell'Irlanda, furono in mitili coltivati in Norvegia e Gran Bretagna (James et al., 2002). Successivamente queste tossine furono identificate anche in mitili coltivati in Francia e Spagna (Brana Magdalena et al., 2003) e in Danimarca (De Schrijver et al., 2002). Attualmente sono state rilevate anche in spugne marine in Asia (Ueoka et al., 2009), in mitili coltivati nello Stato di Washington (USA) (Trainer et al., 2013), in capesante e mitili coltivati in Cile (Lopez-Rivera et al., 2010), in mitili coltivati in Marocco (Taleb et al., 2006) e in spugne marine in Giappone (Ueoka et al., 2009). Ad oggi, quindi, rappresentando un problema diffuso a livello mondiale.

1.2. STRUTTURA E PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE

La struttura di AZA1 fu delucidata per la prima volta nel 1998 dal gruppo di Satake e collaboratori, in seguito al suo isolamento da mitili irlandesi (*Mytilus edulis*). La struttura comprendeva: un gruppo amminico ciclico (aza), un gruppo spiranico a tre anelli (spiro) e un

residuo carbossilico terminale (acido), da cui il nome “azaspiracido” (Satake et al. 1998a e 1998b) (Fig. 2). La sintesi chimica di AZA1 fu completata nel 2004 ad opera del gruppo di Nicolau e collaboratori. Tuttavia, la struttura del composto di sintesi presentava delle discrepanze negli spettri NMR e nel comportamento cromatografico rispetto al composto isolato dai mitili. Successive analisi ed attenti approfondimenti permisero di capire che vi erano degli errori nella struttura originariamente proposta nel 1998, quindi nel 2004 venne rivista e definitivamente delucidata (Nicolau et al. 2004a, 2004b e 2004c).

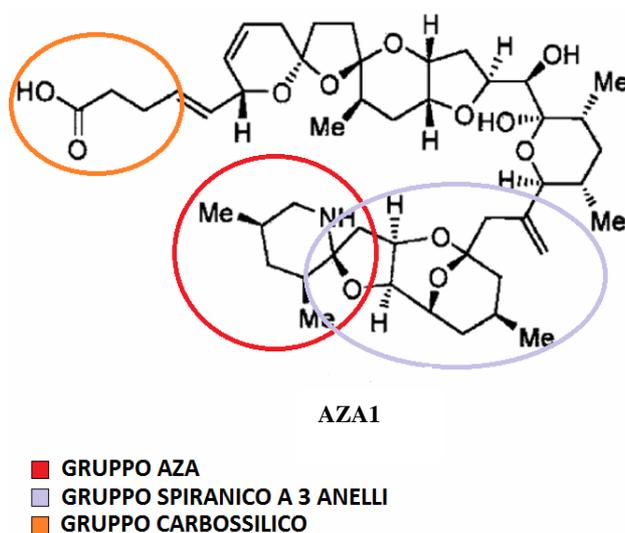
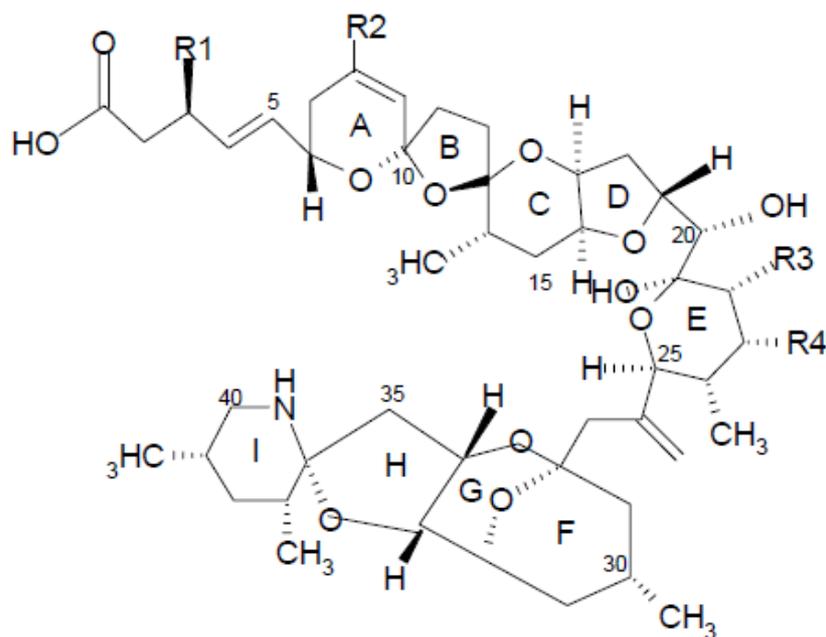


Figura 2. Struttura chimica di AZA1

In seguito, due altri analoghi furono isolati dai mitili: AZA2, un 8-metilazaspiracido, ed AZA3, un 22-demetilazaspiracido (Ofuji et al., 1999a). Mentre per AZA1 si erano ricavati una formula bruta $C_{47}H_{71}NO_{12}$ e un peso molecolare (PM) di 841.5 g/mol, AZA2 presentava formula bruta $C_{48}H_{73}NO_{12}$ e PM 856.1 g/mol ed AZA3 formula bruta $C_{46}H_{69}NO_{12}$ e PM 827.5 g/mol (James et al., 2002a). Nel 2006 anch'essi vennero sintetizzati, ad opera dello stesso gruppo di ricerca che aveva portato a termine la sintesi di AZA1 (Nicolau et al., 2006). Questi analoghi sono generalmente presenti in quantitativi minori, sia nel plancton che nei mitili: AZA1 resta la tossina predominante (50%-80%), AZA2 è presente al 10-30% ed AZA3 al 5-20% (James et al., 2003b).

Successivamente, altri due analoghi idrossilati di AZA3 furono isolati: AZA4, un 3-idrossi-22-demetilazaspiracido, e AZA5, un 23-idrossi-22-demetilazaspiracido (Ofuji et al., 2001).

Ad oggi solo le strutture di questi 5 composti sono state delucidate con tecniche di spettroscopia di massa e NMR (Fig. 3).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
azaspiracido-1 (AZA1)	H	H	CH ₃	H
azaspiracido-2 (AZA2)	H	CH ₃	CH ₃	H
azaspiracido-3 (AZA3)	H	H	H	H
azaspiracido-4 (AZA4)	OH	H	H	H
azaspiracido-5 (AZA5)	H	H	H	OH

Figura 3. Strutture chimiche di AZA1-5 (modificato da EFSA 2008a).

Ulteriori studi hanno permesso di identificare più di 30 analoghi, ma la loro struttura è stata ipotizzata solo in base all'analisi della loro frammentazione presente negli spettri MS/MS (Rehmann et al., 2008).

Molti degli analoghi risultano essere prodotti di biotrasformazione (derivati ossidrilati, metilati o demetilati di AZA1, AZA2 ed AZA3) o artefatti di conservazione (Tab. 1) (Rehmann et al., 2008).

Mentre alcuni AZAs sono prodotti da dinoflagellati (AZA1, 2, 33 e 34 da *A. spinosum*, AZA2, 11, 36 e 37 da *A. poporum*, AZA3 e 7 da *A. dexteroporum* ed AZA34 e 38 da *A. languida*), altri (AZA4-26) non sono mai stati rilevati nel plancton, ma solo nei mitili come metaboliti (con la possibile eccezione di AZA11, che sembra poter essere prodotto in entrambi). I mitili sono in grado di trasformare gli AZAs attraverso due principali vie di bioconversione: *i*) idrossilazione al C3 (AZA7, AZA11) o al C23 (AZA8, AZA12) oppure *ii*) il gruppo metilico sul C22 può venir ossidato a dare 22-carbossi-AZAs (AZA17, AZA19), che sono successivamente decarbossilati a formare 22-demetil-AZAs (AZA3, AZA6) (Hess et al., 2014). Recenti studi hanno identificato AZA17 e

AZA19 come i metaboliti maggiormente prodotti a partire da AZA1 e AZA2, rispettivamente; suggerendo che la carbossilazione al C22 sia la via metabolica preferenziale. Questi due metaboliti possono poi essere decarbossilati, più lentamente a temperatura ambiente o più velocemente se i mitili vengono cotti, a formare due 22-demetil-AZAs, AZA3 e AZA6 rispettivamente, analoghi noti per la loro tossicità (McCarron et al., 2009). Come già accennato, questo rappresenta un grave rischio per la salute umana, perché purtroppo, per la mancanza di materiale di riferimento che possa fungere da *standard* per le analisi, AZA17, AZA19 e AZA6 non sono ancora regolamentati dall'Unione Europea. La combinazione dei vari processi metabolici produce ancora altri analoghi di biotrasformazione (AZA4, AZA5, AZA9, AZA10, AZA13, AZA14, AZA15, AZA16, AZA21 e AZA23) (Hess et al., 2014).

Altri AZAs sono, invece, artefatti di estrazione o del processo di conservazione. Le modificazioni che gli AZAs possono subire in queste fasi sono: a) epimetizzazione, b) 22-decarbossilazione e c) metilazione. Si è registrata la presenza di isomeri, come prodotti di degradazione dei principali analoghi in ambiente acido, come il *37-epi-AZA1* (Rehmann et al., 2008). In seguito a cottura, come abbiamo visto, vengono prodotti 22-demetil-derivati (AZA3, AZA4, AZA6 e AZA9) (McCarron et al., 2009). L'uso di metanolo nelle procedure estrattive o come solvente di conservazione dà luogo a metilazione con produzione di esteri metilici, processo lento a basse temperature ma promosso dal calore o da condizioni acide od alcaline; pertanto l'uso di metanolo è sconsigliato in tecniche estrattive e di conservazione a favore dell'impiego di acetone o acetonitrile acquoso, se i test lo consentono (Jauffrais et al., 2012c).

Inizialmente, AZA1 venne riportato come solido incolore, inodore e amorfo (Satake et al., 1998b). Studi seguenti descrissero la tossina come un olio incolore (Nicolau et al., 2004a, 2004c). AZA1 non dà picchi di assorbimento UV sopra i 210 nm ed è caratterizzato da un indice di rifrazione di $[\alpha]^{20-21}_D$ (*c* 0.10, MeOH) (Twiner et al., 2008). Il pKa di AZA1 è 5.8, il gruppo carbossilico può essere deprotonato a pH 7-8 e la funzione ammina ciclica può venir protonata a valori di pH inferiori a 5. Quindi, grazie a questi due gruppi funzionali polari (acido carbossilico terminale ed ammina ciclica), la molecola può essere ionizzata su tutto il campo di pH, fatto che contribuisce alla sua notevole solubilità in acqua (Hess et al., 2014). A pH fisiologico AZA1 si trova in forma zwitterionica, è dotato di proprietà detergenti (James et al., 2004).

AZA1 è molto solubile in metanolo acquoso ed acetone ma scarsamente solubile in esano. È stato dimostrato anche che gli AZAs tendono a ripartirsi in diclorometano od acetato di etile piuttosto che in acqua od in soluzione salina tampone. Diversi studi hanno dimostrato la solubilità degli AZAs in mezzi puramente acquosi, come l'acqua marina o i mezzi di cultura delle microalghe (Hess et al., 2014).

Gli AZAs non si decompongono nei molluschi alle normali temperature di cottura (fatta eccezione per quelli con un gruppo carbossilico addizionale sul C22) ed, anzi, possono andare incontro ad aumento di concentrazione in seguito alla perdita d'acqua e di altri soluti (Hess et al., 2005). La stabilità di diversi AZAs all'interno dei mitili a temperature fino a 40° C suggerisce come questi composti siano in grado di subire solo piccole degradazioni durante la digestione dei mitili nel tratto digestivo umano alla temperatura corporea, fatto che incrementa la loro tossicità (Hess et al., 2014).

Tabella 1 Lista degli AZAs con relativi analoghi di derivazione, sostituenti, peso molecolare (PM), nomenclatura, fonte e stato (ficotossina, metabolita od artefatto), ove noto (modificato da Rehmann et al., 2008, EFSA 2008a, Hess et al., 2014).

Sigla	Analogo di origine	Sostituente	PM	Nome	Fonte	Stato
AZA1			842.5	azaspiracido	<i>A.spinosum</i>	F
AZA2			856.5	8-metil-azaspiracido	<i>A.spinosum e poporum</i>	F
AZA3			828.5	22-demetil-azaspiracido	<i>A. dexteroporum</i>	F
AZA4	AZA3	OH	844.5	22-demetil-3-idrossiazaspiracido	mitili	M
AZA5	AZA3	OH	844.5	22-demetil-23-idrossiazaspiracido	mitili	M
AZA6			842.5	22-demetil-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA7	AZA1	OH	858.5	3-idrossiazaspiracido	<i>A. dexteroporum</i>	F
AZA8	AZA1	OH	858.5	23-idrossiazaspiracido	mitili	M
AZA9	AZA6	OH	858.5	22-demetil-3-idrossi-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA10	AZA6	OH	858.5	22-demetil-23-idrossi-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA11	AZA2	OH	872.5	3-idrossi-8-metilazaspiracido	<i>A.poporom</i> , mitili	M
AZA12	AZA2	OH	872.5	23-idrossi-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA13	AZA3	2 OH	860.5	22-demetil-3,23-diidrossiazaspiracido	mitili	M
AZA14	AZA1	2 OH	874.5	3,23-diidrossiazaspiracido	mitili	M
AZA15	AZA6	2 OH	874.5	3,23-diidrossi-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA16	AZA2	2 OH	888.5	22-demetil-3,23-diidrossi-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA17	AZA3	COOH	872.5	carbossi-22-demetilazaspiracido	mitili	M
AZA18	AZA1	COOH	885.5	carbossiazaspiracido	mitili	M
AZA19	AZA6	COOH	886.5	carbossi-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA20	AZA2	COOH	899.5	carbossi-22-demetil-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA21	AZA3	COOOH + OH	888.5	carbossi-22-demetil-3-idrossiazaspiracido	mitili	M
AZA22	AZA1	COOOH + OH	901.5	carbossi-3-idrossiazaspiracido	mitili	M
AZA23	AZA6	COOOH + OH	902.5	carbossi-22-demetil-3-idrossi-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA24	AZA2	COOOH + OH	915.5	carbossi-3-idrossi-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA25	AZA3	-H ₂ O		21-22-diidro-22-demetilazaspiracido	mitili	M
AZA26	AZA1	-H ₂ O	824.5	21-22-diidroazaspiracido	mitili	M
AZA27	AZA6	-H ₂ O		21-22-diidro-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA28	AZA2	-H ₂ O		21-22-diidro-22-demetil-8-metilazaspiracido	mitili	M
AZA29	AZA3	COOCH ₃	842.5	22-demetil-azaspiracido-1-metilestere	mitili	A
AZA30	AZA1	COOCH ₃	856.5	azaspiracido-1-metilestere	<i>A.spinosum</i>	A
AZA31	AZA6	COOCH ₃		22-demetil-8-metil-azaspiracido-1-metilestere	<i>A.spinosum</i>	A
AZA32	AZA2	COOCH ₃	870.5	8-metil-azaspiracido-1-metilestere	<i>A.spinosum</i>	A
AZA33			716.5		<i>A.spinosum</i>	F
AZA34			815.5		<i>A. languida</i>	F
AZA36			858.5		<i>A.poporom</i>	F
AZA37			846.5		<i>A.poporom</i>	F
AZA38			829.5		<i>A. languida</i>	F

F= ficotossina, A=artefatto, M=metabolita

Per alcuni analoghi, è stata testata anche la stabilità termica in vari solventi mediante LC-MS/MS. AZA1 e AZA2 sono risultati stabili per un massimo di 30 giorni a temperature fino a 37° C (per 1 anno se conservati in frigorifero), mentre AZA3 e AZA6 (entrambi privi di un gruppo metile sul C22) sono risultati significativamente meno stabili (Hess et al., 2014).

Anche il pH può giocare un ruolo sulla stabilità di questi composti, infatti – come già accennato – gli AZAs sono instabili in soluzioni metanoliche, se esposti a condizioni fortemente acide o basiche. Al contrario, il trattamento acido che coinvolge pepsine ed enzimi digestivi aumenta l'estrazione di AZAs, ecco allora che le condizioni del tratto digestivo umano contribuiscono ad aumentare la biodisponibilità di questi composti piuttosto che diminuirla (Hess et al., 2014).

L'irraggiamento con raggi gamma ha piccoli effetti sulla stabilità degli AZAs quando presenti nella matrice dei molluschi, ma le tossine vanno incontro a rapida degradazione quando irradiate come composto puro in soluzione. In generale, sono considerati dei composti relativamente stabili. (McCarron et al., 2007).

1.3. INTOSSICAZIONI UMANE

I casi di intossicazioni umane sono tutti legati all'ingestione di mitili contaminati e sono caratterizzati da sintomi gastrointestinali quali nausea, vomito, grave diarrea e forti crampi allo stomaco. I sintomi compaiono dopo alcune ore dall'ingestione e permangono per 2-3 giorni. Non sembrano esserci conseguenze croniche (McMahon and Silke, 1996).

Il primo caso di AZP fu registrato nel 1995 nei Paesi Bassi a seguito dell'ingestione da parte di 8 persone di molluschi (*Mytilus edulis*) contaminati provenienti da Killary Harbour, Irlanda (Fig. 4).



Figura 4. Killary Harbour, Irlanda (tratto e modificato da *Google Maps*)

I sintomi manifestati dalle persone intossicate comprendevano nausea, vomito, diarrea e crampi allo stomaco. L'assenza di tossine DSP, a cui potevano essere ricondotti tali sintomi, portò alla scoperta ed all'identificazione del nuovo agente tossico KT-3, rinominato AZA1 (McMahon and Silke, 1996; Satake et al., 1998a). I molluschi raccolti dallo stesso sito cinque mesi dopo l'incidente contenevano 1.14 µg, 0.23 µg e 0.06 µg di AZA1, AZA2 ed AZA3 per g di polpa, rispettivamente (FAO, 2004; Ofuji et al., 1999b).

Nel Settembre 1997, si registrò una nuova intossicazione nell'isola di Arranmore (Irlanda), legata a molluschi locali, che coinvolse 12 persone. Anche in questo caso i sintomi erano gli stessi, con una durata dai 2 ai 5 giorni, prima del completo recupero (Furey et al., 2010). Tale evento portò all'identificazione di AZA2 e AZA3 (Ofuji et al., 1999a; McMahon and Silke, 1998). I molluschi raccolti un mese dopo contenevano 0.87 µg, 0.25 µg e 0.24 µg per g di polpa di AZA1, AZA2 ed AZA3, rispettivamente, per una quantità totale di AZAs pari a 1.36 µg/g di parti edibili di mitili (Ofuji et al., 1999a). Le tossine continuarono a permanere nella polpa dei molluschi a livelli elevati per 8 mesi (Furey et al., 2010).

Nel Settembre 1998 si registrò il primo caso di AZP in Italia, a Ravenna: 10 persone mostrarono i tipici sintomi gastrointestinali in seguito all'ingestione di mitili importati da Clew Bay, nella costa nord-ovest dell'Irlanda. Solo le ghiandole digestive dei molluschi erano disponibili per le analisi, fu stabilito un contenuto totale di AZAs di 1 µg/g di epatopancreas di mollusco e si registrò la presenza di tre analoghi: AZA1 (0.5 µg/g di epatopancreas di mollusco), AZA2 (0.06 µg/g) ed AZA3 (0.44 µg/g) (Furey et al., 2010).

Nel Settembre 1998 si verificò anche il primo caso in Francia, che vide 20-30 persone intossicate dopo l'assunzione di molluschi irlandesi, provenienti da Bantry Bay. I molluschi erano stati considerati sicuri per il consumo umano in seguito al *mouse bioassay*, ma in seguito si scoprì che tale test può dare falsi negativi; infatti, l'analisi LC-MS stabilì che erano presenti alti livelli di AZAs (1.1-1.5 µg/g di polpa). Il caso provocò l'embargo da parte della Francia verso i molluschi irlandesi per gran parte del 1999 (Furey et al., 2010).

Nell'Agosto del 2000 furono registrate alcune intossicazioni in varie regioni del Regno Unito (Warrington, Aylesbury, Isle of Wight, Sheffield), che coinvolsero dalle 12 alle 16 persone. Anche in questo caso l'intossicazione fu provocata dal consumo di molluschi provenienti da Bantry Bay, in Irlanda, precotti e poi congelati, risultati sicuri quando testati col *mouse bioassay*. Anche in questo caso l'analisi LC/MS di mitili raccolti nella stessa baia determinò la presenza di AZA1, 2 e 3 (in totale 0.85 µg/g di polpa, non incluse le ghiandole digestive, quindi probabilmente sottostimati) (Furey et al., 2010).

Nel Gennaio 2002 il consumo di molluschi coltivati in Danimarca provocò 400 intossicazioni ad Anversa, Belgio. Tali intossicazioni si scoprirono essere causate da OA, ma dalle analisi risultò la presenza anche di AZAs. Questo fu il primo caso di AZP legato a molluschi non irlandesi (De Schrijver et al., 2002; Furey et al., 2010).

Non si verificarono altri casi di AZP fino al 2008, quando invece se ne registrarono altri due.

Nell'Aprile 2008 nuovi casi di intossicazione colpirono diverse persone in Francia, in seguito all'ingestione di mitili precotti e congelati, provenienti nuovamente dall'Irlanda. Sfortunatamente, questi mitili erano stati riconosciuti come contaminati da AZAs e messi in quarantena, ma erroneamente poi introdotti in commercio (Furey et al., 2010).

Nel Luglio 2008 si verificò, invece, la prima intossicazione negli USA. Una coppia mangiò mitili precotti e surgelati provenienti nuovamente da Bantry Bay, Irlanda. Si stimò avessero ingerito circa 113-340 g di mitili. Otto ore dopo si manifestarono dolori addominali, vomito (5-15 episodi) e diarrea acquosa (per 30 ore). La presenza di AZAs (0.244 µg/g di polpa) fu determinata tramite LC-MS/MS in diverse confezioni dello stesso prodotto. Più di 150 tonnellate di prodotto surgelato furono volontariamente rimosse dal mercato e distrutte dal produttore (Klontz et al., 2009; Furey et al., 2010).

Comunque, vista la somiglianza della sintomatologia da AZP e quella da DSP, nonché ai sintomi legati ad intossicazioni batteriche o virali del tratto gastrointestinale, il numero di casi di AZP potrebbe essere molto sottostimato (Klontz et al., 2009).

Per fortuna non sono mai stati riportati casi di morte indotta dall'assunzione di queste tossine nell'uomo. Non si hanno informazioni sulla tossicità legata ad esposizione cronica.

1.4. TOSSICITA' IN VIVO

1.4.1. Tossicità per via intraperitoneale

Durante il primo episodio di AZP, avvenuto nel 1995 e legato a molluschi provenienti da Killary Harbour (Irlanda), gli estratti dei mitili, testati secondo il protocollo per le tossine DSP in ratto e in topo (*rat bioassay* (RBA) e *mouse biosassay* (MBA)), diedero esito positivo. Tuttavia, l'assenza di livelli significativi di OA e DTX ed una sintomatologia nel topo atipica per queste tossine, permise di ipotizzare la presenza di un diverso agente tossico, poi isolato come AZA1 (Satake et al., 1998b).

Nel topo la somministrazione i.p. degli estratti acetonicici dei mitili contaminati causò una sindrome neurotossica caratterizzata da letargia, difficoltà respiratorie, spasmi, progressiva paralisi e morte in 20-90 minuti. La minima dose letale via i.p. dell'AZA1 parzialmente purificato (KT-3) risultò pari a 150 µg/kg (Satake et al., 1998a). Tale dose provocò nei topi rigonfiamento di stomaco e fegato, calo del rapporto peso-volume di milza e timo con morte dei linfociti, accumulo di acidi grassi e formazione di vacuoli negli epatociti, pinocitosi nelle cellule parenchimali del pancreas, erosione e sanguinamento dello stomaco (Ito et al., 1998).

Studi successivi, eseguiti con la tossina purificata, stabilirono per AZA1 una dose minima letale via i.p. nel topo pari a 200 µg/kg (Satake et al., 1998b). Per AZA2 la dose minima letale risultò essere 110 µg/kg, mentre per AZA3 140 µg/kg (Ofuji et al., 1999). Furono testati anche AZA4 e AZA5, che risultarono meno potenti, con dose letale minima via i.p. rispettivamente di 470 e 1000 µg/kg (Ofuji et al., 2001). Quindi, le potenze relative dei vari analoghi via i.p. nel topo risultarono essere: AZA2 > AZA3 > AZA1 > AZA4 > AZA5 (Twiner et al., 2008b).

1.4.2. Tossicità acuta per via orale

Studi di tossicità acuta per via orale furono, invece, eseguiti da Ito e collaboratori (1998). Inizialmente usarono estratti di tossina parzialmente purificata (>900 µg/kg), somministrati nel topo attraverso sonda gastrica. Trattando i topi con una dose sei volte superiore a quella letale nel 100% via i.p., non si registrarono sintomi né letalità in seguito a 24 ore dal trattamento, tuttavia, le autopsie di soggetti sacrificati a 4 ore dal trattamento, mostrarono alterazioni a livello gastrointestinale quali accumulo di liquidi nell'ileo e necrosi dei microvilli. Queste alterazioni si aggravavano dopo 8 ore, ma, fatta eccezione per microvilli fusi, erano assenti alle 24 ore (Ito et al., 1998). Il quadro clinico ricordava quello dato da malattie infiammatorie croniche intestinali, come il morbo di Crohn (Pizarro et al., 2003).

Successivamente, lo stesso gruppo poté condurre ulteriori studi di tossicità orale, utilizzando la tossina purificata. Topi maschi ICR furono trattati con AZA1 a dosi da 300 a 900 µg/kg e sacrificati alle 24 ore. Tutti i topi che ricevettero 900 µg/kg vennero sacrificati prima delle 24 ore. Anche se non ci fu una chiara risposta dose-effetto, probabilmente perché vi era un troppo basso numero di topi trattati, fu ipotizzata una dose minima letale approssimativa di 500 µg/kg di AZA1. Dosi di 300 µg/kg di AZA1 indussero accumulo di acidi grassi nel fegato già dopo 1 ora, seguito da sporadica degenerazione ed erosione dei microvilli nel duodeno, degenerazione dei vacuoli nelle cellule epiteliali ed atrofia della lamina propria a 4 ore. Con dosi intermedie tra 500 e 700 µg/kg si osservò progressiva erosione dei microvilli a 8 ore (Fig. 5) e atrofia della lamina propria a 24 ore.

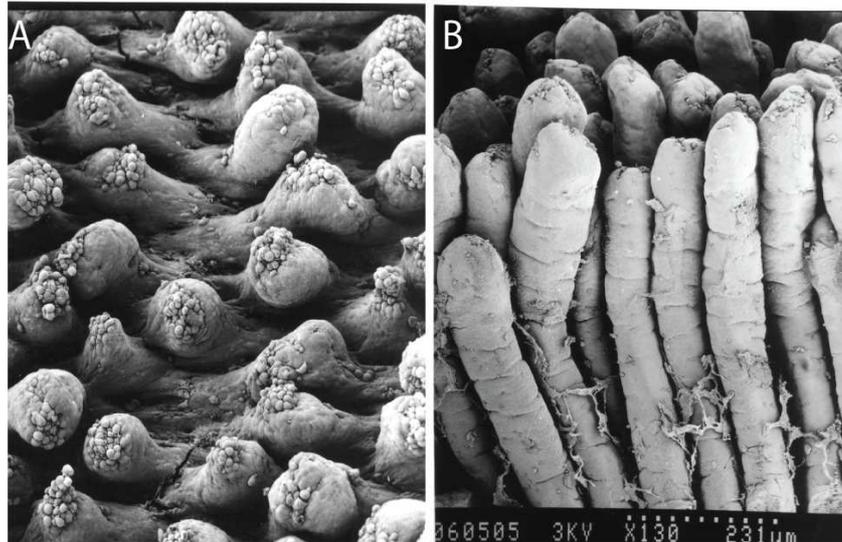


Figura 5. Microscopia elettronica a scansione di (A) villi intestinali di topo 8 ore dopo l'esposizione a 700 µg/kg AZA1 e (B) villi intestinali murini non trattati (tratto da Twiner, 2008a).

A 24 ore, tuttavia, si osservò una minore degenerazione dei microvilli, possibile indice di recupero del danno. Il fegato aumentò di peso del 38% nel gruppo trattato con 500 µg/kg. Si registrarono anche effetti necrotici dose e tempo dipendenti nei linfociti di milza, timo e placche di Peyer. AZA1 (600 e 700 µg/kg) diminuì del 33% il numero di linfociti T e B. Non si osservarono cambiamenti istologici a reni, cuore e polmoni; il cervello non fu purtroppo analizzato (Ito et al., 2000).

Comparando gli effetti a quelli indotti da OA sempre per via orale nel topo, si vide che la comparsa dei sintomi è più ritardata ma anche i tempi di ripresa sono maggiori. Se l'azione dell'OA insorge in 30 minuti e c'è una ripresa evidente in 8 ore, gli AZAs invece provocano cambiamenti istopatologici a livello intestinale più lentamente, dopo 4 ore, ma anche la ripresa richiede tempi più lunghi, talvolta perfino mesi, in virtù di alterazioni maggiormente marcate (Ito et al., 2000).

Più recentemente anche il gruppo di Aasen e collaboratori (2010) ha effettuato uno studio con singole dosi sub-letali di AZA1 per via orale nel topo, per valutare la distribuzione e i danni indotti dalla tossina. Topi femmina NMRI sono stati trattati con dosi di 100, 200 or 300 µg/kg di AZA1. La tossina è stata assorbita in modo dose-dipendente. Le concentrazioni più elevate alle 24 ore sono state rilevate in reni, milza e polmoni, seguite da quelle in fegato e cuore; solo tracce sono state invece osservate nel cervello. Dopo sette giorni, i livelli di AZA1 erano scesi in modo significativo in tutti gli organi, ad eccezione dei reni. La concentrazione maggiore di tossina assorbita si è registrata nel fegato, seguita da quelle nei reni, polmoni, milza e cuore. La quantità totale di tossina rilevata negli organi interni alle 24 ore dal trattamento, è stata stimata essere solo il 2% della dose somministrata ad ognuno dei tre gruppi. Lo stomaco è risultato patologicamente normale, ma vi era

una massiccia ritenzione di cibo *in loco*, segno di costipazione. Sono state rilevate alterazioni patologiche solo nella parte superiore del duodeno, in cui si sono osservati: accorciamento dei villi, espansione delle creste e cambiamenti necrotici nella lamina propria. Gli effetti sono risultati essere dose-dipendenti, con pieno recupero dei danni in sette giorni (Aasen et al., 2010).

1.4.3. Tossicità ripetuta per via orale

Vi è un solo studio in letteratura sulla tossicità ripetuta degli AZAs. Un primo *set* di esperimenti è stato condotto per valutare i tempi di recupero (*recovery*) legati ai danni indotti da queste tossine: 25 topi maschi sono stati trattati con due dosi ripetute di 250, 300, 350 o 450 µg/kg di AZA1, in un intervallo di 3 giorni, e quindi monitorati per 90 giorni dall'esposizione. I topi mostrarono effetti dalla gravità maggiore rispetto a quelli registrati in seguito a somministrazione di singole dosi orali. Questo studio ha portato a suggerire una revisione della dose minima letale per via orale di AZA1 al di sotto dei 450 µg/kg, ma poiché il numero di topi per dose era insufficiente, non è stato possibile definirne il valore esatto. I tempi necessari per il *recovery* sono risultati essere diversi da organo ad organo: 7 giorni per il fegato, 10 per il tessuto linfatico, 56 per i polmoni, più di 12 settimane per lo stomaco (Ito et al., 2002).

Lo stesso gruppo ha poi condotto un secondo *set* di esperimenti in cui 50 topi maschi sono stati trattati con 40 somministrazioni orali ripetute (2 dosi a settimana) per 145 giorni impiegando dosi più basse di tossina (10 topi trattati con 50 µg/kg di AZA1, 10 con 20 µg/kg, 5 con 5 µg/kg, 6 con 1 µg/kg, 19 topi come controllo). Si è registrata una diminuzione del peso di vari organi (cuore, fegato, reni, milza e timo), rispecchiata da una diminuzione complessiva del 35% del peso corporeo. Probabilmente questi effetti sono legati ad un diminuito assorbimento di nutrienti dovuto ai danni indotti al tratto GI. Il tratto GI mostrava nuovamente segni di erosione (edema, accorciamento e danneggiamento dei microvilli) ed accumulo di gas. Si osservavano nuovamente gli effetti tipici a milza e timo, infiammazione del fegato, con variazione del contenuto in acidi grassi, nonché polmonite interstiziale. Si è manifestata inoltre iperplasia dello stomaco (incidenza del 60%: 6/10 topi nel gruppo trattato con 20 µg/kg), benché non concentrazione-dipendente. Nel 20% dei topi (4/20 nei topi trattati con 20 µg/kg e 50 µg/kg) sono comparsi tumori ai polmoni nel periodo di *recovery*, dopo 2-3 mesi dall'assunzione della tossina. Di conseguenza, AZA1 è sospettato essere un promotore tumorale, anche se il numero di animali impiegato nello studio era troppo ridotto per consentire conclusioni definitive (Ito et al., 2002).

1.4.4. Studi di relazione struttura-attività

Ulteriori studi hanno dimostrato che la stereochimica e l'integrità dello scheletro carbonioso della tossina sono caratteristiche fondamentali per esplicitare l'effetto tossico. Infatti, in seguito a somministrazione orale/i.p. in 76 topi maschi, trattati con AZA1 sintetico, il diastereoisomero C₁-C₂₀-*epi*-AZA1 e 12 analoghi troncati, non si è manifestata la stessa tossicità. Gli analoghi troncati non hanno dimostrato alcuna attività tossica né dopo esposizione orale né dopo somministrazione i.p.. C₁-C₂₀-*epi*-AZA1 ha mostrato nei topi trattati per os un'azione tossica, ma con potenza 3-4 volte minore rispetto ad AZA1. Infatti, se per quest'ultimo l'effetto si manifestava già con una dose di 0,7 mg/kg, per il diastereoisomero il dosaggio necessario saliva a 3 mg/kg. Inoltre, nello stesso studio è stato osservato che l'AZA1 ottenuto tramite processo di sintesi dava gli stessi sintomi dell'AZA1 di origine naturale estratto in acetone da molluschi irlandesi, ma con potenza leggermente minore in quanto la tossicità si osservava a dosi lievemente maggiori (0,7 mg/kg per AZA1 sintetico invece dei 0,5 mg/kg per quello naturale) (Ito et al., 2006).

1.4.5. Tossicità orale indotta dagli AZAs in associazione con altre tossine algali

E' noto che gli AZAs possono essere rilevati nei molluschi in concomitanza con altre tossine algali, quali pectenotossine (PTX), yessotossina (YTX) e le tossine DSP, quali OA e DTX. Ci si è chiesti quindi quali potessero essere gli effetti combinati di queste tossine se ingerite dall'uomo quando compresenti nei molluschi.

Il primo tentativo di dare una risposta alla questione fu uno studio di tossicità acuta nel topo in seguito a somministrazione orale di pectenotossina-2 (PTX2, 5 mg/kg) associata ad AZA1 (200 µg/kg). Sebbene la somministrazione contemporanea delle due tossine non provocò alcun sintomo clinico nei topi, è stato registrato un considerevole aumento dell'assorbimento/distribuzione di PTX2 nei topi esposti a PTX2/AZA1 rispetto che alla sola PTX2. Ciò risultò particolarmente evidente in polmoni, sangue, milza, reni e fegato. La combinazione ha anche indotto maggiori danni patologici a livello del duodeno (maggiore edema nella lamina propria e fusione dei villi), ma non in altri tessuti/organi (Aune et al., 2009). Tuttavia, il parere espresso dalla *European Food Safety Authority* (EFSA) a riguardo è che questo incremento non sia così rilevante (EFSA, 2009a).

La YTX ha una bassa tossicità per via orale ma è altamente tossica se somministrata i.p.; poiché AZA1 è ben noto per distruggere la parete epiteliale del tratto GI, si è ipotizzato che questo potesse favorire un maggiore assorbimento della YTX. Tuttavia, questa ipotesi non è stata confermata da uno studio di tossicità acuta nel topo in seguito a somministrazione orale di YTX (1

o 5 mg/kg) associata a AZA1 (200 mg/kg). Infatti, i livelli di YTX nei vari organi non sono risultati influenzati dalla presenza di AZA1; al contempo, anche l'assorbimento di AZA1 non ha subito variazioni rilevanti. Non vi è stato neppure un peggioramento dei sintomi e dei danni indotti dalle due tossine singolarmente (Aasen et al., 2011). Anche in questo caso, quindi, l'EFSA ha concluso che la combinazione non crei sinergismi rilevanti tra le due tossine (EFSA 2008b).

Interessanti sono le possibili interazioni con OA, in quanto anch'esso agisce a livello gastrointestinale. A tal fine sono stati eseguiti studi *in vivo* su topi femmina per valutare gli effetti dell'associazione tra AZA1 (570 µg/kg) e OA (780-880 µg/kg). Tuttavia, non è stato riportato sinergismo d'azione, al contrario, il co-trattamento ha portato ad un calo dell'assorbimento di entrambe le tossine, probabilmente dovuto a meccanismi di competizione (Aune et al., 2012).

1.5. TOSSICITA' IN VITRO

1.5.1. Effetti sull'attività delle protein-fosfatasi

Viste le similitudini tra AZP e DSP inizialmente si pensò che gli AZAs agissero come l'OA inibendo la protein-fosfatasi 2A (PP2A). Tuttavia, da studi effettuati su linee di cellule epatiche HepG2 e di carcinoma della vescica umana ECV-304, esposte ad estratti di mitili contaminati, emerse l'assenza di un'inibizione delle PP1 e PP2A (Flanagan et al., 2001), facendo così ipotizzare un diverso meccanismo d'azione (Twiner et al., 2005). Nonostante la molteplicità di effetti a cui queste tossine danno luogo e il numero di studi *in vitro* effettuati, il meccanismo d'azione non è ancora noto (Sala et al., 2013).

1.5.2. Effetti citotossici

La citotossicità degli AZAs è dose e tempo-dipendente e si esplica già a basse concentrazioni di tossine (10^{-10} - 10^{-8} M) come rilevato negli studi su colture primarie di granulociti cerebellari (CGCs), sulla linea monocitaria THP-1, sulle linee linfocitarie Raji e Jurkat E6-1, sulla linea di cellule renali HEK-293, di cellule polmonari A549, di cellule ipofisarie di ratto GH₄C₁ e di cellule di neuroblastoma Neuro-2A (Twiner et al., 2005). Generalmente, sono richiesti lunghi tempi di esposizione per osservare morte cellulare (>24 ore), tranne su colture primarie neuronali dove il danno compare già dopo 8 ore a concentrazioni nel *range* del nM. I neuroni sono infatti il modello cellulare più sensibile e già dopo 2 minuti di esposizione a AZA1 10 nM vengono indotti

cambiamenti morfologici irreversibili, con arrotondamento delle cellule e perdita dei neuriti (Vale et al., 2007).

1.5.3. Effetti sulla morfologia cellulare

Durante tutti gli studi di citotossicità condotti negli anni si sono osservati molti effetti morfologici diversi. Nei linfociti T esposti ad AZAs si è osservata una perdita dell'integrità di membrana, con appiattimento delle cellule e ritrazione delle estroflessioni citoplasmatiche e di membrana, quali pseudopodi e lamellipodi (questo effetto è indotto solo da AZA1, non da AZA2 e AZA3), infine lisi cellulare (Twiner et al., 2012a). In cellule di neuroblastoma, AZA1 induce arrotondamento cellulare e distacco dalle cellule adiacenti (Vilariño et al., 2006), nonché - a livello intracellulare - distruzione dell'apparato del Golgi ed accumulo di vescicole (Kellmann et al., 2009). Esperimenti condotti su cellule di tumore al seno e fibroblasti di topo esposti a AZA1 hanno anche dimostrato una riduzione della proliferazione e della densità cellulari, effetti simili a quelli indotti da YTX, facendo presupporre meccanismi simili tra le due classi di ficotossine (Ronzitti et al., 2007).

1.5.4. Effetti sul citoscheletro

Lo studio che per primo documentò gli effetti degli AZAs a livello del citoscheletro fu condotto da Roman e collaboratori. Riconstrarono, in cellule di neuroblastoma BE(2)-M17 esposte ad AZA1, un calo di concentrazione dell'actina filamentosa (F-actina), con depolimerizzazione. Non ritennero però che potesse essere il meccanismo principale dell'azione citotossica, in quanto insorgeva a concentrazioni maggiori ($7,5 \times 10^{-6}$ M) di quelle a cui compariva la citotossicità (10^{-10} - 10^{-8} M) (Roman et al., 2002). Studi successivi, comunque, riportano riarrangiamenti del citoscheletro nei linfociti T e nelle cellule BE(2)-M17 già a concentrazioni di 10^{-8} - 10^{-7} M (Vilariño et al., 2006 e 2007). Vilariño e collaboratori riportano che, nelle cellule di neuroblastoma esposte ad AZA1 e ad un suo enantiomero, si osservarono cambiamenti morfologici ed al citoscheletro in 24-48 ore. I microfilamenti di actina, normalmente distribuiti in tutto il citosol, si mostravano concentrati in spessi prolungamenti cellulari (Vilariño et al., 2007).

1.5.5. Effetti apoptotici e necrotici

Mentre molte ficotossine, come le DSP e l'OA, sono note induttrici di apoptosi cellulare, studi iniziali suggerirono che AZA1 non inducesse invece apoptosi, bensì lisi necrotica. Queste conclusioni erano state tratte sulla base degli effetti citotossici osservati a livello morfologico (Twiner et al., 2005), all'assenza di cambiamenti nel potenziale della membrana mitocondriale nelle cellule di neuroblastoma ed all'assenza di una popolazione sub-G1 in cellule leucemiche, esposte ad AZA2 (Roman et al., 2002).

Tuttavia, studi più recenti, suggeriscono invece che AZA1 induca apoptosi. Nelle stesse cellule di neuroblastoma usate nelle precedenti indagini, il gruppo di Vilariño e collaboratori, usando sonde fluorescenti specifiche per le caspasi, ha dimostrato come queste vengano attivate dopo 48 ore di esposizione ad AZA1 50 μM (Vilariño et al., 2007), senza però determinare nello specifico quali siano i sottotipi di caspasi (es. -1, -3, -7, -9, etc.) sovra-regolate. Anche nei linfociti T, si è vista una sovra-regolazione del promotore delle caspasi 2 e 10 e dell'effettore delle caspasi 3/7, nonché presenza di livelli elevati di citocromo c intracellulare solubilizzato e frammenti di DNA, entrambi indici di apoptosi (Twiner et al., 2012b). In cellule di neuroblastoma, si sono visti altri due meccanismi di tipo apoptotico: AZA1 (15 nM) induceva deplezione di ATP cellulare in 3 ore e sovra-regolazione di proteine Bax in 12 ore (Kellmann et al., 2009). In neuroni corticali esposti ad AZA1 (1 μM), vi era un'evidente condensazione nucleare e la percentuale di cellule apoptotiche aumentava dal 7 % al 63 % dopo 24 ore di esposizione (Cao et al., 2010).

In definitiva, si ritiene che gli AZAs possano indurre sia la morte cellulare per apoptosi che per necrosi (Twiner et al., 2012; Cao et al., 2010).

1.5.6. Effetti sul signaling cellulare

Gli AZAs producono, inoltre, svariati effetti sulle molecole di segnale intracellulari. Nelle cellule di mammifero, il calcio citosolico è un secondo messaggero importante in molte vie, inclusa la morte cellulare, e molte tossine marine sono note per modulare questa molecola. Anche l'adenosin monofosfato ciclico (cAMP) è un secondo messaggero, che in seguito all'attivazione del recettore di membrana, promuove l'attivazione di chinasi. Sono stati condotti interessanti studi su linfociti umani per valutare gli effetti di vari analoghi degli AZAs (AZA1-5, 10^{-7} - 10^{-6} M) sui livelli di calcio citosolico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), cAMP e pH citosolico (pH_i). Si è visto che la struttura dei vari analoghi può influenzare i loro effetti. Infatti, AZA1 e AZA2 hanno entrambi indotto un aumento di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e cAMP, tramite rilascio di calcio dai depositi intracellulari e ingresso di calcio

extracellulare, senza però influenzare il pH_i (Roman et al., 2002 e 2004; Alfonso et al., 2006). AZA3 ha indotto un incremento di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e di cAMP, tramite ingresso di calcio extracellulare ma senza coinvolgere i depositi di calcio intracellulari, incrementando anche il pH_i (Roman et al., 2004; Alfonso et al., 2006). AZA4 ha inibito i canali SOC (*store operated channels*) e l'aumento del pH_i (Alfonso et al., 2005). AZA5 non ha modificato né il $[\text{Ca}^{2+}]_i$ né il pH_i (Alfonso et al., 2006). La differenza degli effetti indotti dagli AZAs è stata attribuita ai diversi sostituenti presenti nelle strutture dei vari analoghi, sembra infatti che la presenza di un gruppo metile o di un gruppo idrossilico sia determinante per l'attivazione od inibizione dell'ingresso di calcio. Studi analoghi furono condotti dal gruppo di Vale e collaboratori su CGCs, riscontrando nuovamente l'interferenza di AZA1, AZA2 e AZA3 con molecole di segnale intracellulari, con aumento di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e cAMP (Vale et al., 2007 e 2008). Sebbene questi studi non abbiano permesso la delucidazione del meccanismo d'azione, la modulazione di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e cAMP potrebbe essere influenzata dalla modulazione di una proteina di membrana.

Un recente lavoro di Vale e collaboratori ha dimostrato che gli AZAs influenzano l'attivazione di alcune protein-chinasi attivate da mitogeno (MAPK), tra le quali la c-Jun-N protein-chinasi terminale (JNK). Inoltre, è stato dimostrato che AZA1 ed AZA2, a basse concentrazioni, inibiscono l'attività bioelettrica del cordone spinale neuronale, senza interferire nelle correnti di Na^+ e Ca^{2+} . Tale attività avviene con coinvolgimento di JNK, in quanto l'effetto di AZA1 e AZA2 si accompagna all'incremento di JNK sia totale che fosforilato (Vale et al., 2008 e 2009).

Sono, quindi, stati testati gli effetti di AZA1 sul rilascio di neurotrasmettitori, su colture neuronali. AZA1 non ha mostrato effetti di sorta sui recettori colinergici, purinergici o inotropici; comunque la presenza di inibitori GABA_A ha promosso gli effetti di AZA1 sull'attività bioelettrica del cordone spinale neuronale (Vale et al., 2010).

1.5.7. Effetti sulle proteine

Recenti studi hanno dimostrato effetti degli AZAs su proteine di membrana, come claudine e caderine. Le claudine sono proteine integrali di membrana coinvolte nell'adesione tra cellule tramite *tight junctions*, mentre le caderine sono glicoproteine transmembrana coinvolte nell'adesione cellula-cellula calcio-dipendente; entrambe sono necessarie per il mantenimento dell'architettura cellulare. In cellule intestinali Caco-2 esposte ad AZA1 si è riscontrato un incremento dell'espressione delle frazioni solubili e insolubili di claudina-2 e un decremento di claudina-3 insolubile (Twiner et al. 2008). Le E-caderine sono anch'esse proteine transmembrana di

adesione coinvolte nell'adesione cellula-cellula. Si è visto che in cellule epiteliali MCF-7, esposte ad AZA1 ($EC_{50} = 0.47 \text{ nM}$) per 24 ore, vi è una riduzione della proliferazione cellulare connessa ad una perdita della capacità di adesione cellula-cellula, legata ad una frammentazione dell' E-caderina, che si traduce in una sovra-regolazione di un dominio extracellulare della proteina (Ronzitti et al., 2007).

Sono riportati anche cambiamenti nell'espressione di altre proteine indotti da AZA1, ad esempio dei recettori per LDL (trasportatori del colesterolo nel sangue) nei linfociti, della catepsina D (favorisce la proliferazione delle cellule tumorali), di p53 (inibitore delle cellule tumorali) e delle proteine coinvolte nella regolazione del citoscheletro e del metabolismo energetico nella linea cellulare MCF-7 e nella linea di neuroblastoma SH-SY5Y (Bellocci et al., 2010; Kellmann et al., 2009).

1.5.8. Effetti su canali ionici

Diversi studi hanno dimostrato che gli AZAs alterano i flussi di calcio intracellulare (Cao et al., 2010; Roman et al., 2002 e 2004; Alfonso et al., 2005), l'omeostasi protonica (Alfonso et al., 2006), inducendo quindi iperpolimerizzazione di membrana (Vale et al., 2010).

Nei CGCs, i bloccanti dei canali anioni e la ouabaina promuovono gli effetti citotossici di AZA1 in neuroni immaturi, mentre li aboliscono in altre colture (Vale et al., 2010). L'esposizione di colture neuronali ad AZA1 produce un marcato decremento nel volume neuronale, effetto però ridotto pre-incubando le cellule con DIDS, bloccante dei canali per il cloro, o amiloride, bloccante della pompa sodio/potassio ATPasi (NaKA) (Vale et al., 2010). Recentemente, è stato condotto uno studio sugli effetti degli AZAs (una miscela di AZA1-3, 348 nM) su vari canali ionici. Benché non si siano visti effetti sui canali per il sodio voltaggio-dipendenti (VGSCs), sui canali per il calcio voltaggio-dipendenti *L-type* (Cav1.2), sui canali per il potassio voltaggio-dipendenti *inward-rectifying* (Kir2.1), sui canali per il potassio nucleotide ciclico-dipendenti attivati dall'iperpolarizzazione (HCN4) e su tre canali per il potassio voltaggio-dipendenti; si è invece visto un significativo effetto inibitorio sul gene umano dei canali per il potassio *ether-a-go-go related gene* (hERG) (Twiner et al., 2014). Si è poi visto che nelle cellule renali HEK-293, seppur a concentrazioni elevate ($0,06 - 1.90 \times 10^{-6} \text{ M}$ con *range* di $IC_{50} = 0,6 - 0,8 \times 10^{-6} \text{ M}$), AZA1, 2 e 3 bloccano in uno stato aperto i canali hERG. Considerando comunque che le concentrazioni utili per tale effetto sono di due ordini di grandezza più elevate di quelle capaci di causare citotossicità e

danni al citoscheletro, appare probabile che il meccanismo d'azione principale di queste tossine sia un'altro (Twiner et al., 2012c).

1.6. METODI ESTRATTIVI

Per gli AZAs si usano soprattutto tipi di estrazione liquido-solido (LSE), in vari solventi, con diversi rapporti campione-solvente (RCS) e con numerosi passaggi estrattivi. Negli studi atti a valutare presenza e distribuzione degli AZAs è stato usato come solvente l'acetone. Gli estratti venivano poi ripartiti in etilacetato o dietilere ed acqua, prima di essere dissolti in metanolo od acetonitrile acquoso per svolgere le analisi. In realtà poco si sa sull'efficacia dell'acetone come solvente estrattivo iniziale. Nelle analisi di monitoraggio è stato usato metanolo 80% o metanolo 90% (Hess et al., 2014).

Un vero e proprio studio sulle procedure per estrarre gli AZAs dai mitili è stato condotto dal gruppo di Hess, nel 2005. La doppia estrazione con metanolo ha dato rese migliori che con l'acetone 100%. Un incremento >10% della resa si è avuto passando da un singolo passaggio estrattivo con metanolo 80% con un RCS 1:4 ad una doppia estrazione in metanolo 100% con un RCS 1:12.5. Una doppia estrazione metanolica è quella attualmente usata per le tossine lipofile (Hess et al., 2005).

Recenti studi per ottenere del materiale di riferimento (RMs) per le analisi hanno dimostrato come una tripla estrazione in metanolo dia una resa >99% per AZA1, 2, 3 e 6 (McCarron et al., 2011). Per il RMs oggi viene richiesta una procedura estrattiva di addirittura 4 passaggi in metanolo, ma non è necessario per analisi di screening e monitoraggio (Hess et al., 2014).

1.7. METODI DI RILEVAMENTO

Gli AZAs furono regolamentati per la prima volta dall'Unione Europea (UE) nel 2002, il metodo di riferimento scelto all'epoca fu il MBA per le tossine DSP, sviluppato dal gruppo del Prof. Yasumoto nel 1984 (Yasumoto et al., 1984). Poiché gli esteri dell'OA richiedono tempi lunghi per esplicitare la loro tossicità nel topo, fu scelto un tempo di esposizione di 24 ore per tutte le tossine lipofile. Il saggio è considerato positivo quando due topi su tre trattati via i.p. con gli estratti dei mitili muoiono nelle 24 ore. Tale metodo era in grado di rilevare i 160 µg AZAs equivalenti/kg di polpa di mollusco indicati come limite regolatorio in quel periodo (Hess et al., 2014).

Nel 2009, Hess e collaboratori hanno attuato uno studio per capire se il MBA fosse in grado di rilevare gli AZAs a concentrazioni inferiori al limite regolatorio. Per far ciò hanno diluito gli epatopancreas di mitili contaminati con tessuto privo di tossine al fine di ottenere concentrazioni inferiori al limite regolatorio (determinate tramite LC-MS/MS), quindi hanno testato gli estratti di epatopancreas mediate MBA in 7 set di esperimenti indipendenti per un periodo di 6 mesi. Il test ha dato responso positivo sia nei pressi che sotto il limite regolatorio, per cui se pur non quantitativo, è stato ritenuto utile a garantire la sicurezza per la salute dell'uomo (Hess et al., 2009). Va però tenuto conto del fatto che tali test sono stati eseguiti solo sugli epatopancreas e non sul resto dei tessuti dei mitili, dove oggi si sa che gli AZAs possono migrare nel tempo e quindi andare ad incrementare la concentrazione totale di tossine presenti.

In generale, il MBA non è un metodo né specifico né selettivo, non dà informazioni sul profilo delle tossine presenti ed, inoltre, non è quantitativo (James et al., 2001; Hess et al., 2014). La natura qualitativa di questo test lo rendeva inadatto ad essere utilizzato da solo nei programmi di monitoraggio, perché comunque doveva essere seguito da un test di tipo quantitativo per conoscere la concentrazione e la natura delle tossine presenti. Nell'ottica di migliorare specificità ed accuratezza, nonché per motivi etici, l'intenzione fu di sostituire il MBA con un metodo strumentale (Hess et al., 2014). Si pensò di usare la cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa (LC-MS), come metodo di rilevamento e quantificazione degli AZAs (Hess et al., 2014). Fu utilizzata per la prima volta nel 1999 per la quantificazione di AZA1, 2 e 3 in matrici complesse di mitili, ma necessitava di un passaggio antecedente di pulizia dalle interferenze, tramite estrazione in fase solida (SPE). Per la SPE usarono una colonna C18 con una fase mobile acida e un'eluizione isocratica. Il limite di rilevamento fu di 50 pg (Ofuji et al., 1999b). Successivamente Draisci e collaboratori misero a punto un'analisi LC-MS/MS usando uno strumento a triplo quadrupolo multiplo, con un limite di rilevamento per AZA1 di 20 pg (Draisci et al., 2000); altri abbinarono strumenti a trappola ionica (Furey et al., 2002; Lehane et al., 2002; Blay et al., 2003). I metodi che utilizzavano la MS in tandem furono poi applicati per il rilevamento di AZA1, 2, 3 e 6, nonché di tutta una serie di analoghi idrossilati (AZA4, 5, 7, 8, 9, 10 e 11) (James et al., 2003a). Oltre che per l'identificazione di nuovi analoghi nei mitili, la LC-MS/MS, in particolare con un cromatografia liquida ultra-performante (UPLC), servì anche per caratterizzare più di 20 analoghi contemporaneamente (Rehmann et al., 2008).

Poiché i mitili possono contenere un insieme di tossine lipofile, alcune regolamentate altre no, sono stati sviluppati anche dei metodi multi-tossina LC-MS/MS, *in primis* da Quilliam e collaboratori (2001). Successivamente, una serie di metodi cromatografici multi-tossina sono stati

sviluppati usando condizioni acide (pH 2,3), neutre (pH 6,8), moderatamente alcaline (pH 7,9) ed alcaline (pH 11) (Hess et al., 2014).

Vennero fatti vari tentativi di validare un metodo LC-MS/MS, ma gli unici che dimostrarono la veridicità e riproducibilità del metodo furono Gerssen e collaboratori, che misero a punto una LC-MS/MS in condizioni alcaline con un limite di rilevamento (LOD) di 2 µg AZA1/kg di polpa di mollusco (Gerssen et al., 2009). Il successo di questo gruppo nell'accreditare la metodologia, dimostrò l'effettiva applicabilità della tecnica nei programmi di monitoraggio.

Dal 2001 al 2011 l'autorità per la sicurezza alimentare irlandese decise di impiegare nei programmi di monitoraggio una combinazione di MBA e LC-MS/MS. L'accordo tra le due metodologie in quel periodo risultò pari al 93% (Hess et al., 2014).

Dal 2011, L'UE ha scelto di utilizzare la LC-MS/MS piuttosto che il MBA quale principale metodo di monitoraggio delle tossine liofile nei molluschi (Hess et al., 2014).

Nell'ambito del progetto ASTOX è stata, inoltre, un successo la purificazione e l'isolamento di AZA1, AZA2 ed AZA3 al fine di ottenere dei RMs, disponibile sul mercato, che funga da calibratore per le tecniche strumentali e permetta il confronto dei risultati tra più laboratori. Nell'ambito dello stesso progetto è stato ottenuto, tramite analisi LC-MS/MS e conferma alla LC-FLD, anche dei RMs matrice, che torni utile nel definire le *performance* dei metodi analitici, come le procedure estrattive, la valutazione di effetti matrice e l'accuratezza della metodologia (Hess et al., 2007).

Si sono cercate anche metodologie alternative e più efficaci per il rilevamento degli AZAs. La presenza del gruppo carbossilico terminale e di un'ammina ciclica offriva del potenziale per una derivatizzazione chimica seguita da metodologie cromatografiche abbinata a rilevamento con ultravioletti (UVD) o a fluorescenza (FLD). Recentemente è stato applicato con successo agli AZAs un metodo HPLC-FLD, in precedenza utilizzato per l'OA e i suoi derivati, che prevede la derivatizzazione dell'acido carbossilico terminale con 9-antrialdiazometano seguita da HPLC-FLD. Il metodo se pur laborioso nelle fasi di estrazione e purificazione, non risente di effetti matrice e offre un'alternativa per la quantificazione degli AZAs (McCarron et al., 2011).

Forsyth e colleghi hanno sviluppato un anticorpo specifico per una porzione della struttura comune a tutti gli AZAs usando apteni sintetici, ma il saggio nella sua forma attuale non è ancora abbastanza sensibile per analisi di routine nei mitili (Forsyth et al., 2006).

Invece, nel 2015, il gruppo Samdall e collaboratori ha messo a punto un interessante test ELISA, che lavora in un *range* di concentrazioni 0.45-8.6 ng/mL e mostra un limite di quantificazione (LOQ) pari a 57 µg di AZA equivalenti/kg di polpa di mollusco, ben al di sotto del limite massimo indicato dall'UE. Il test ha una buona reattività crociata per AZA1, AZA10, AZA33,

AZA34 e 37-*epi*-AZA1. L'analisi di mitili irlandesi contaminati, sia cotti che crudi, ha dato risultati simili, dimostrando che il test è in grado di rilevare anche i 22-carbossi-metaboliti degli AZAs (es. AZA17 e AZA19), che si formano soprattutto dopo la cottura. Si è vista un'eccellente correlazione tra i risultati del metodo ELISA e la LC-MS/MS, sia per mitili contaminati sia naturalmente che artificialmente. Il test ELISA può, quindi, tornare utile sia ai fini del monitoraggio sia per analisi sul metabolismo degli AZAs (Samdall et al., 2015).

1.8. REGOLAMENTAZIONE DEGLI AZAs

Il primo studio di valutazione del rischio legato agli AZAs fu condotto dalla *Food Safety Authority* irlandese (FSAI) nel 2001, la quale concluse che 100 µg AZAs/kg polpa di mollusco dovevano essere la soglia sopra la quale non si verificava AZP (FSAI, 2001).

Sempre nel 2001, l'*European working group* EU WG 2001 stabilì che la minima dose a cui si osservano effetti avversi (LOAEL) per gli AZAs fosse compresa tra 23 ed 86 µg/persona (applicarono un fattore di sicurezza 3 per compensare una suscettibilità individuale), quindi un quantitativo di 80 µg AZAs /kg polpa di mollusco doveva assicurare l'assenza di AZP. Tuttavia, il fatto che all'epoca il MBA fosse il metodo di riferimento, portò l'UE a raddoppiare il limite per sicurezza (a 160 µg AZAs /Kg polpa di mollusco), nella speranza che l'eventuale presenza di tossina fosse rilevata dal test (Furey et al., 2010).

Il gruppo di esperti dell'UE che si riunì nel 2004, mantenne la LOAEL stabilita dal EU WG 2001, ma raccomandò di applicare un fattore di sicurezza 10, visto il basso numero di persone colpite da questa intossicazione. Ricavarono una dose acuta di riferimento (ARfD) di 0.04 µg AZAs /kg di peso corporeo, calibrandoli su una persona di peso medio di 60 kg (2.4 µg AZAs in un adulto medio). Quindi il livello guida (GL) di AZAs che ricavarono in tre diverse porzioni di molluschi fu: 24 µg /100 g di mitili, 9.6 µg /250 g di mitili e 6.3 µg /350 g di mitili (FAO/IOC/WHO, 2004).

Il gruppo EU WG 2005 mantenne la LOAEL stabilita nel 2001, ma ridussero di nuovo il fattore di sicurezza a tre, poiché c'erano pochi casi d'intossicazione rispetto a milioni di tonnellate di molluschi consumati ogni anno. Ricavarono un GL di 32 µg AZAs /kg polpa di molluschi (Furey et al., 2010).

Nel 2006 la FSAI condusse una nuova valutazione del rischio, scoprendo che, quando i mitili venivano bolliti, vi era un raddoppio della concentrazione di AZAs nella polpa; quindi rividero la LOAEL portandola a 55.1-253.3 µg/persona. Con una media di 113.4 µg/persona, calcolarono una ARfD di 38 µg AZAs /kg di peso corporeo ed un GL di 151 µg AZAs /250 g di mitili (Hess et al., 2005, Furey et al., 2010).

Nel 2008 l'EFSA, basandosi su tutti i dati a disposizione, stabilì che il limite regolatorio di 160 µg AZA1 equivalenti/kg polpa di mollusco fosse troppo alto. Stimarono che una porzione media di molluschi a persona si aggirasse in realtà intorno ai 400g, ricavando di conseguenza una nuova ARfD di 0.2 µg AZA1 equivalenti/kg di peso corporeo. Raccomandarono quindi di abbassare il limite di AZAs a 30 µg AZA1 equivalenti/kg polpa di mollusco, da stabilirsi via LC-MS/MS ed impiegando RMs (EFSA, 2009b).

Tuttavia, il limite regolatorio europeo resta di fatto fissato a 160 µg AZA1 equivalenti (intesi come AZA1, 2 e 3)/kg polpa di mollusco, sebbene vi sia stato un cambio riguardo al metodo di riferimento indicato per le analisi, che non è più il MBA bensì la LC-MS/MS (EFSA, 2008).

Negli USA la *Food and Drug Administration* (FDA) ha stabilito un dose che genera AZP di 0.16 ppm (es. 160 µg/kg) di AZAs equivalenti, che sostanzialmente ricalca il limite europeo (Anon, 2011).

In Giappone e in molti altri paesi asiatici il metodo d'analisi di riferimento è ancora il MBA, con un limite di rilevamento di 160 µg di AZA1 equivalenti/kg di polpa di mollusco, per cui il limite regolatorio può essere considerato – anche in questo caso – pari a quello europeo (Hess et al., 2009).

2. SCOPO

Gli AZAs sono una famiglia di tossine marine polieteree, che comprende più di 30 analoghi. Sono prodotte da dinoflagellati, tra cui alcune specie di *Azadinium* ed *Amphidoma*, tuttavia alcuni analoghi sono originati da processi di biotrasformazione nei molluschi. Queste biotossine si accumulano nei prodotti ittici, soprattutto nei mitili, rappresentando un potenziale pericolo per la salute umana. Nell'uomo, l'ingestione di molluschi contaminati può provocare un'intossicazione alimentare nota come AZP, caratterizzata da nausea, vomito, diarrea e crampi allo stomaco.

Se inizialmente la presenza degli AZAs sembrava riguardare solo le acque ed i molluschi dei mari irlandesi, negli ultimi anni questi composti sono stati rilevati anche in Olanda, Norvegia, Gran Bretagna, Italia, Francia, Spagna, Danimarca, nonché in Asia, Africa ed America; sono pertanto un problema diffuso a livello mondiale.

Attualmente, solo AZA1, AZA2 ed AZA3 sono regolamentati dall'UE come contaminanti alimentari, con un livello massimo ammissibile di 160 µg equivalenti di AZA1/kg di parti edibili di molluschi. Dai pochi studi di tossicità nel topo, a seguito di somministrazione i.p., è stata definita la potenza tossica dei tre analoghi (AZA2>AZA3>AZA1) ed, in base ad essa, sono stati ricavati i relativi fattori di equivalenza tossica (*Toxic Equivalency Factors*, TEFs), pari a 1.0, 1.8 e 1.4 per AZA1, AZA2 ed AZA3, rispettivamente. Questi valori sono attualmente utilizzati per quantificare gli equivalenti di AZA1 nella polpa dei molluschi. Tuttavia, poiché l'esposizione a queste tossine avviene per ingestione, i TEFs andrebbero calcolati attraverso studi comparativi di tossicità per via orale.

Pertanto, il principale scopo di questa tesi è quello condurre degli studi di tossicità acuta nel topo per os di AZA1, AZA2 ed AZA3 al fine ultimo di definirne i TEFs in seguito ad esposizione orale. Nonostante i sintomi da AZP siano perlopiù gastrointestinali, studi di tossicità orale ed intraperitoneale suggeriscono che il fegato possa essere uno dei possibili organi bersaglio di tali tossine.

Considerando che il meccanismo d'azione degli AZAs non è ancora noto, lo scopo della seconda parte di questa tesi è quello di caratterizzare *in vitro* gli effetti a livello epatico degli AZAs, al fine ultimo di fornire le basi molecolari per ipotizzare un possibile meccanismo d'azione. A tale scopo verranno utilizzate due linee cellulari epatiche umane, la linea non tumorale IHH e la linea tumorale HepG2.

3. MATERIALI E METODI

3.1. STUDI DI TOSSICITA' IN VIVO

3.1.1. Tossine ed altri reagenti

AZA1, 2 e 3 sono stati gentilmente forniti dalla Dott.ssa Jane Kilcoyne (Marine Institute, Rinville, Irlanda) ed isolati da *Mytilus edulis*, come precedentemente riportato (Kilcoyne et al. 2012). La loro purezza (>95%) è stata confermata tramite LC-MS/MS e NMR. Tutti i solventi sono stati acquistati da Labscan (Dublino, Irlanda). Gli altri reagenti chimici sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia e Steinheim, Germania).

3.1.2. Animali

I topi femmina CD-1 (18-20 g, 4 settimane d'età) sono stati acquistati dalla Harlan Laboratories (San Pietro al Natisone, Udine, Italia). Sono stati stabulati in gabbie delle dimensioni di 26.7 x 20.7 x 14.0 cm, contenenti una lettiera di segatura d'abete depolverizzata, ed acclimatati per 2 settimane prima degli esperimenti, in condizioni di temperatura ($21\pm 1^\circ$ C) ed umidità (60-70%) controllate, con un ciclo fisso di luce artificiale (07:00-19:00). L'alimentazione degli animali era costituita da mangime pellettato per roditori (diametro: 14 mm), fornito dalla Harlan Laboratories, la cui composizione, dichiarata dalla ditta produttrice, è la seguente: proteine (18.5%), grassi (5.5%), fibre (4.5%), ceneri (6.0%), componenti non azotati (53.5%), acqua (12.0%). Gli animali sono stati privati del cibo 3 ore prima della somministrazione degli AZAs. Cibo ed acqua *ad libitum* sono stati forniti dopo 3 ore dal trattamento per il resto del periodo di studio.

Gli esperimenti che hanno visto l'impiego di animali da laboratorio sono stati condotti presso l'Università di Trieste secondo il decreto legge italiano n. 116/1992, la Direttiva UE 2010/63/UE e la Convenzione europea ETS 123.

3.1.3. Studio di tossicità orale acuta nel topo

Gli AZAs, disciolti in tampone fosfato salino (*Phosphate-buffered saline*, PBS) pH 7.0 contenente l'1.8% di etanolo, sono stati somministrati mediante sonda gastrica (*gavage*) (10 ml/kg) a gruppi di 8 o 16 topi, a digiuno da 3 ore, ad un *range* di dosi di 135-1100 µg/kg (AZA1) o 300-1100 µg/kg (AZA2 ed AZA3). Ai topi di controllo è stato somministrato il solo veicolo (10 ml/kg).

I segni e sintomi di tossicità e letalità sono stati osservati ed annotati per 24 ore (in 5 o 10 topi/dose) e fino a 14 giorni (nei topi sopravvissuti, fino a 3 o 6/dose).

Dopo 24 ore, sottogruppi di 5 topi per dose sono stati pesati e anestetizzati, mediante somministrazione i.p. di tiletamina/zolazepam (Zoletil[®], Milano, Italia; 20 mg/kg) e xilazina (Virbac, Milano, Italia; 5 mg/kg).

Campioni di sangue sono stati raccolti dall'aorta addominale per le analisi ematochimiche. Quindi gli animali sono stati dissanguati ed i principali organi rimossi e fissati in formalina al 10%, in tampone neutro, per l'analisi istologica. Allo stesso modo, gli animali morti durante il periodo di osservazione di 24 ore, sono stati immediatamente pesati e sottoposti a necropsia; i principali organi e tessuti sono stati rimossi e fissati per la valutazione istologica ed il sangue raccolto per l'analisi ematochimica.

Sottogruppi di topi sopravvissuti (fino a 3 per dose) sono stati sacrificati, invece, dopo 14 giorni dal trattamento con le tossine. Dopo l'esame necroscopico, anche in questo caso i principali organi e tessuti sono stati rimossi e fissati per la valutazione istologica ed il sangue raccolto per le analisi ematochimiche.

3.1.4. Analisi ematochimiche

Il sangue è stato lasciato coagulare per 15 minuti a temperatura ambiente, quindi centrifugato a 2.000g per 10 minuti a 4° C. Il siero è stato conservato a -80° C fino all'effettuazione dell'analisi. Usando un analizzatore automatico (AU400 Olympus, con reagenti Beckman Coulter, Milano, Italia), sono stati determinati i seguenti parametri ematochimici: aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT), glutammato deidrogenasi (GLDH), creatina (CPK), creatinina, ioni Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ e fosfato inorganico (P_i).

3.1.5. Analisi istologiche

I principali organi e tessuti, fissati in formalina al 10% in tampone neutro, sono stati disidratati, inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di 5 micron. Le sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina, quindi, è stato effettuato l'esame istopatologico cieco.

3.1.6. Quantificazione degli AZAs nei principali organi/tessuti

A 24 ore dal trattamento (o al momento della morte), sottogruppi di 5 topi per dosaggio sono stati pesati e sacrificati come sopra riportato. I principali organi e tessuti (cuore, polmoni, fegato, stomaco, intestino tenue, intestino crasso, reni e cervello) ed il contenuto intestinale sono stati raccolti e conservati a -80° C, per quantificare l'accumulo delle tre tossine.

Similmente, sottogruppi di topi sopravvissuti (fino a 3 per dose) sono stati sacrificati dopo 14 giorni di recupero. Nuovamente, sono stati raccolti i suddetti organi/tessuti ed il contenuto intestinale e conservati a -80° C fino al momento dell'analisi.

Gli organi raccolti (~0,2 g) sono stati estratti con metanolo (1 ml), premendoli con un'asticella d'acciaio, quindi miscelati in vortex per 1 minuto. I campioni sono stati, poi, centrifugati a 3000g per 5 minuti e l'estratto lasciato decantare. Il *pellet* rimanente è stato estratto una seconda volta come descritto sopra. I due estratti sono poi stati riuniti e filtrati, tramite una pipetta di vetro con un filtro di cotone all'estremità, in provette da HPLC per l'analisi tramite LC-MS/MS.

3.1.7. Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm E.S. (Errore Standard). Le differenze significative tra i controlli e i trattati sono state calcolate tramite analisi della varianza (p) ad una via, seguita da test di Dunnett per confronti multipli di dati non appaiati, considerando significativa una $p < 0.05$. La DL_{50} (dose letale nel 50% dei topi trattati), basata sui dati di mortalità raccolti nelle 24 ore, è stata calcolata secondo il metodo Finney (1971), con un intervallo di confidenza (IC) del 95%.

3.2. STUDI DI TOSSICITA' IN VITRO

3.2.1. Linee cellulari stabilizzate

3.2.1.1. Linea cellulare IHH

La linea cellulare IHH (*Immortalized Human Hepatocytes*) è una linea immortalizzata ottenuta mediante una transfezione stabile col plasmide ricombinante SV40 di cellule epatiche sane, rimosse chirurgicamente da un paziente maschio con cancro al colon (Schippers et al., 1997). Queste cellule crescono in adesione, a 37°C in un'atmosfera con il 5% di CO₂, in terreno di coltura (TC) costituito da DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) High Glucose 4500 mg/l (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) addizionato di: 10% siero bovino fetale (FBS) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), 1,25% L-glutammina 200 mM (EuroClone, Milano, Italia), 1% penicillina 10000 UI/ml e streptomicina 10000 µg/ml (EuroClone, Milano, Italia), 1,5% Herpes buffer 1 M (EuroClone, Milano, Italia), 0,01% insulina umana (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e 0,04% di desametasone 1 mg/ml (dex) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Ogni settimana viene eseguito il passaggio cellulare in seguito al raggiungimento di una confluenza del 90-95%.

3.2.1.2. Linea cellulare HepG2

La linea cellulare HepG2 (*Hepatocellular carcinoma human cell line*) è costituita da cellule tumorali immortalizzate e stabilizzate ottenute dal fegato di un ragazzo di 15 anni con un carcinoma epatico ben differenziato. Queste cellule crescono in adesione, a 37°C, in un'atmosfera con il 5% di CO₂, in TC costituito da EMEM (*Minimum Essential Medium Eagle*) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) addizionato di: 10% siero bovino fetale (FBS) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), 1% L-glutammina 200 mM (EuroClone, Milano, Italia), 1% penicillina 10000 UI/ml e streptomicina 10000 µg/ml (EuroClone, Milano, Italia), 1% Na-piruvato 100 mM (EuroClone, Milano, Italia). Anche per queste cellule il passaggio cellulare è effettuato una volta alla settimana, al raggiungimento di una confluenza del 90-95%.

3.2.2. Trattamento con le tossine

AZA1, 2 e 3, con una purezza >95% confermata all'LC-MS/MS ed alla NMR, sono stati gentilmente forniti dalla dott.sa Jane Kilcoyne del Marine Institute di Rinvile (Irlanda).

Le soluzioni madri di 132 μM (AZA1), 101 μM (AZA2) e 130 μM (AZA3) sono state conservate a -20°C in metanolo acquoso al 50%.

Le soluzioni di lavoro con le quali sono trattate le cellule sono state diluite in TC (se non altrimenti descritto) ed allestite il giorno dell'esperimento.

3.2.3. Test di riduzione dell'MTT

Il test di riduzione dell'MTT è un saggio colorimetrico quantitativo basato sulla misurazione dell'attività mitocondriale. Il test, infatti, sfrutta la capacità delle deidrogenasi mitocondriali di ridurre l'MTT, di colore giallo, a formazano, di colore viola intenso (Fig. 6). Quest'ultimo è insolubile nell'ambiente intracellulare e non riesce ad attraversare la membrana, precipitando sotto forma di cristalli colorati che si accumulano nelle cellule metabolicamente attive. Può, quindi, essere quantificato per via spettrofotometrica.

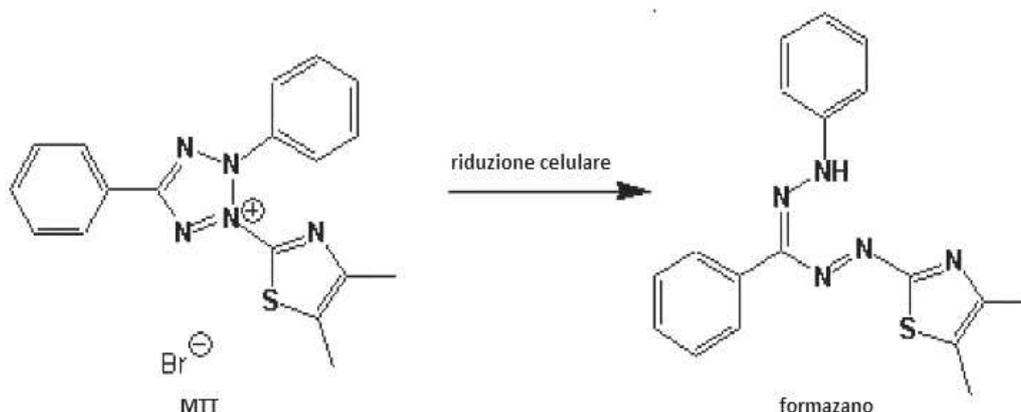


Figura 6. Reazione di riduzione dell'MTT

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti, ad una concentrazione di 5×10^3 cellule per pozzetto in un volume di 200 μl di TC. Quindi sono state esposte a concentrazioni scalari di AZA1, 2 e 3 (1.0×10^{-7} - 5.08×10^{-12} M) per 24, 48 e 72 ore. Terminato il trattamento, il mezzo è stato sostituito con TC fresco e le cellule sono state esposte per 4 ore a 37°C ad una soluzione sterile di MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, SigmaAldrich, Milano, Italia) 5

mg/ml in PBS (20 µl/pozzetto). La piastra è stata svuotata dal mezzo ed i cristalli di formazano sono stati solubilizzati con 200 µl per pozzetto di dimetilsolfossido (DMSO, Sigma Aldrich, Milano, Italia). L'assorbanza è stata quindi letta allo spettrofotometro (Microplate autoreader, Bio-tek instruments, CELBIO, Milano, Italia) alla doppia lunghezza d'onda di 540/630 nm.

I risultati sono presentati come media percentuale di attività mitocondriale rispetto ai controlli negativi (cellule non trattate) e sono la media di almeno 3 esperimenti indipendenti \pm E.S. effettuati in triplicato.

3.2.4. Test della sulforodamina B

Il test della sulforodamina B (SRB) è un saggio colorimetrico quantitativo in grado di valutare la proliferazione cellulare. Infatti, la SRB (Fig. 7) è un aminoxantene di colore rosa brillante, che ha la capacità di legarsi ai componenti proteici delle cellule. Pertanto, la quantità di SRB fissata alle cellule vive, misurata per via spettrofotometrica, è proporzionale alla quantità di cellule presenti nel campione ed è un indice indiretto dell'entità della proliferazione cellulare (Skehan et al., 1990).

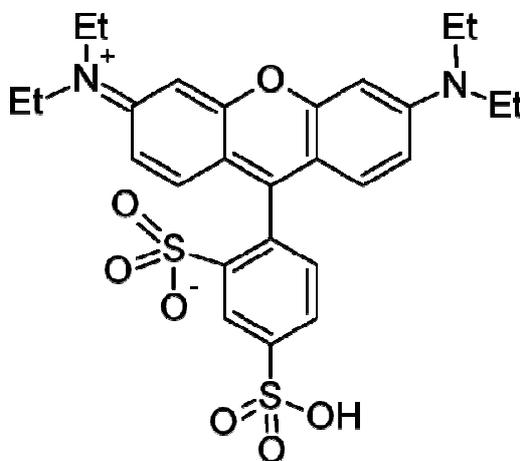


Figura 7. Struttura della SRB

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti, ad una concentrazione di 5×10^3 cellule per pozzetto in 200 µl di TC. Quindi, sono state trattate con concentrazioni scalari di AZA1, 2 e 3 per 24, 48 e 72 ore. Successivamente, sono state fissate con acido tricloroacetico (TCA) al 50% (50 µl/pozzetto, 1 ora, 4°C). Sono stati quindi effettuati due lavaggi con acqua bidistillata (100 µl/pozzetto) per rimuovere i residui di TCA ed è stata aggiunta una soluzione di SRB 0,4% in acido acetico 1% (100 µl/pozzetto) per 30 minuti a temperatura ambiente. Sono seguiti altri 3 lavaggi con acido acetico 1% (100 µl/pozzetto). Quindi, la SRB legata è stata solubilizzata con 200 µl per

pozzetto di una soluzione 10^{-2} M di *tris*-idrossimetil-aminometano (TRIS). L'assorbanza è stata poi letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570 nm.

I risultati sono presentati come media percentuale di proliferazione cellulare rispetto ai controlli negativi (cellule non trattate) e sono la media di almeno 3 esperimenti indipendenti \pm E.S. effettuati in triplicato.

3.2.5. Inibizione della catena di trasporto degli elettroni

3.2.5.1. Inibizione con rotenone

Il rotenone (Fig. 8) è un insetticida ed acaricida naturale, a largo spettro d'azione, costituisce il più potente rappresentante dei rotenoidi, una famiglia di isoflavonoidi estratti dalle piante *Leguminose* ed è un inibitore della NADH-deidrogenasi, ossia il complesso I della catena di trasporto mitocondriale. Pertanto, al fine di valutare se l'azione degli AZAs interferisse con la normale attività del complesso I, si è valutata la capacità di questo composto di ridurre gli effetti degli AZAs dopo 24 ore di trattamento.

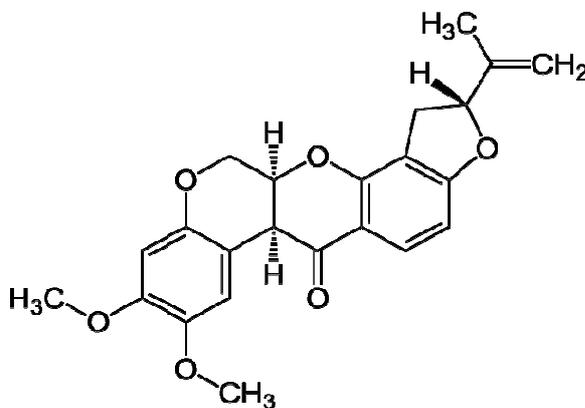


Figura 8. Struttura molecolare del rotenone

Le cellule sono state seminate in piastra da 96 pozzetti ad una concentrazione di 5×10^3 cellule/pozzetto in 200 μ l di terreno. Sono state pretrattate per un'ora con 20 μ l di una soluzione 10x di rotenone (concentrazione finale in pozzetto: 5 μ M) e successivamente esposte per 24 ore agli AZAs. Gli effetti sono stati valutati tramite test dell'MTT.

Le cellule (5×10^3 /pozzetto) sono state seminate in piastra da 96 pozzetti in 200 μ l di terreno. Sono state pretrattate per un'ora con 20 μ l di una soluzione 10x di antimicina-A (concentrazione finale in pozzetto: 20 μ M), quindi esposte agli AZAs per 24 ore. Gli effetti sono stati osservati tramite test dell'MTT.

3.2.5.4. Inibizione con sodio azide

L'azoturo di sodio o sodio azide (NaN_3) (Fig. 11) è il sale di sodio dell'acido azotidrico ed un inibitore della citocromo c ossidasi, complesso IV della catena di trasporto mitocondriale.

Al fine di verificare se l'azione degli AZAs interferisse con la funzionalità del complesso IV, si è valutato se la NaN_3 fosse in grado di ridurre gli effetti degli AZAs, dopo un'esposizione delle cellule a queste tossine per 24 ore.

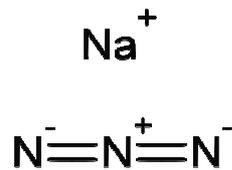


Figura 11. Struttura molecolare del sodio azide

L'analisi è stata eseguita in piastra da 96 pozzetti, seminando 5×10^3 cellule per pozzetto in 200 μ l di terreno. Si sono pretrattate le cellule per un'ora con 20 μ l di una soluzione 10x di NaN_3 (concentrazione finale in pozzetto: 150 μ M). Quindi si sono esposte le cellule a concentrazioni scalari dei tre AZAs per 24 ore. Se ne sono poi valutati gli effetti tramite test dell'MTT.

3.2.5.5. Inibizione con oligomicina A

L'oligomicina A (Fig. 12) è un antibiotico macrolide prodotto da varie specie di *Streptomyces* ed è un inibitore dell'ATP-sintasi, pompa protonica di tipo F, che trasporta i protoni prodotti nel trasporto degli elettroni attraverso la membrana mitocondriale secondo il gradiente protonico instauratosi, producendo così ATP.

Al fine di verificare se l'azione degli AZAs interferisse con la normale attività dell'ATP-sintasi, si è andati a valutare se l'oligomicina A fosse in grado di ridurre gli effetti degli AZAs in seguito a 24 ore di trattamento.

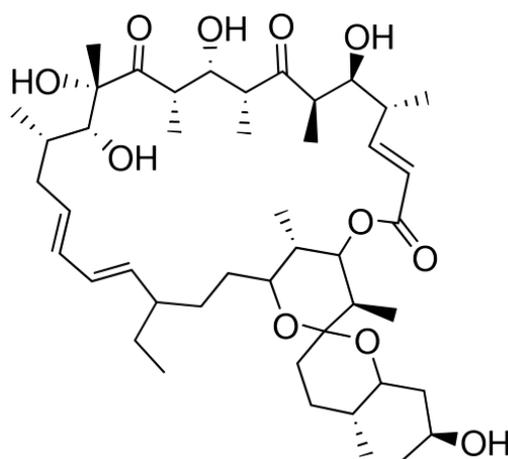


Figura.12. Struttura molecolare dell'oligomicina A

Il test è stato eseguito seminando le cellule (5×10^3 /pozzetto) in 200 μ l di terreno in una piastra da 96 pozzetti. Prima dell'esposizione agli AZAs, le cellule sono state pretrattate per un'ora con 20 μ l di una soluzione 10x di oligomicina A (concentrazione finale in pozzetto: 1 μ M). Le cellule sono state trattate con concentrazioni scalari di AZA1, 2 e 3 per 24 ore, quindi se ne sono valutati gli effetti con test dell'MTT.

3.2.6. Valutazione del ruolo dello squilibrio protonico

La nigericina (Fig.13), antibiotico carbossilico polietere prodotto da *Streptomyces hygroscopicus*, è uno ionoforo in grado di controbilanciare gli squilibri protonici mediante gli ioni K^+ con un meccanismo di tipo antiporto.

Al fine di verificare se l'azione degli AZAs dipendesse da un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale per gli ioni H^+ , è stata valutata la capacità della nigericina di ridurre gli effetti degli AZAs in seguito a 24 ore di trattamento.

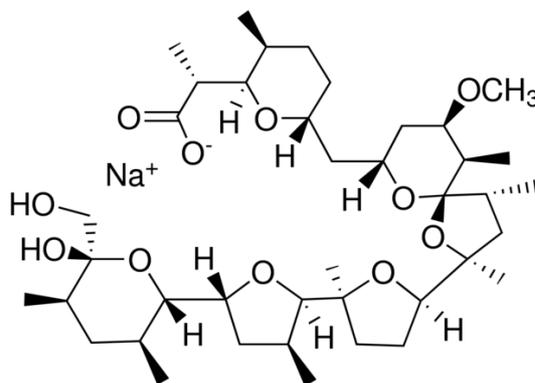


Figura 13. Struttura molecolare della nigericina.

Le cellule sono state seminate in piastra da 96 pozzetti con una concentrazione di 5×10^3 cellule per pozzetto in 200 μ l di terreno. Sono state pretrattate per un'ora con 20 μ l di una soluzione 10x di nigericina (concentrazione finale in pozzetto: 5 μ M), quindi esposte a concentrazioni scalari degli AZAs per 24 ore. Gli effetti sono stati poi valutati con il test dell'MTT.

3.2.7. Terreni *ion-free* per cellule IHH

Per valutare il possibile ruolo di alcuni ioni (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) presenti nel mezzo extracellulare sugli effetti citotossici AZA-mediati, sono stati allestiti dei terreni privi di tali ioni ed un terreno di controllo.

3.2.7.1. Terreno di controllo

La formulazione del terreno di controllo è la seguente:

- 140 mM NaCl (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 4.4 mM KCl (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 2.5 mM CaCl_2 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.2 mM MgSO_4 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.2 mM KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 10 mM HEPES (Boehringer Mannheim GmbH, Milano, Italia);
- 4500 mg/l D-glucosio (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.25 % L-glutamina 200 mM (EuroClone, Milano, Italia);
- 1% penicillina 10000 UI/ml e streptomina 10000 μ g/ml (EuroClone, Milano, Italia);
- 10 nM insulina umana (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);

Da portarsi a volume con acqua bidistillata ed a pH 7.4.

Al momento dell'utilizzo, va aggiunto lo 0.04% di dex 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La soluzione va, quindi, sterilizzata per filtrazione e conservata a 4°C.

3.2.7.2. *Terreno Na⁺-free*

Il terreno Na⁺-free è costituito da:

- 4.4 mM KCl (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 2.5 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.2 mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.2 mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 140 mM N-metil-D-glucamina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 10 mM HEPES (Boehringer Mannheim GmbH, Milano, Italia);
- 4500 mg/l D-glucosio (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.25 % L-glutammina 200 mM (EuroClone, Milano, Italia);
- 1% penicillina 10000 UI/ml e streptomina 10000 µg/ml (EuroClone, Milano, Italia);
- 10 nM insulina umana (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);

Da portarsi a volume con acqua bidistillata ed a pH 7.4.

Al momento dell'utilizzo, va aggiunto lo 0.04% di dex 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La soluzione va, quindi, sterilizzata per filtrazione e conservata a 4°C.

3.2.7.3. *Terreno Ca²⁺-free*

Il terreno Ca²⁺-free è costituito da:

- 140 mM NaCl (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 4.4 mM KCl (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.2 mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.2 mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 10 mM HEPES (Boehringer Mannheim GmbH, Milano, Italia);
- 4500 mg/l D-glucosio (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.25 % L-glutammina 200 mM (EuroClone, Milano, Italia);
- 1% penicillina 10000 UI/ml e streptomina 10000 µg/ml (EuroClone, Milano, Italia);
- 10 nM insulina umana (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);

Da portarsi a volume con acqua bidistillata ed a pH 7.4.

Al momento dell'utilizzo, va aggiunto lo 0.04% di dex 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La soluzione va, quindi, sterilizzata per filtrazione e conservata a 4°C.

3.2.7.4. *Terreno K⁺-free*

Il terreno K⁺-free è costituito da:

- 140 mM NaCl (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 2.5 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.2 mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.2 mM NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 10 mM HEPES (Boehringer Mannheim GmbH, Milano, Italia);
- 4500 mg/l D-glucosio (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.25 % L-glutammina 200 mM (EuroClone, Milano, Italia);
- 1% penicillina 10000 UI/ml e streptomina 10000 µg/ml (EuroClone, Milano, Italia);
- 10 nM insulina umana (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);

Da portarsi a volume con acqua bidistillata ed a pH 7.4.

Al momento dell'utilizzo, va aggiunto lo 0.04% di dex 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La soluzione va, quindi, sterilizzata per filtrazione e conservata a 4°C.

3.2.7.5. *Terreno Cl⁻-free*

Il terreno Cl⁻-free è costituito da:

- 1.2 mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.2 mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 140 mM NaNO₃ (Roth, Milano, Italia);
- 2.5 mM Ca(NO₃)₂ (Roth, Milano, Italia);
- 10 mM HEPES (Boehringer Mannheim GmbH, Milano, Italia);
- 4500 mg/l D-glucosio (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);
- 1.25 % L-glutammina 200 mM (EuroClone, Milano, Italia);
- 1% penicillina 10000 UI/ml e streptomina 10000 µg/ml (EuroClone, Milano, Italia);
- 10 nM insulina umana (Sigma-Aldrich, Milano, Italia);

Da portarsi a volume con acqua bidistillata ed a pH 7.4.

Al momento dell'utilizzo, va aggiunto lo 0.04% di dex 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La soluzione va, quindi, sterilizzata per filtrazione e conservata a 4°C.

Negli studi atti a valutare il ruolo dei suddetti ioni sulla modulazione dell'effetto mitocondriale degli AZAs, le cellule IHH sono state seminate in piastra da 96 pozzetti come precedentemente descritto, ma il comune TC (200 μ l/pozzetto) è stato sostituito dallo specifico terreno *ion-free*. In seguito, le cellule sono state esposte a concentrazioni scalari dei tre AZAs (1.0×10^{-7} - 5.08×10^{-12} M) per 24 ore e gli effetti sono stati valutati mediante test dell'MTT. Le curve ottenute in presenza dei terreni *ion-free* sono state poi confrontate con quella ottenuta in presenza del terreno di controllo.

3.2.8. Valutazione del ruolo di specifici trasportatori per lo ione K^+

Al fine di valutare il ruolo di specifici trasportatori per lo ione K^+ nel modulare gli effetti degli AZAs, si sono preincubate le cellule IHH con diversi inibitori od attivatori di tali trasportatori e successivamente le si è esposte a diverse concentrazioni degli AZAs per 24 e 72 ore. I trasportatori presi in considerazione sono: i canali voltaggio-dipendenti per il K^+ sensibili all'ATP (K_{ATP}), i canali *ether-a-go-go related gene* (hERG) e la pompa Na^+/K^+ ATPasi (NaKA), presenti sulla membrana delle cellule epatiche.

3.2.8.1. Modulazione dei canali K_{ATP}

Il coinvolgimento dei canali K_{ATP} nell'attività degli AZAs è stato valutando sia mediante un inibitore che un attivatore di questi canali. In particolare, come inibitore è stata usata la glibenclamide (Fig. 14), una solfonilurea di seconda generazione, usata come farmaco ipoglicemizzante, mentre come attivatore il minoxidil (Fig.15), un farmaco vasodilatatore, che attiva i canali K_{ATP} .

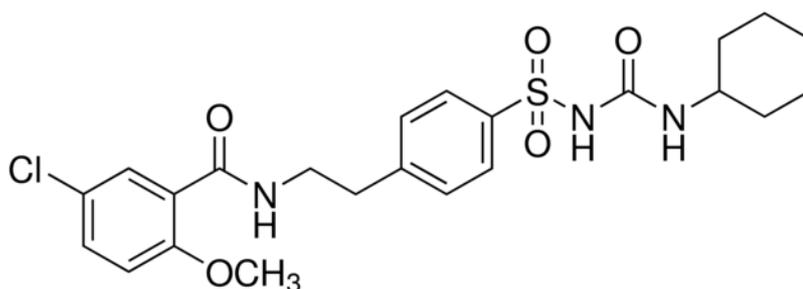


Figura 14. Struttura molecolare della glibenclamide

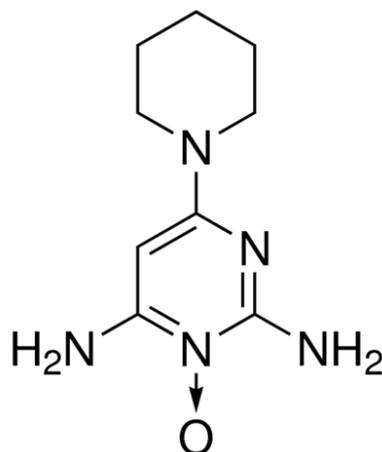


Figura 15. Struttura molecolare del minoxidil

Il test è stato eseguito seminando le cellule (5×10^3 /pozzetto) in 200 μ l di terreno in una piastra da 96 pozzetti. Prima dell'esposizione agli AZAs, le cellule sono state pretrattate per un'ora con 20 μ l di una soluzione 10x di glibenclamide (concentrazione finale in pozzetto: 100 μ M) o con 20 μ l di una soluzione 10x di minoxidil (concentrazione finale in pozzetto: 100 μ M). Le cellule sono state trattate con concentrazioni scalari di AZA1, 2 e 3 per 24 e 72 ore, quindi se ne sono valutati gli effetti con test dell'MTT.

3.2.8.2. Modulazione dei canali hERG

Anche il ruolo dei canali hERG nel modulare l'attività degli AZAs è stato indagato sia mediante l'utilizzo di un inibitore che di un attivatore. Quale inibitore è stata utilizzata la cisapride (Fig.16), farmaco agonista serotoninergico, mentre come attivatore è stata impiegata la 1,3-bis-(2-idrossi-5-trifluorometil-fenil)-urea (NS-1643, Fig. 17), un farmaco della famiglia delle difeniluree.

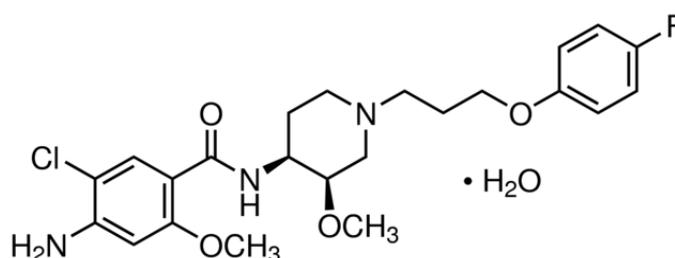


Figura 16. Struttura molecolare del cisapride.

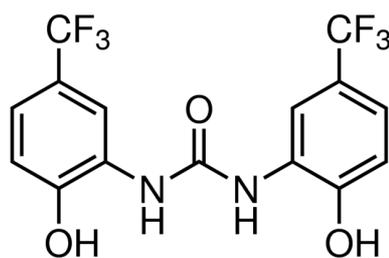


Figura 17. Struttura molecolare dell' NS-1643

Anche in questo caso l'esperimento è stato eseguito seminando le cellule (5×10^3 /pozzetto) in 200 μ l di terreno in una piastra da 96 pozzetti. Le cellule sono state pretrattate per un'ora con 20 μ l di una soluzione 10x di cisapride (concentrazione finale in pozzetto: 5 μ M) o con 20 μ l di una soluzione 10x di NS-1643 (concentrazione finale in pozzetto: 30 μ M), prima di essere trattate con concentrazioni scalari di AZA1, 2 e 3 per 24 e 72 ore. Gli effetti sono stati nuovamente valutati tramite test dell'MTT.

3.2.8.3. Modulazione della NaKA

La NaKA è proteina integrale di membrana, fondamentale per il mantenimento delle concentrazioni citoplasmatiche degli ioni Na^+ e K^+ . Il suo ruolo nel modulare l'attività degli AZAs è stato valutando impiegando un suo noto inibitore, la ouabaina (Fig. 18). Si tratta di un glicoside cardioattivo, usato contro aritmie e fibrillazione cardiache, di cui da tempo si conosce la capacità di occupare un sito extracellulare della pompa, bloccandola.

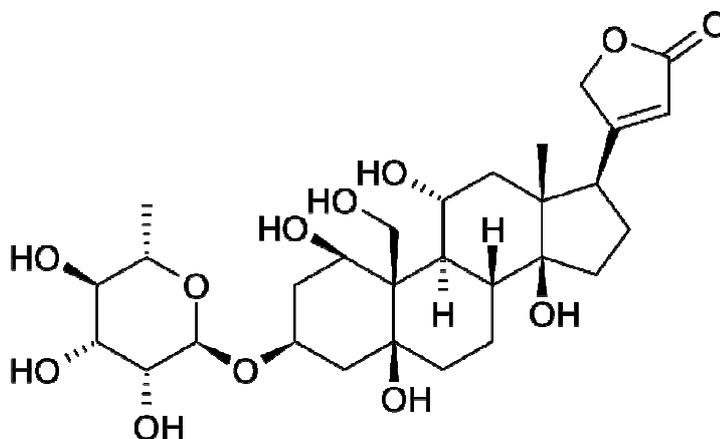


Figura 18. Struttura molecolare della ouabaiana

Le cellule sono state seminate (5×10^3 /pozzetto) in piastra da 96 pozzetti in 200 μ l di terreno, quindi pretrattate per un'ora con 20 μ l di una soluzione 10x di ouabaina (concentrazione finale in pozzetto: 10 μ M) ed, in seguito, esposte a concentrazioni scalari di AZA1, 2 e 3 per 24 e 72 ore. Come negli altri esperimenti, gli effetti sono stati valutati tramite test dell'MTT.

3.2.9. Analisi statistica

Se non diversamente specificato, i risultati sono presentati come media percentuale \pm E.S. di almeno 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. I dati sono stati analizzati mediante ANOVA a due vie e Bonferroni post-test (Prism GraphPad Inc., San Diego, California) e differenze significative sono state considerate per $p < 0.05$. I valori di EC_{50} sono stati calcolati mediante regressione non lineare a quattro parametri (Prism GraphPad Inc., San Diego, California).

4. RISULTATI

4.1. STUDI DI TOSSICITA' *IN VIVO*

4.1.1. Letalità

Entro 24 ore della somministrazione acuta per via orale di AZA1 (135-1100 µg/kg), AZA2 (300-1100 µg/kg) o AZA3 (300-1100 µg/kg), effetti letali sono stati rilevati a partire dalle dosi di 230 µg/kg (AZA1, 2/16 topi), 500 µg/kg (AZA2, 3/16 topi) e 650 µg/kg (AZA3, 1/16 topi). Trascorse 24 ore, nei sottogruppi di animali sopravvissuti e tenuti in osservazione fino a 14 giorni, effetti letali si sono manifestati solo entro 30 ore a seguito della somministrazione di AZA1, alle dosi di 300, 390, 650 and 850 µg/kg (2 animali per ciascuna dose) (Tab. 2).

Dai dati di letalità entro 24 ore, sono stati calcolati i valori di DL₅₀ (dose letale per il 50 % degli animali trattati) per le tre tossine, pari a 443 µg/kg (intervallo di confidenza al 95%, 95% IC: 350-561 µg/kg), 626 µg/kg (95% IC: 430-911 µg/kg) e 875 µg/kg (95% IC: 757-1010 µg/kg), per AZA1, 2 e 3 rispettivamente (Tab. 3). La letalità di questi composti dopo somministrazione orale nel topo è pertanto risultata essere AZA1>AZA2>AZA3 e, sulla base dei valori di DL₅₀, sono stati calcolati i TEFs (fattori di equivalenza tossica), pari a 1.0 (AZA1), 0.7 (AZA2) e 0.5 (AZA3).

Tabella 2. Letalità e tempi di sopravvivenza dei topi dopo somministrazione orale degli AZAs.

Tossina	Dose (µg/kg)	Letalità entro 24 h	Letalità entro 30 h	Totale	Tempo di sopravvivenza (h:min)
AZA1	135	0/16	0/16	0/16	--
	175	0/16	0/16	0/16	--
	230	2/16	0/16	2/16	23:42 – 23:49
	300	4/16	2/16	6/16	da 11:55 a 24:44
	390	11/16	2/16	13/16	d 12:08 a 29:12
	500	12/16	0/16	12/16	da 08:30 a 22:54
	650	5/8	2/8	7/8	da 08:22 a 24:23
	850	5/8	2/8	7/8	da 00:23 a 26:31
	1100	8/8	0/8	8/8	da 00:56 a 09:01
AZA2	300	0/16	0/16	0/16	--
	390	0/16	0/16	0/16	--
	500	3/16	0/16	3/16	da 09:47 a 21:50
	650	13/16	13/16	13/16	da 13:20 a 23:07
	850	11/16	11/16	11/16	da 07:45 a 23:11
	1100	16/16	16/16	16/16	da 01:38 a 23:42
AZA3	300	0/16	0/16	0/16	--
	390	0/16	0/16	0/16	--
	500	0/16	0/16	0/16	--
	650	1/16	0/16	1/16	01:37
	850	11/16	0/16	11/16	da 00:54 a 23:40
	1100	12/16	0/16	12/16	da 00:28 a 19:06

Tabella 3. DL₅₀ e TEFs entro 24 h dalla somministrazione orale di AZA1, 2 e 3 nel topo.

Tossina	DL ₅₀ (µg/kg)	TEFs
AZA1	443	1.0
AZA2	626	0.7
AZA3	875	0.5

4.1.2. Segni e sintomi di tossicità

Nei topi trattati con ciascuna delle tossine, prima della morte, si sono osservati: immobilità, tremori, respiro addominale, ipotermia e cianosi. Alla dose maggiore di AZA1 (1100 µg/kg) e a dosi maggiori di 850 µg/kg di AZA3 è stato osservato anche *jumping*, mentre nessun topo ha sviluppato diarrea, tipica nelle intossicazioni umane.

I topi sopravvissuti al trattamento ed osservati per 14 giorni non hanno invece manifestato sintomi o segni di tossicità. Anche il consumo giornaliero di cibo ed il peso corporeo erano analoghi a quelli degli animali di controllo.

4.1.3. Esame necroscopico

L'analisi autoptica ha rivelato alterazioni macroscopiche solo nei topi morti spontaneamente o in quelli sacrificati a 24 ore dalla somministrazione delle tossine. In particolare, il fegato è risultato rigonfio e pallido nei topi morti dopo almeno 5 ore dal trattamento o in quelli sacrificati a 24 ore, a partire dalle dosi di 175 µg/kg di AZA1, 500 µg/kg di AZA2 e 600 µg/kg di AZA3 (Fig. 19). Inoltre, è stato registrato un significativo aumento del peso del fegato: a seguito della somministrazione di AZA1, si è registrato un aumento del peso dell'organo compreso tra 29 % (135 µg/kg) e 70 % (300 µg/kg), mentre nei topi trattati con AZA2 o AZA3 il peso del fegato era aumentato del 22-58 % (AZA2, 300-650 µg/kg) e del 17-61 % (AZA3, 390-650 µg/kg) (Tab. 4).

Alle dosi letali di ciascuna tossina, lo stomaco si presentava rigonfio, con presenza di gas, liquido e contenuto gastrico solido, talvolta associati ad arrossamento della parete gastrica. A livello del tratto intestinale, è stata inoltre evidenziata dilatazione dell'intestino tenue, associata ad arrossamento della parete intestinale e presenza di un materiale fluido sanguinolento nel lume (Fig. 19).

Nei topi sopravvissuti al trattamento e sacrificati dopo 14 giorni, l'autopsia non ha evidenziato alterazioni macroscopiche.

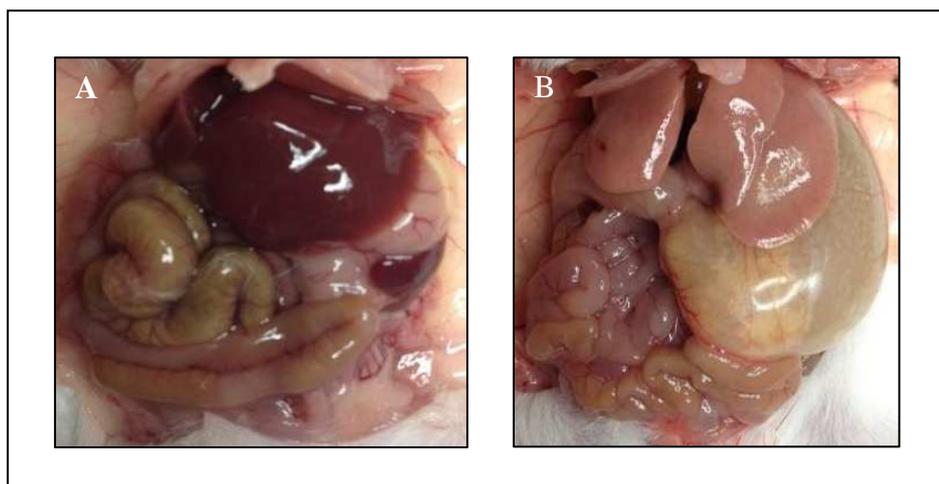


Figura 19. Fegato e tratto gastrointestinale di un topo di controllo (A) e di un topo trattato con AZA1 (230 µg/kg) (B).

Tabella 4. Peso del fegato a 24 ore dalla somministrazione orale degli AZAs nel topo.

Dose (µg/kg)	AZA1		AZA2		AZA3	
	N° topi	Peso fegato (g) Media ± E.S.	N° topi	Peso fegato (g) Media ± E.S.	N° topi	Peso fegato (g) Media ± E.S.
0	10	0.8639 ± 0.0470	10	0.8721 ± 0.0423	10	0.8824 ± 0.0335
135	10	1.1126 ± 0.0450* (29 %)	--	--	--	--
175	10	1.1416 ± 0.0483* (32 %)	--	--	--	--
230	10	1.2286 ± 0.0807* (42 %)	--	--	--	--
300	10	1.4716 ± 0.0559* (70 %)	10	1.0648 ± 0.0613* (22 %)	10	0.9118 ± 0.0848 (3 %)
390	11	1.3031 ± 0.0387* (51 %)	10	1.0823 ± 0.0411* (24 %)	10	1.0312 ± 0.0738* (17 %)
500	12	1.3423 ± 0.0568* (55 %)	10	1.3035 ± 0.0457* (49 %)	10	1.1457 ± 0.0592* (30 %)
650	5	1.3574 ± 0.0948* (57 %)	13	1.3791 ± 0.0569* (58 %)	10	1.4175 ± 0.0672* (61 %)
850	5	1.3612 ± 0.0718* (58 %)	11	1.3604 ± 0.0732* (56 %)	11	1.1656 ± 0.0796* (32 %)
1100	8	1.2534 ± 0.0602* (45 %)	16	1.2449 ± 0.0737* (43 %)	12	1.2503 ± 0.0581* (42 %)

Tra parentesi: differenza % rispetto ai controlli; *p<0.01 all'analisi della varianza, rispetto ai controlli.

4.1.4. Analisi ematochimiche

Le analisi ematochimiche nei topi morti entro 24 ore o sacrificati a 24 ore hanno rilevato, a tutte le dosi delle tre tossine, un significativo aumento dei livelli sierici delle transaminasi (aspartato aminotransferasi, AST ed alanina aminotransferasi, ALT) e della glutammato deidrogenasi (GLDH), indici di danno epatico. In particolare, l'AZA1 (135-1100 µg/kg) ha indotto un aumento di ALT compreso tra il 423% (135 µg/kg) ed il 3510% (650 µg/kg). L'incremento dei livelli di AST, invece, era compreso tra 93% (135 µg/kg) e 1600% (500 µg/kg), mentre quello della GLDH era compreso tra 595% (135 µg/kg) e 7263% (650 µg/kg). La somministrazione di AZA2 (300-110 µg/kg) ha indotto un aumento dei livelli sierici di ALT compresi tra 376% (300 µg/kg) e 2416% (850 µg/kg), mentre l'aumento dei livelli di AST e GLDH era compreso negli intervalli di 314-3498% (390-850 µg/kg) e 356-5379% (300-850 µg/kg), rispettivamente. AZA3 (300-1100 µg/kg) ha determinato degli incrementi nei livelli sierici di ALT, AST e GLDH che raggiungevano rispettivamente il 487% (1100 µg/kg), 430% (850 µg/kg) e 418% (500 µg/kg) (Fig. 20).

Inoltre, nei topi trattati con ciascuna tossina sono stati rilevati dei significativi aumenti nei livelli sierici dello ione potassio. In particolare, nei topi trattati AZA1, l'incremento della potassiemia è stato registrato a partire dalla dose di 500 µg/kg ed era compreso tra il 18 % e l'80 %. Alle stesse dosi, nei topi trattati con AZA2 l'incremento degli ioni K⁺ era compreso tra il 31% ed il 53%, mentre quello rilevato nei topi trattati con AZA3 era inferiore (11-22%) (Fig. 21).

Entro 24 ore, la somministrazione degli AZAs non ha invece influenzato in maniera significativa gli altri parametri ematochimici analizzati (creatin fosfochinasi, CPK; creatinina, ioni sodio, potassio, cloro, calcio e fosfato inorganico) (Fig. 20-21).

A 14 giorni dalla somministrazione delle tossine, non sono state registrate differenze significative nei parametri ematochimici rispetto a quelli degli animali di controllo.

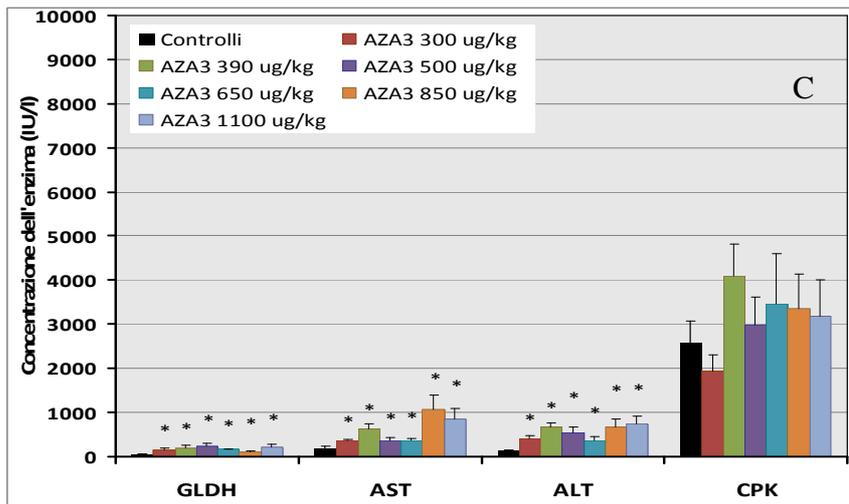
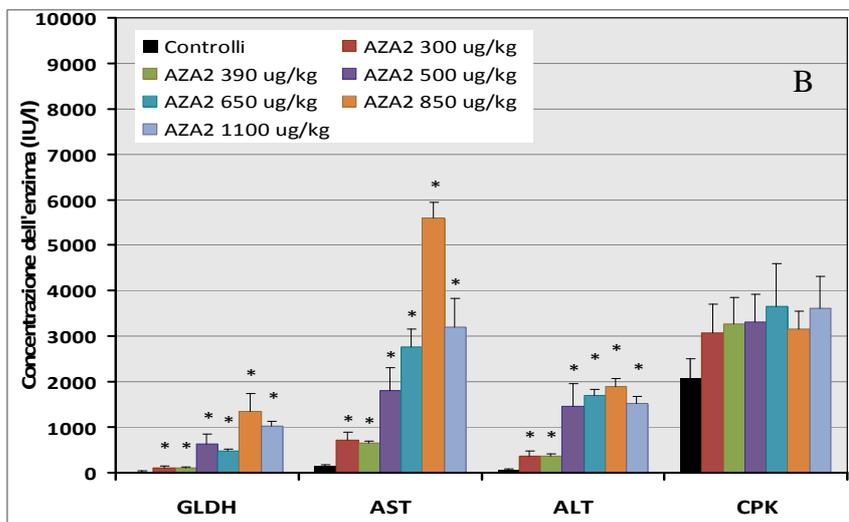
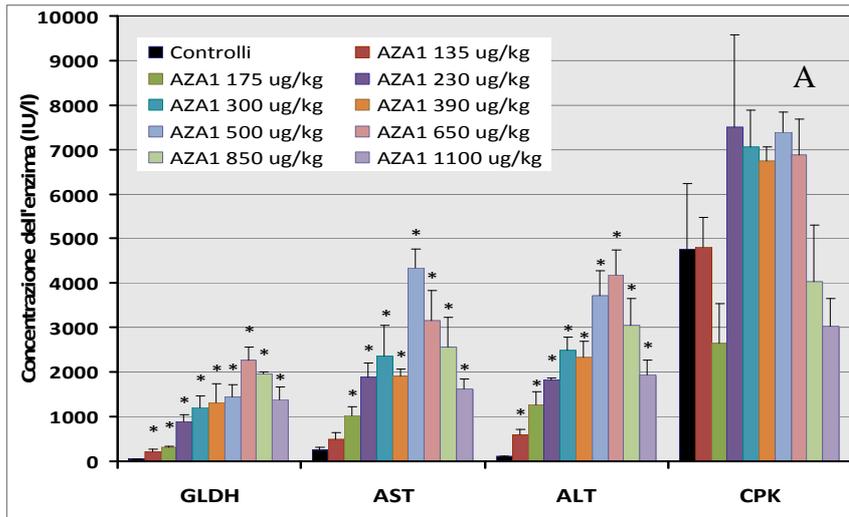


Figura 20. Livelli sierici di GLDH, AST, ALT e CPK a 24 ore dalla somministrazione orale di AZA1 (A), AZA2 (B) o AZA3 (C). I dati sono la media \pm E.S. di 5 valori, * $p < 0.05$ all'analisi della varianza, rispetto ai controlli.

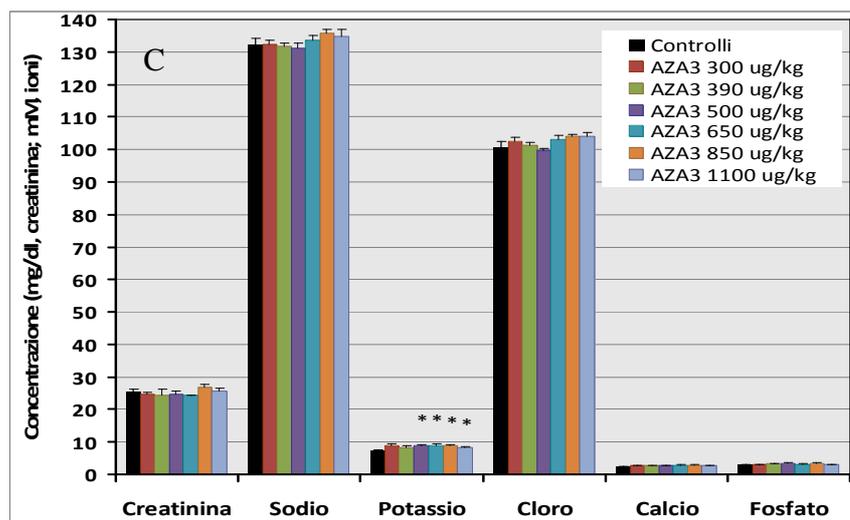
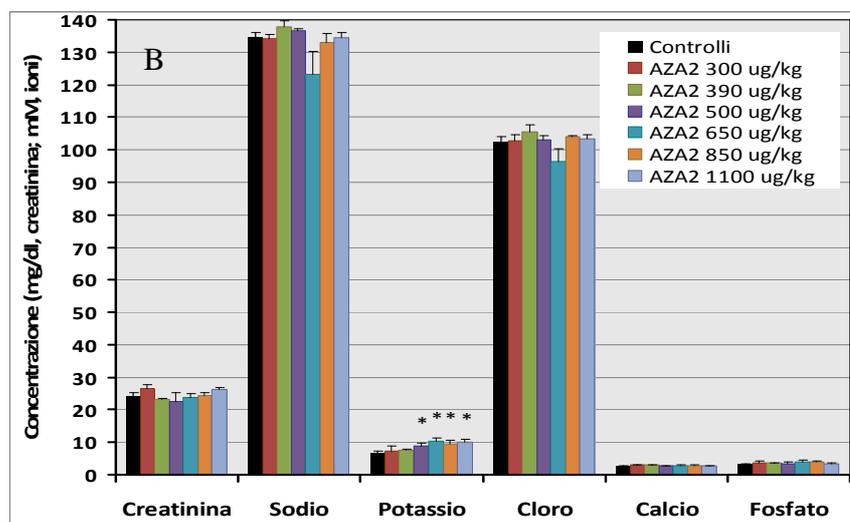
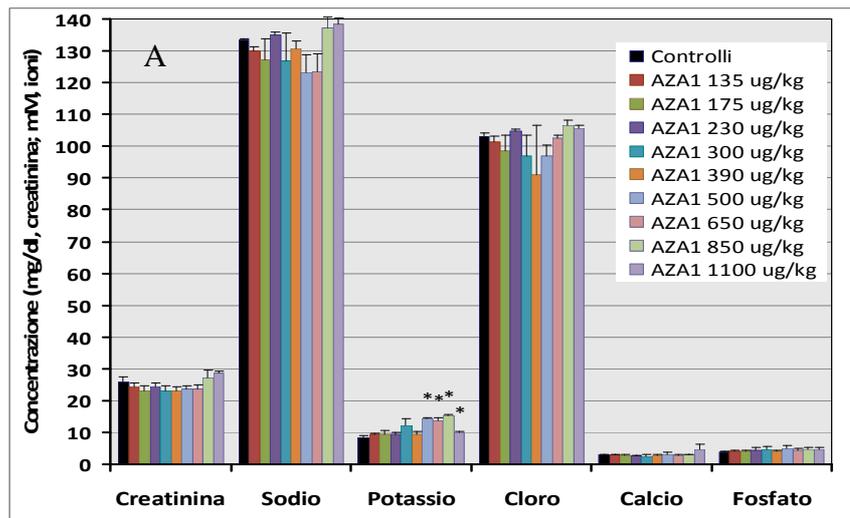


Figura 21. Livelli sierici di creatinina e ioni Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e fosfato inorganico a 24 ore dalla somministrazione orale di AZA1 (A), AZA2 (B) o AZA3 (C). I dati sono la media \pm E.S. di 5 valori, * $p < 0.05$ all'analisi della varianza, rispetto ai controlli.

4.1.5. Analisi istologica

L'analisi istologica ha rilevato alcune alterazioni a livello del duodeno nei topi trattati con la dose più alta delle tossine. In particolare, il duodeno presentava dei villi contratti ed appiattiti ed un assottigliamento della parete enterocitaria. Non si sono invece osservati segni d'inflammazione (Fig. 22).

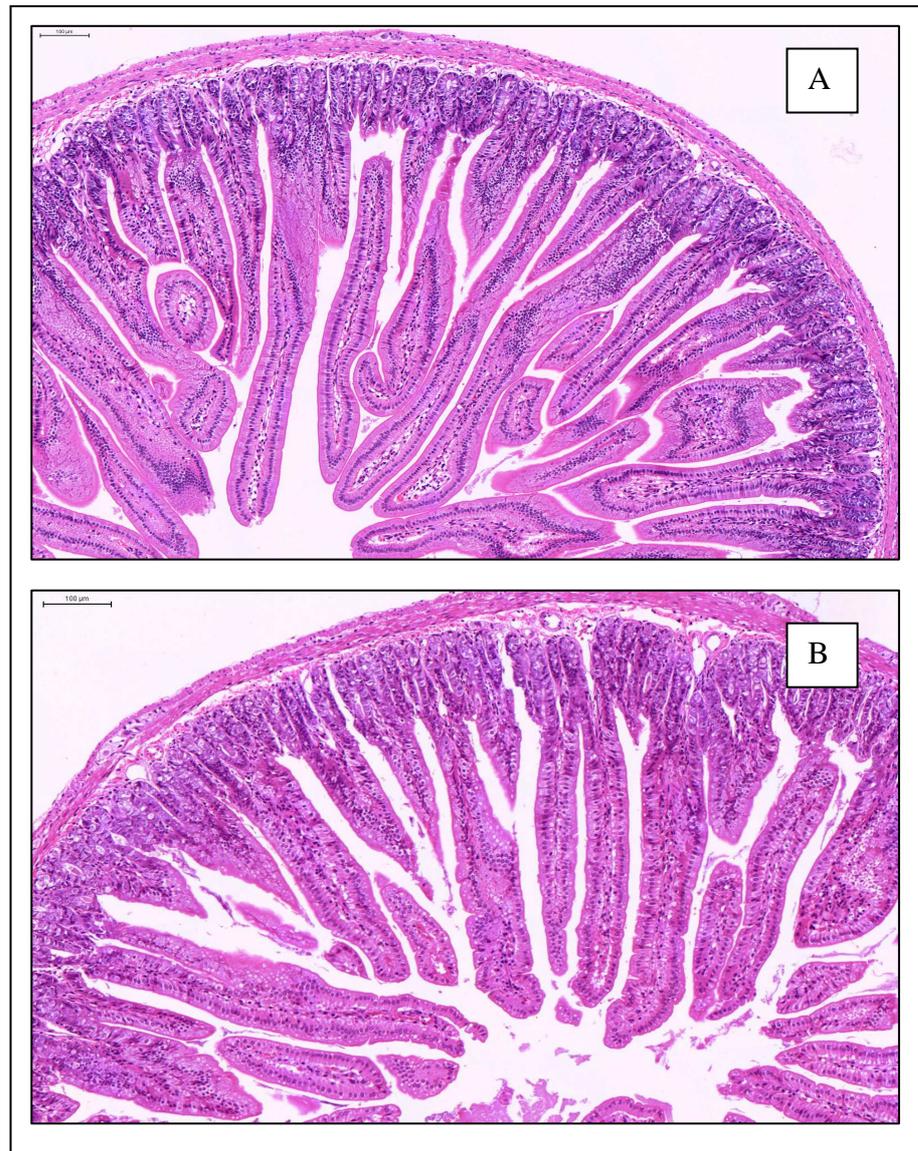


Figura 22. Immagine al microscopio ottico di una sezione di duodeno di un topo di controllo (A) e di un topo trattato con AZA1 (1100 µg/kg) (B). La barra di scala indica 100 µm.

4.1.6. Quantificazione degli AZAs negli organi/tessuti

Una valutazione preliminare della distribuzione degli AZAs nei principali organi e tessuti interni dei topi è stata effettuata 24 ore dopo la somministrazione delle tossine, o al momento della morte dei topi, e dopo 14 giorni. L'analisi mediante LC-MS ha permesso di rilevare le tossine nei principali organi e tessuti, con una distribuzione simile per i tre AZAs. I massimi livelli di AZAs sono stati rilevati nello stomaco (AZA1: 0.29-1.54 $\mu\text{g/g}$; AZA2: 0.18-3.70 $\mu\text{g/g}$; AZA3: 0.45-6.86 $\mu\text{g/g}$) e, in ordine decrescente, nel contenuto intestinale, nel fegato, nell'intestino tenue, nei reni, nei polmoni, nell'intestino crasso, nel cuore e nel cervello (Fig. 23). L'assorbimento delle tossine era correlato alle dosi somministrate, con un recupero pari a 3-23% per AZA1, 4-19% per AZA2 e 2-8 % per AZA 3.

Dopo 14 giorni, solo AZA1 e AZA2 erano ancora rilevabili negli organi interni, con un recupero delle tossine inferiore a 3% (dati non riportati).

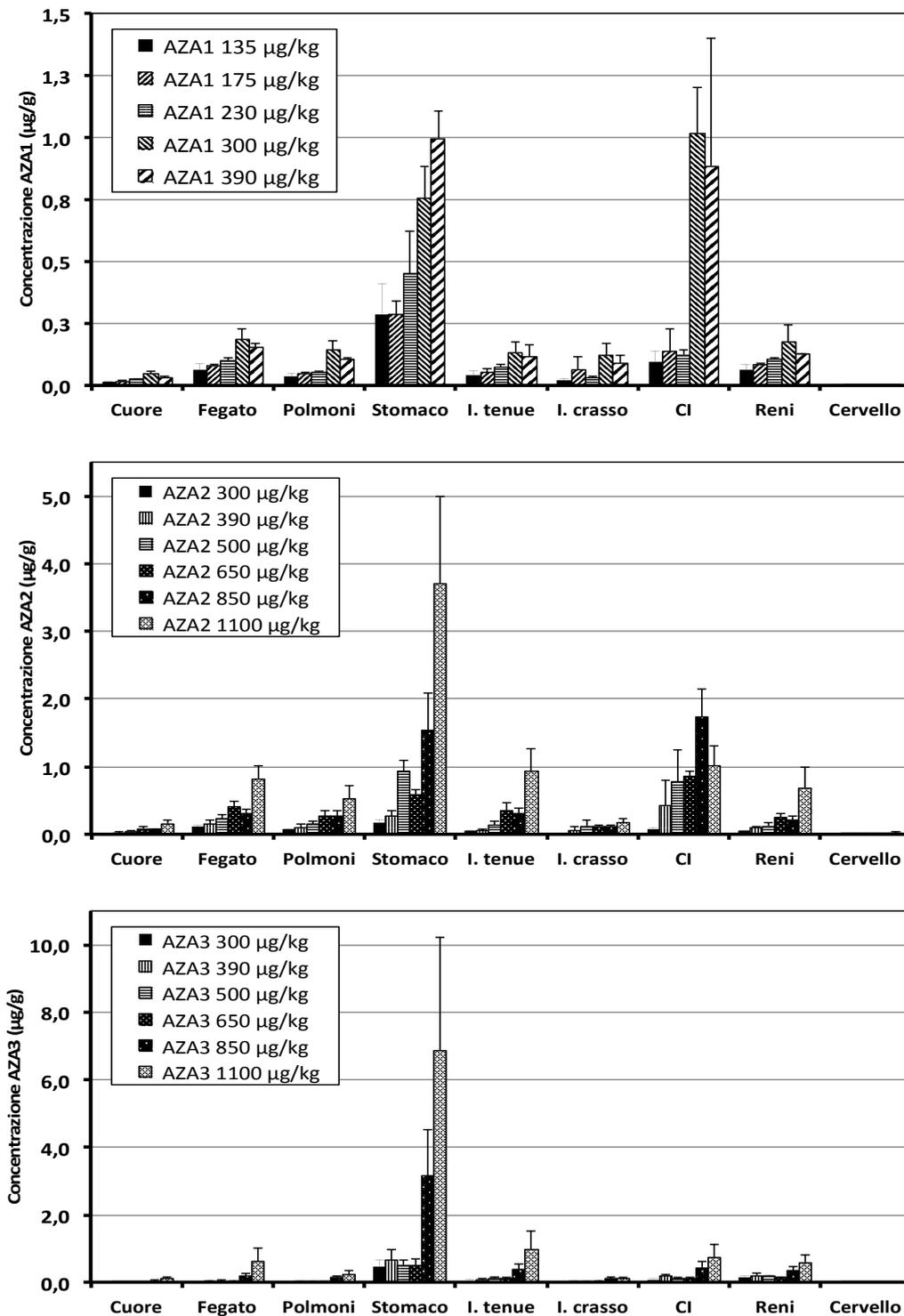


Figura 23. Concentrazione di AZA1-3 negli organi/tessuti e nel contenuto intestinale (CI) dei topi a 24 ore dalla somministrazione delle tossine. I dati sono la media \pm E.S. di 3 topi.

4.2. STUDI DI TOSSICITA' *IN VITRO*

4.2.1. Effetti degli AZAs sulle cellule IHH

Considerando l'evidente alterazione macroscopica indotta dagli AZAs a livello del fegato, al fine di caratterizzare gli effetti di queste tossine a livello di quest'organo è stata valutata la loro citotossicità nei confronti degli epatociti umani IHH non tumorali. Le cellule sono state esposte a concentrazioni scalari di AZA1, AZA2 e AZA3 (1.0×10^{-7} - 5.08×10^{-12} M) per 24, 48 e 72 ore prima di essere sottoposte al test dell'MTT. In Figura 24 è rappresentata vitalità delle cellule esposte alle tossine per 24, 48 e 72 ore, rispetto alle cellule di controllo non trattate (% vitalità). Ciascuna tossina ha indotto una riduzione concentrazione-dipendente della vitalità cellulare solo dopo 72 ore di esposizione, con valori di EC_{50} (concentrazione in grado di ridurre la vitalità cellulare del 50%) pari a 2.7×10^{-11} M (intervallo di confidenza al 95 %, IC, 95%: $1.5 - 5.1 \times 10^{-11}$ M), 7.0×10^{-11} M (IC 95%: $3.3 - 14.7 \times 10^{-11}$ M) e 3.8×10^{-11} M (IC 95%: $2.0 - 7.0 \times 10^{-11}$ M) per AZA1, 2 e 3 rispettivamente. Gli effetti massimi sono stati raggiunti alla concentrazione di 4.12×10^{-10} M per AZA1 (vitalità cellulare del $27.3 \pm 1.2\%$) ed AZA2 ($31.5 \pm 0.2\%$), mentre per AZA3 alla concentrazione di 1.23×10^{-9} M ($27.3 \pm 2.9\%$).

A 48 ore è stata osservata solo una lieve ma significativa riduzione della vitalità cellulare, a concentrazioni maggiori di 1.1×10^{-8} M per AZA1 e maggiori di 3.33×10^{-8} M per AZA2, mentre per AZA-3 non è stato osservato alcun effetto (Fig. 24).

A 24 ore, invece, è stato registrato un significativo incremento concentrazione-dipendente della vitalità cellulare, che poteva essere dovuto ad un'aumentata attività mitocondriale e/o ad un'aumentata proliferazione delle cellule indotta dalle tossine. L'effetto massimo è stato ottenuto alla concentrazione di 1.37×10^{-10} M (vitalità cellulare: $152.6 \pm 6.7\%$), 1.23×10^{-9} M (vitalità cellulare: $159.4 \pm 10.5\%$) e 4.12×10^{-10} M (vitalità cellulare: $154.3 \pm 11.4\%$) per AZA1, 2 e 3, rispettivamente (Fig. 24).

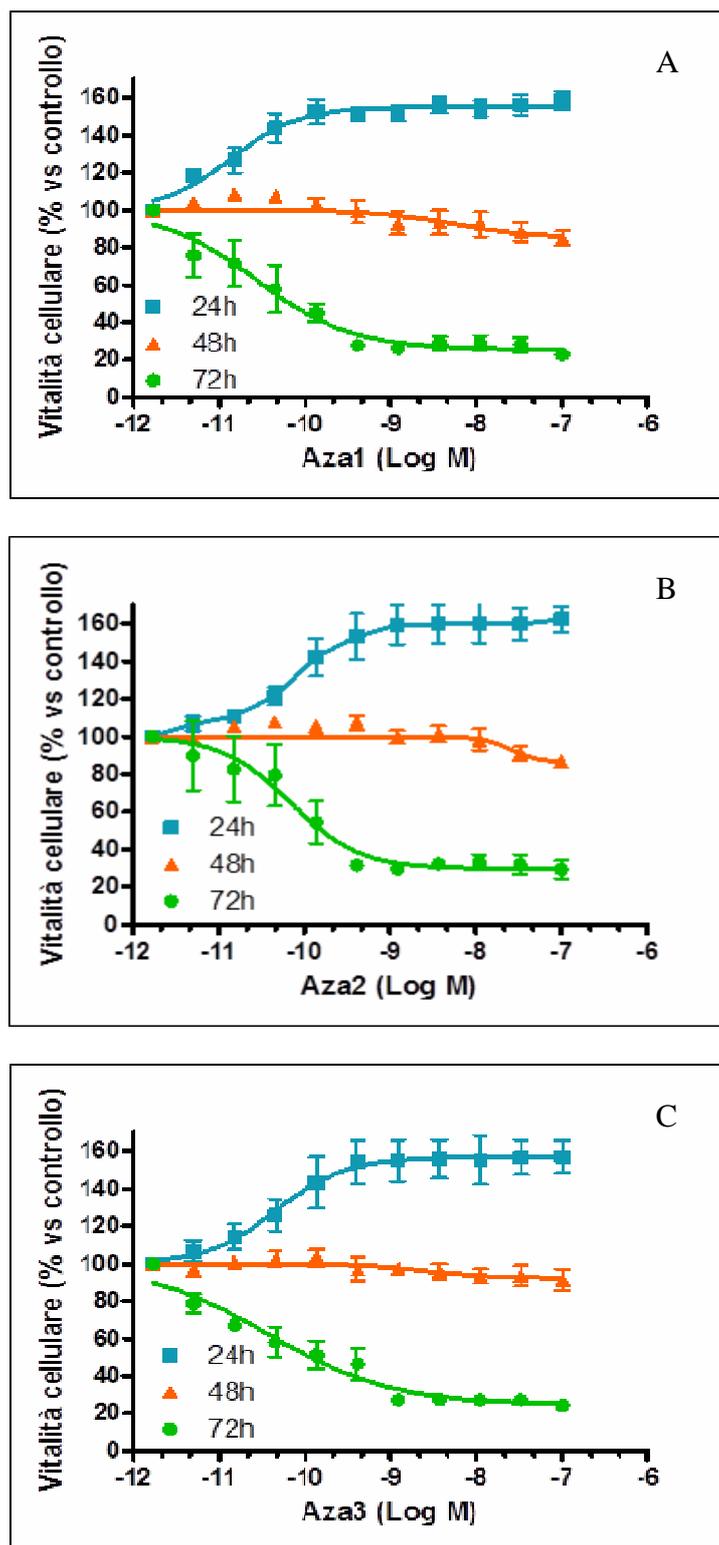


Figura 24. Effetto di AZA1 (A), AZA2 (B) e AZA3 (C) sulla vitalità delle cellule IHH. Le cellule sono state esposte a concentrazioni scalari di tossina per 24, 48 e 72 ore prima del test dell'MTT. I dati sono espressi come media della vitalità rispetto a quella delle cellule di controllo (100% di vitalità) \pm E.S. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato.

Al fine di verificare se l'aumentata vitalità fosse dovuta ad un incremento della proliferazione cellulare, le cellule esposte alle tossine sono state sottoposte al test della sulforodamina B (SRB), nelle stesse condizioni sperimentali impiegate utilizzate per il test dell'MTT. In Figura 25 è rappresentata la proliferazione delle cellule esposte a concentrazioni scalari delle tossine per 24, 48 e 72 ore, rispetto alle cellule di controllo I risultati ottenuti hanno evidenziato che, dopo 72 ore di esposizione, le tossine riducevano la proliferazione delle cellule in maniera concentrazione-dipendente, con valori di EC_{50} pari a 2.3×10^{-11} M (IC 95%: $1.4 - 3.7 \times 10^{-11}$ M), 4.5×10^{-11} M (IC 95%: $2.7 - 7.6 \times 10^{-11}$ M) e 2.1×10^{-11} M (IC 95%: $1.5 - 2.8 \times 10^{-11}$ M) per AZA1, 2 e 3, rispettivamente. Gli effetti massimi erano raggiunti alla concentrazione di 4.12×10^{-10} M per AZA1 (proliferazione cellulare: $27.8 \pm 3.0\%$) e AZA3 (proliferazione cellulare: $26.5 \pm 4.5\%$), mentre per AZA2 alla concentrazione di 1.23×10^{-9} M (proliferazione cellulare: $29.2 \pm 3.3\%$) (Fig. 25).

Anche a 48 ore è stato rilevato un effetto anti-proliferativo, di minore entità, mentre a 24 ore non è stato osservato alcun effetto delle tossine sulla proliferazione cellulare (Fig. 25).

Ciò induce ad ipotizzare che l'aumentata vitalità cellulare rilevata a 24 ore mediante il test MTT non sia correlata ad un'aumentata proliferazione delle cellule indotta dalle tossine ma ad una probabile stimolazione dell'attività mitocondriale.

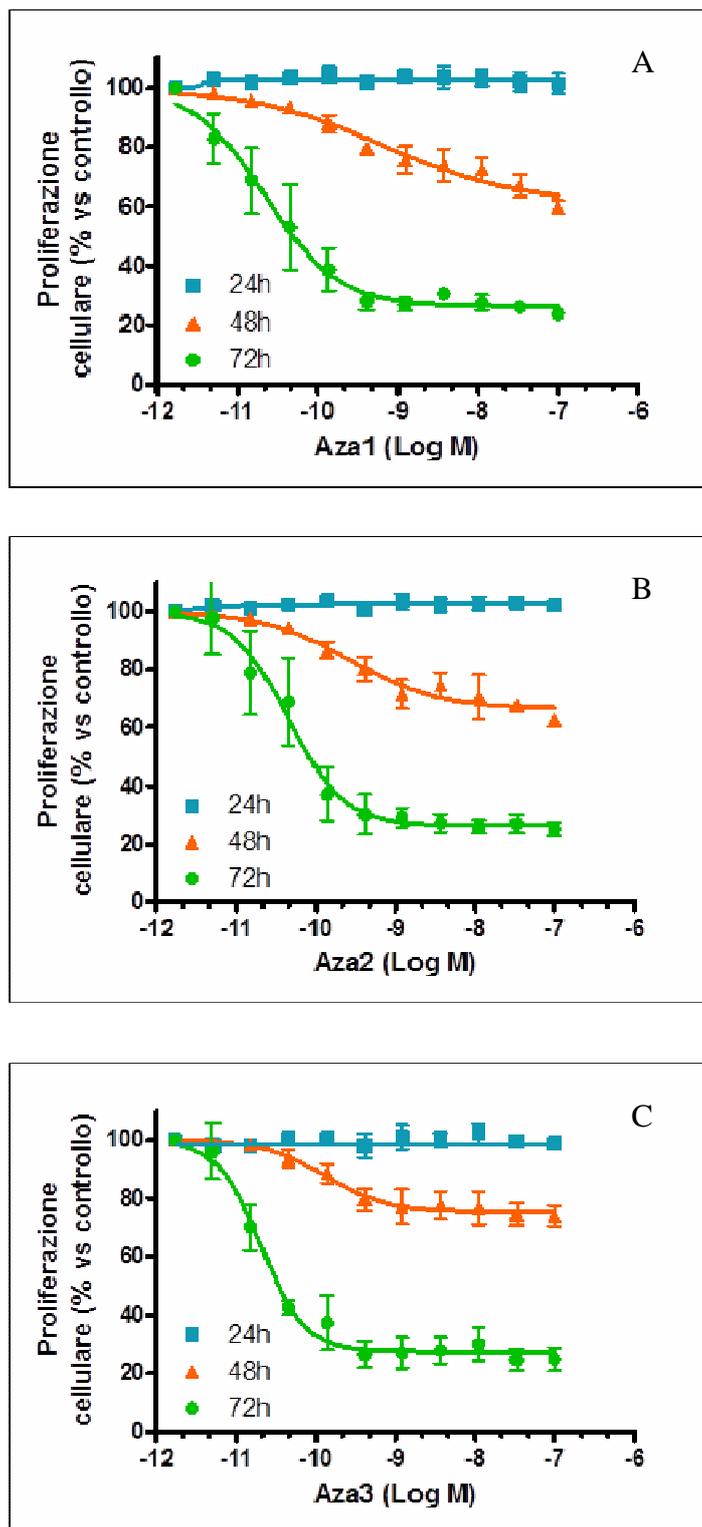


Figura 25. Effetto di AZA1 (A), AZA2 (B) e AZA3 (C) sulla proliferazione delle cellule IHH. Le cellule sono state esposte a concentrazioni scalari di tossina per 24, 48 e 72 ore prima del test della SRB. I dati sono espressi come media della proliferazione rispetto a quella delle cellule di controllo (100% di proliferazione) \pm E.S. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato.

4.2.2. Effetti degli AZAs sulle cellule HepG2

L'effetto degli AZAs è stato valutato anche nei confronti degli epatociti umani tumorali HepG2. Le cellule HepG2 sono state esposte a concentrazioni scalari di AZA1, AZA2 ed AZA3 (1.0×10^{-7} - 5.08×10^{-12} M) per 24, 48 e 72 ore, nelle stesse condizioni sperimentali impiegate per la linea cellulare IHH. In Figura 26 è rappresentata la vitalità delle cellule HepG2 esposte alle tossine rispetto alle cellule di controllo non trattate, valutata mediante il test dell'MTT. A 72 ore, è stata rilevata una riduzione concentrazione-dipendente della vitalità cellulare dopo esposizione a ciascuna tossina, con valori di EC_{50} pari a 4.1×10^{-12} M (IC 95%: $3.5 - 4.8 \times 10^{-12}$ M), 8.6×10^{-12} M (IC 95%: $5.9 - 12.4 \times 10^{-12}$ M) e 4.3×10^{-12} M (IC 95%: $2.9 - 5.9 \times 10^{-12}$ M) per AZA1, AZA2 e AZA3, rispettivamente. L'effetto massimo è stato raggiunto alla concentrazione di 1.37×10^{-10} M per AZA1 (vitalità cellulare: $10.8 \pm 1.4\%$) e AZA3 (vitalità cellulare: $10.2 \pm 2.1\%$), mentre per AZA2 alla concentrazione di 4.12×10^{-10} M (vitalità cellulare: $9.9 \pm 1.7\%$) (Fig. 26).

Anche a 48 ore è stato rilevato un effetto citotossico concentrazione-dipendente, di minore entità, con valori di EC_{50} pari a 6.0×10^{-12} M (IC 95%: $4.1 - 8.7 \times 10^{-12}$ M), 7.6×10^{-11} M (IC 95%: $5.1 - 11.2 \times 10^{-11}$ M) e 1.8×10^{-11} M (IC 95%: $0.8 - 4.0 \times 10^{-11}$ M) per AZA1, AZA2 e AZA3, rispettivamente. L'effetto massimo è stato raggiunto alla concentrazione di 4.12×10^{-10} M per AZA1 (vitalità cellulare: $27.1 \pm 3.8\%$) ed AZA3 (vitalità cellulare: $30.2 \pm 5.8\%$), o alla concentrazione di 1.23×10^{-9} M per AZA2 (vitalità cellulare: $21.7 \pm 3.3\%$) (Fig. 26). Confrontando questi valori con i valori di EC_{50} relativi alle cellule IHH, emerge che la linea HepG2 è più sensibile alle tossine rispetto alla linea IHH.

A 24 ore, analogamente a quanto evidenziato nelle cellule IHH, è stato invece rilevato un incremento concentrazione-dipendente della vitalità cellulare, con un effetto massimo alla concentrazione di 3.33×10^{-8} M per AZA1 (vitalità cellulare: $139.9 \pm 5.3\%$), 4.57×10^{-11} M per AZA2 (vitalità cellulare: $126.3 \pm 2.2\%$) e 1.37×10^{-10} M per AZA3 (vitalità cellulare: $141.7 \pm 8.2\%$) (Fig. 26).

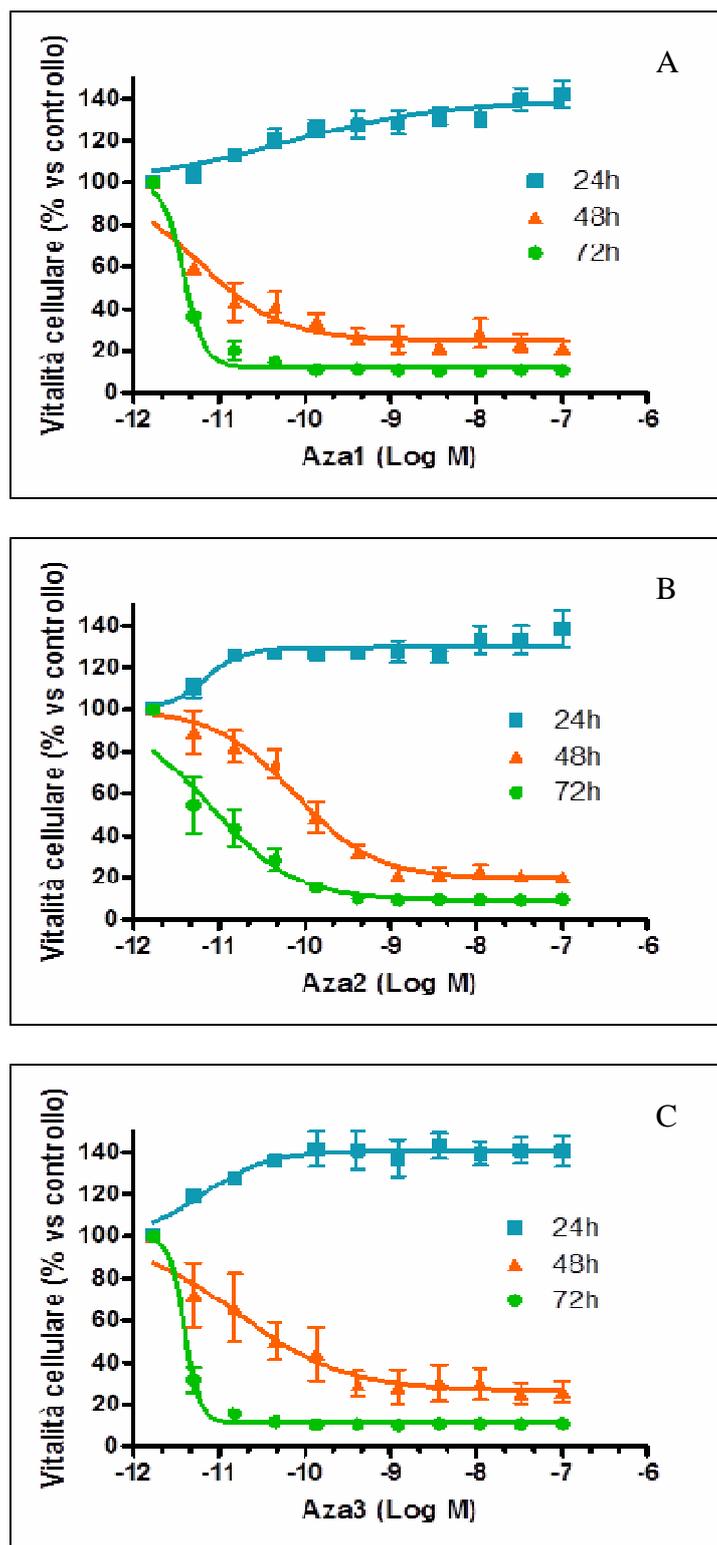


Figura 26. Effetto di AZA1 (A), AZA2 (B) e AZA3 (C) sulla vitalità delle cellule HepG2. Le cellule sono state esposte a concentrazioni scalari di tossina per 24, 48 e 72 ore prima del test dell'MTT. I dati sono espressi come media della vitalità rispetto a quella delle cellule di controllo (100% di vitalità) \pm E.S. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato.

Successivamente, sono stati valutati gli effetti degli AZAs sulla proliferazione delle cellule HepG2, mediante il test della SRB, nelle stesse condizioni sperimentali usate nel test dell'MTT. In Figura 27 è rappresentata la proliferazione delle cellule esposte alle tossine per 24, 48 e 72 ore (% rispetto alle cellule di controllo), da cui si evidenzia un effetto antiproliferativo concentrazione-dipendente dopo 72 ore di esposizione. La concentrazione in grado di ridurre la proliferazione del 50 % (EC₅₀) era pari a 6.5×10^{-12} M (IC 95%: $4.7 - 8.9 \times 10^{-12}$ M), 2.5×10^{-11} M (IC 95%: $1.1 - 5.3 \times 10^{-11}$ M) e 6.3×10^{-12} M (IC 95%: $4.0 - 9.9 \times 10^{-12}$ M) per AZA1, 2 e 3, rispettivamente. L'effetto massimo è stato esercitato da 1.37×10^{-10} M di AZA1 (proliferazione cellulare: $25.6 \pm 3.9\%$), 1.23×10^{-9} M di AZA2 (proliferazione cellulare: $23.7 \pm 6.0\%$) e 4.12×10^{-10} M di AZA3 (proliferazione cellulare: $23.9 \pm 4.9\%$) (Fig. 27).

A 48 ore, l'effetto anti-proliferativo delle tre tossine era lievemente inferiore, con valori di EC₅₀ pari a 1.3×10^{-11} M (IC 95%: $0.5 - 3.4 \times 10^{-11}$ M), 1.0×10^{-10} M (IC 95%: $0.5 - 2.0 \times 10^{-10}$ M) e 2.6×10^{-10} M (IC 95%: $1.1 - 6.2 \times 10^{-10}$ M) per AZA1, AZA2 ed AZA3, rispettivamente (Fig. 27). A 24 ore, invece, nessuna delle tre tossine è stata in grado di influenzare la proliferazione delle cellule HepG2 (Fig. 27).

Pertanto, anche nelle cellule HepG2, il test della SRB ha indicato che l'aumentata riduzione dell'MTT dopo 24 ore di esposizione alle tossine, poteva essere correlata ad un'aumentata attività mitocondriale indotta dagli AZAs piuttosto che ad un incremento della proliferazione cellulare.

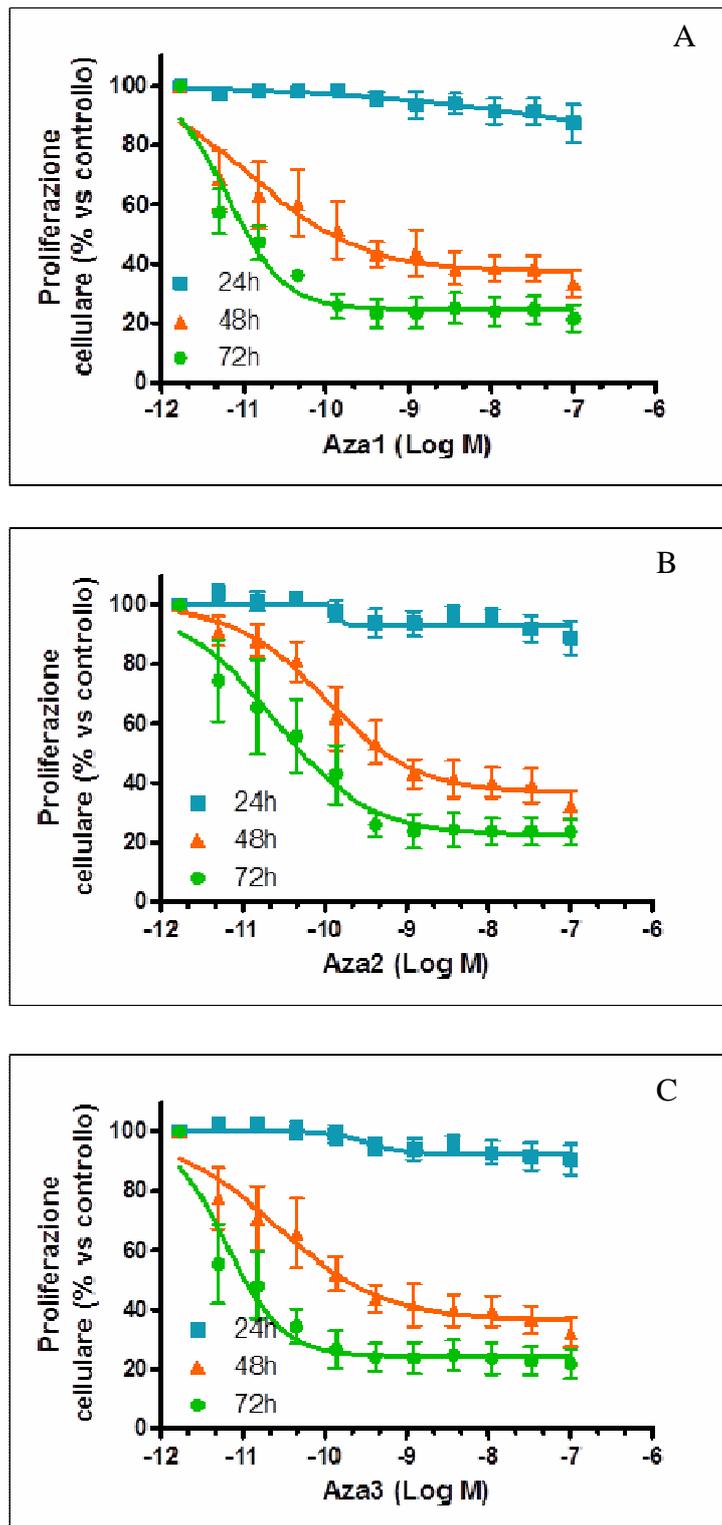


Figura 27. Effetto di AZA1 (A), AZA2 (B) e AZA3 (C) sulla proliferazione delle cellule HepG2. Le cellule sono state esposte a concentrazioni scalari di tossina per 24, 48 e 72 ore prima del test della SRB. I dati sono espressi come media della proliferazione rispetto a quella delle cellule di controllo (100% di vitalità) \pm E.S. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato.

4.2.3. Effetto degli inibitori della catena di trasporto degli elettroni sull'attività mitocondriale stimolata dagli AZAs

Al fine di valutare se l'aumentata attività mitocondriale fosse correlata ad un'alterata funzionalità della catena di trasporto degli elettroni in questi organuli, le cellule IHH e le cellule HepG2 sono state trattate per un'ora con specifici inibitori dei complessi della catena di trasporto, prima di essere esposte per 24 ore a concentrazioni scalari di AZA1, 2 e 3 (1.0×10^{-7} - 5.1×10^{-12} M). In particolare, le cellule sono state pre-esposte all'inibitore del complesso I rotenone (concentrazione finale: 5 μ M), del complesso II tetroiltrifluoroacetone (TTFA, 1 mM), del complesso III antimicina-A (20 μ M), del complesso IV sodio azide (NaN_3 , 150 μ M) e dell'ATP-sintasi oligomicina (1 μ M). Gli effetti di questi inibitori nelle cellule esposte agli AZAs sono stati valutati mediante il test dell'MTT.

In Figura 28 è rappresentata l'attività mitocondriale (%) nelle cellule IHH esposte alle tossine (con e senza pre-trattamento con gli inibitori specifici), rispetto alle cellule di controllo. Solo il pre-trattamento con rotenone o TTFA, è stato in grado di ridurre in maniera significativa l'aumentata attività mitocondriale indotta dagli AZAs. In particolare, l'effetto del rotenone nelle cellule esposte ad AZA1, AZA2 o AZA3 è risultato significativo a partire dalle concentrazioni di 5.1×10^{-12} M (AZA1), 4.6×10^{-11} M (AZA2) e 1.4×10^{-10} M (AZA3), mantenendosi pressochè costante con l'aumentare della concentrazione degli AZAs fino a 1.0×10^{-7} M.

Il pre-trattamento con TTFA è stato in grado di ridurre in maniera significativa l'aumentata attività mitocondriale indotta da AZA1, 2 e 3 a partire dalle concentrazioni di 5.1×10^{-12} M (AZA1), 1.4×10^{-10} M (AZA2) e 4.6×10^{-11} M (AZA3). Tale effetto non era influenzato con l'aumento della concentrazione degli AZAs fino a 1.1×10^{-8} M, mentre l'inibizione aumentava progressivamente a partire dalla concentrazione di 3.3×10^{-8} M, fino a quella più alta provata (1.0×10^{-7} M) (vitalità cellulare: 11.7 ± 1.0 %, 15.2 ± 4.2 % e 10.4 ± 0.6 % per AZA1, AZA2 ed AZA3, rispettivamente). La pre-esposizione delle cellule agli altri inibitori, invece, non è stata in grado di influenzare l'effetto degli AZAs sull'attività mitocondriale (Fig. 28).

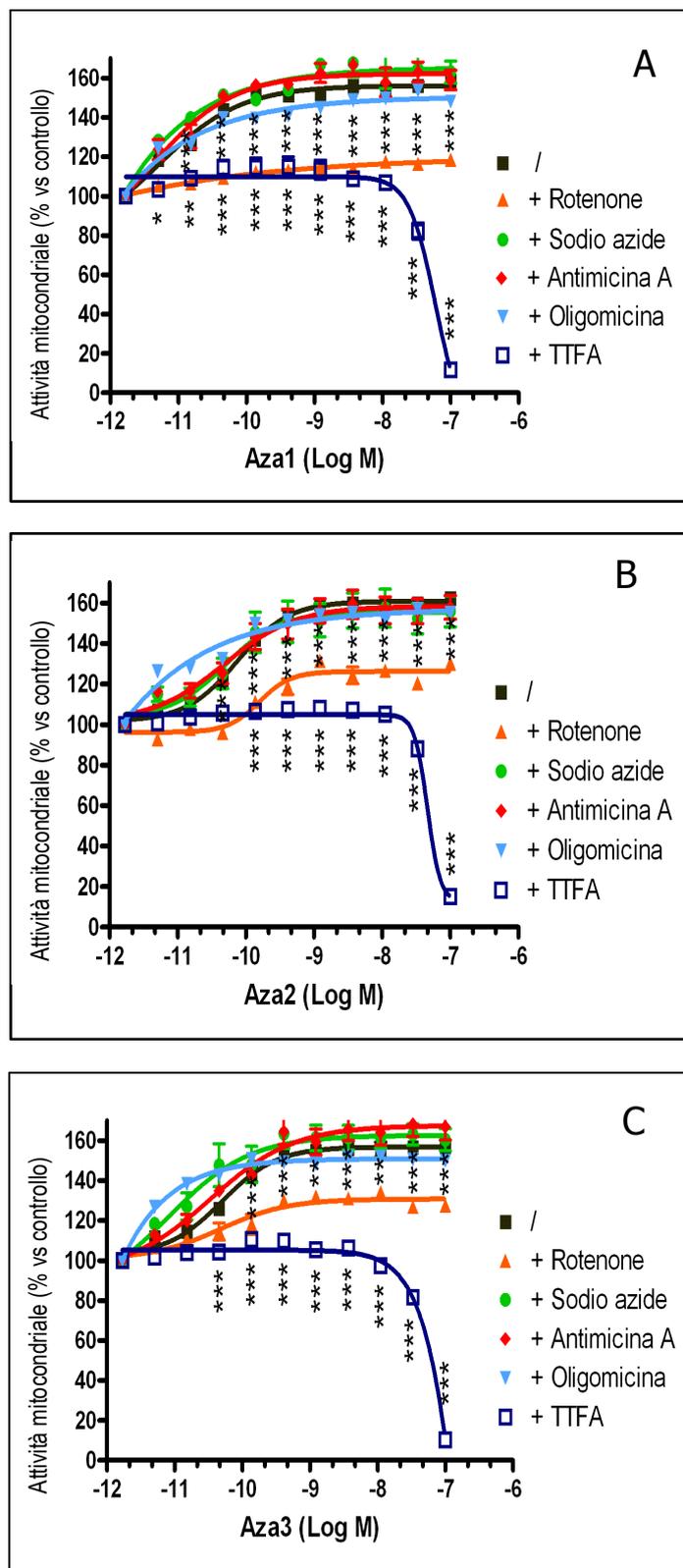


Figura 28. Effetti degli inibitori rotenone (5 μM), TTFA (1 mM), antimicina-A (20 μM), sodio azide (150 μM) ed oligomicina (1 μM) sull'attività mitocondriale nelle cellule IHH stimolata dall'esposizione ad AZA1 (A), AZA2 (B) ed AZA3 (C) per 24 ore (test dell'MTT). I dati sono espressi come media dell'attività mitocondriale rispetto a quella delle cellule di controllo (100%

attività mitocondriale) \pm E.S. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Differenza significativa tra cellule esposte ai soli AZAs e cellule trattate con gli inibitori dei complessi della catena di trasporto prima dell'esposizione agli AZAs: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA a due vie e Bonferroni post-test).

In Figura 29 è invece rappresentata l'attività mitocondriale (% rispetto alle cellule di controllo non esposte agli AZAs) nelle cellule HepG2 trattate per un'ora con gli inibitori dei complessi della catena di trasporto degli elettroni, prima dell'esposizione ad AZA1 (A), AZA2 (B) e AZA3 (C) e l'attività mitocondriale nelle cellule esposte alle sole tossine per 24 ore. Anche nella linea HepG2, solo il rotenone ed il TTFA sono stati in grado di ridurre in maniera significativa l'aumentata attività mitocondriale indotta dagli AZAs. Il rotenone ha determinato una riduzione significativa a partire dalle concentrazioni di tossine pari a 1.5×10^{-11} M (AZA1), 5.1×10^{-12} M (AZA2) e 5.1×10^{-12} M (AZA3), con un effetto pressochè costante fino alla concentrazione di tossine pari 1.0×10^{-7} M.

In presenza di TTFA, l'aumentata attività mitocondriale indotta dagli AZAs veniva ridotta in maniera significativa a partire dalla concentrazione di tossine pari a 5.1×10^{-12} M. A concentrazioni maggiori, l'effetto del TTFA aumentava con l'aumentare della concentrazione delle tossine e, alla più alta concentrazione provata (1.0×10^{-7} M), l'attività mitocondriale era pari a 19.8 ± 2.3 %, 21.5 ± 4.4 % e 22.5 ± 5.6 %, rispettivamente per AZA1, 2 e 3. Gli altri inibitori, invece, non hanno esercitato alcun effetto significativo sull'aumentata attività mitocondriale indotta dalle tre tossine (Fig. 29).

Poiché, sia nella linea IHH che nella linea HepG2, solo il rotenone ed il TTFA sono stati in grado di ridurre l'aumentata attività mitocondriale indotta dagli AZAs, è ipotizzabile che l'effetto degli AZAs coinvolga i complessi I e II della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale.

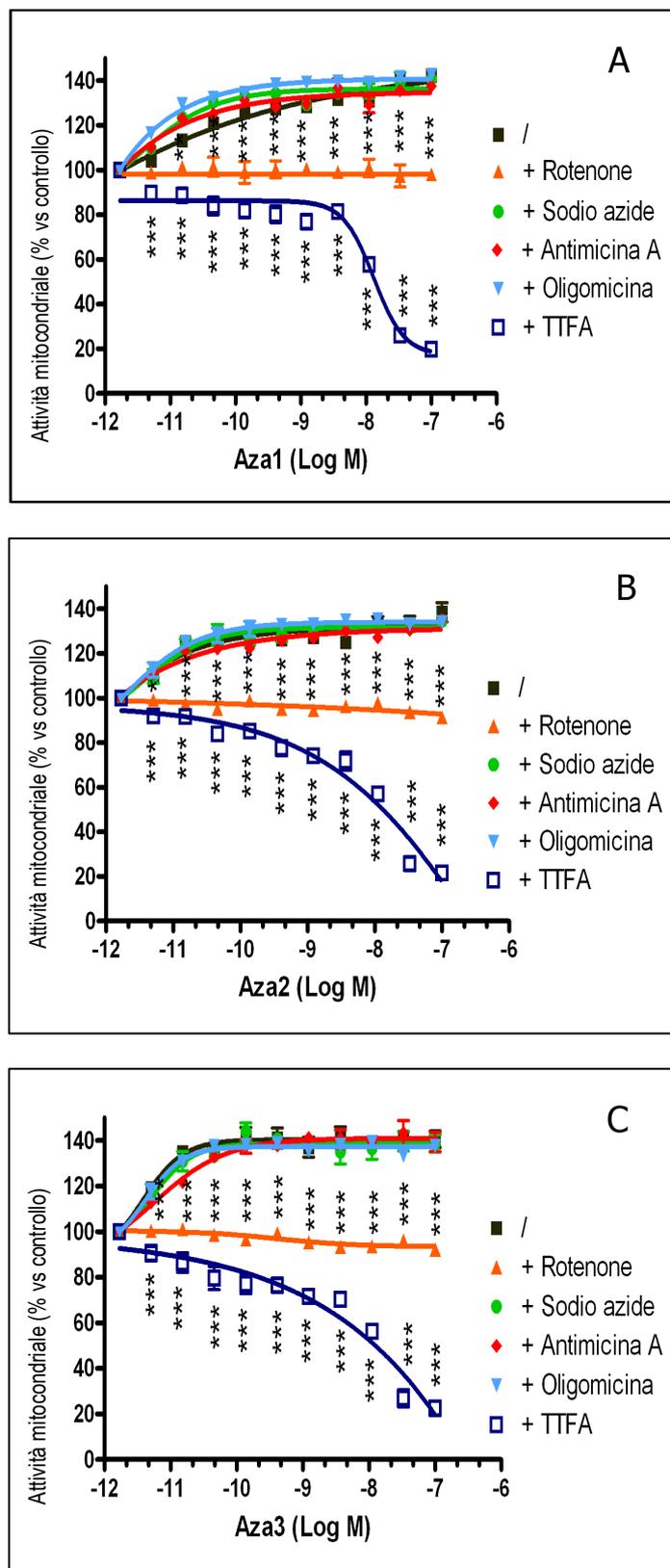


Figura 29. Effetto di rotenone (5 μ M), TTFA (1 mM), antimicina-A (20 μ M), sodio azide (150 μ M) ed oligomicina (1 μ M) sull'attività mitocondriale nelle cellule HepG2 stimolata dall'esposizione ad AZA1 (A), AZA2 (B) ed AZA3 (C) per 24 ore (test dell'MTT). I dati sono espressi come media

dell'attività mitocondriale rispetto a quella delle cellule di controllo non trattate (100% attività mitocondriale) \pm E.S. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Differenza significativa tra cellule esposte ai soli AZAs e cellule trattate con gli inibitori dei complessi della catena di trasporto prima dell'esposizione agli AZAs: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA a due vie e Bonferroni post-test).

4.2.4. Effetti dello squilibrio protonico sull'attività mitocondriale stimolata dagli AZAs

Al fine di verificare se l'azione degli AZAs fosse correlata ad un'aumentata permeabilità della membrana mitocondriale interna agli ioni H^+ , è stata valutata la capacità dello ionoforo K^+/H^+ nigericina di modulare gli effetti degli AZAs. Le cellule IHH pre-trattate per un'ora con nigericina (concentrazione finale: 50 μM) sono state esposte a concentrazioni scalari di AZA1, AZA2 e AZA3 (1.0×10^{-7} - 5.1×10^{-12} M) per 24 ore, prima di eseguire il test dell'MTT. In Figura 30 è rappresentata l'attività mitocondriale nelle cellule esposte ad AZA1, AZA2 ed AZA3, con e senza pre-trattamento con nigericina (% rispetto alle cellule di controllo non trattate con le tossine). In presenza di nigericina, è stata osservata una significativa riduzione dell'attività mitocondriale aumentata dagli AZAs, a partire dalle concentrazioni di 5.1×10^{-12} M (AZA1), 1.4×10^{-10} M (AZA2) e 1.4×10^{-10} M (AZA3). L'effetto della nigericina rimaneva pressoché costante con l'aumentare della concentrazione degli AZAs.

Poiché la funzionalità del complesso I della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale dipende dalla differenza di pH attraverso le membrane mitocondriali, questo risultato suggerisce che le tossine siano in grado di alterare la funzionalità del complesso I piuttosto che aumentare l'espressione delle proteine di questo complesso.

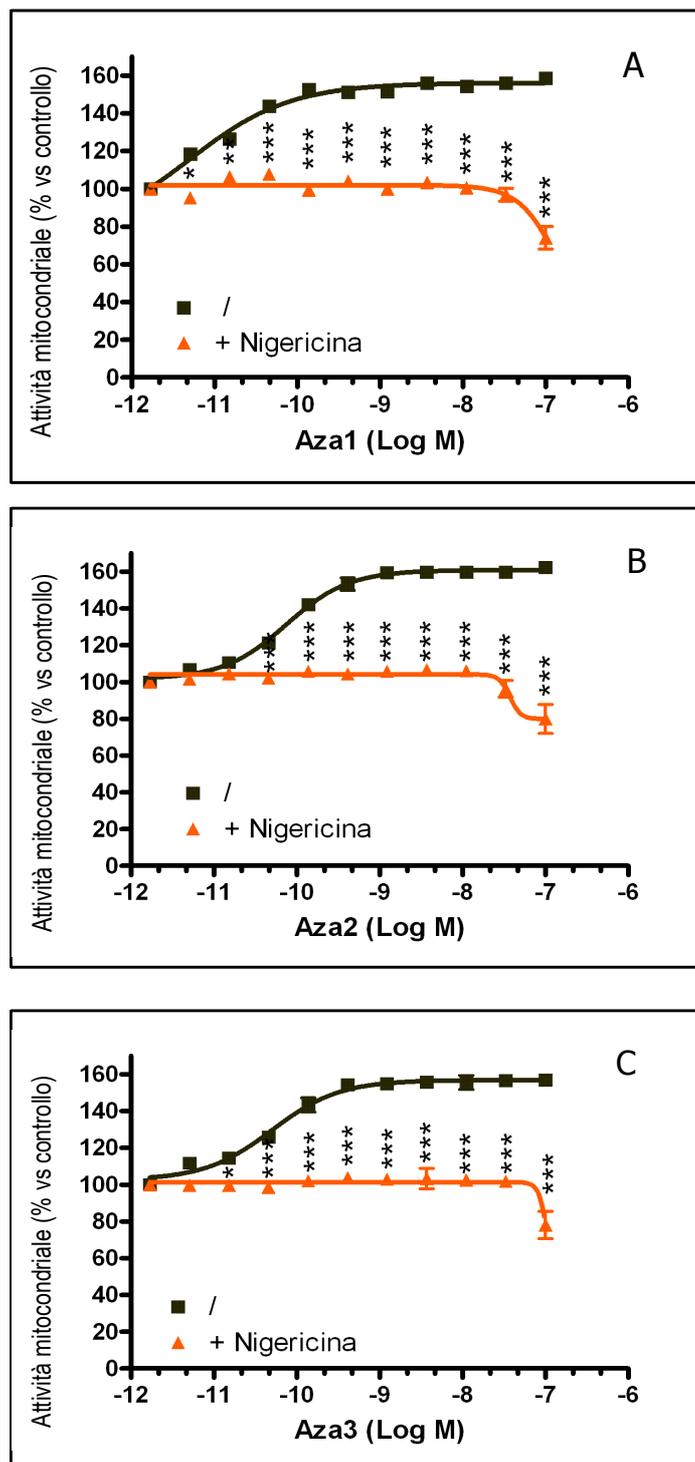


Figura 30. Effetti dello ionoforo nigericina (50 μ M) sull'attività mitocondriale nelle cellule IHH stimolata dall'esposizione ad AZA1 (A), AZA2 (B) ed AZA3 (C) per 24 ore (test dell'MTT). I dati sono espressi come media dell'attività mitocondriale rispetto a quella delle cellule di controllo non trattate (100% attività mitocondriale) \pm E.S. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Differenza significativa tra cellule pre-trattate con nigericina e cellule non pre-trattate con lo ionoforo: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA a due vie e Bonferroni post-test).

4.2.5. Effetti dello squilibrio ionico sull'attività mitocondriale stimolata dagli AZAs

Poiché gli equilibri protonici attraverso la membrana mitocondriale sono strettamente controllati e controbilanciati da un corretto equilibrio di altri ioni, con il coinvolgimento di canali e trasportatori ionici, è stato verificato l'eventuale ruolo degli ioni Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- e K^+ negli effetti degli AZAs a livello mitocondriale. A tale scopo, le cellule della linea IHH sono state incubate in terreni privi di tali ioni (Na^+ -free, K^+ -free, Ca^{2+} -free e Cl^- -free), prima di essere esposte a concentrazioni scalari di AZA1, AZA2 e AZA3 (1.0×10^{-7} - 5.1×10^{-12} M) per 24 ore. Gli effetti sono stati quindi valutati mediante il test dell'MTT.

In Figura 31 è rappresentata l'attività mitocondriale nelle cellule IHH esposte ad AZA1 (A), AZA2 (B) ed AZA3 (C) (% rispetto alle cellule di controllo non trattate) in terreno contenente gli ioni o in terreni privi degli ioni considerati (Na^+ -free, Ca^{2+} -free, K^+ -free e Cl^- -free). È stato così osservato che l'assenza di ioni Na^+ , Cl^- e soprattutto K^+ , è in grado di determinare una significativa riduzione, concentrazione-dipendente, dell'aumentata attività mitocondriale nelle cellule IHH esposte agli AZAs per 24 ore. In particolare, nel terreno Na^+ -free, l'aumentata attività mitocondriale indotta da AZA1, AZA2 e AZA3 è stata ridotta in maniera significativa a partire dalle concentrazioni di 3.7×10^{-9} M (AZA1), 4.6×10^{-11} M (AZA2) e 1.4×10^{-10} M (AZA3), mantenendosi pressoché costante con l'aumentare della concentrazione delle tossine fino a 1.0×10^{-7} M.

Nel terreno Cl^- -free, l'aumentata attività mitocondriale indotta da AZA1, AZA2 e AZA3 è stata ridotta a partire dalle concentrazioni di 4.1×10^{-10} M (AZA1), 1.4×10^{-10} M (AZA2) e 1.4×10^{-10} M (AZA3), con un effetto pressoché costante anche aumentando la concentrazione delle tossine fino a 1.0×10^{-7} M (Fig. 31).

Nel terreno K^+ -free, l'aumentata attività mitocondriale delle cellule esposte ad AZA1, AZA2 e AZA3 è stata ridotta in maniera più marcata ed è risultata significativa a partire dalle concentrazioni di 1.4×10^{-10} M (AZA1), 1.5×10^{-11} M (AZA2) e 4.6×10^{-11} M (AZA3). Anche aumentando le concentrazioni degli AZAs, è stato osservato un progressivo aumento dell'effetto esercitato dal terreno K^+ -free (Fig. 31).

Al contrario, l'assenza di ioni Ca^{2+} non è stata in grado di influenzare in maniera significativa l'incremento dell'attività mitocondriale nelle cellule IHH esposizione agli AZAs per 24 ore (Fig. 31).

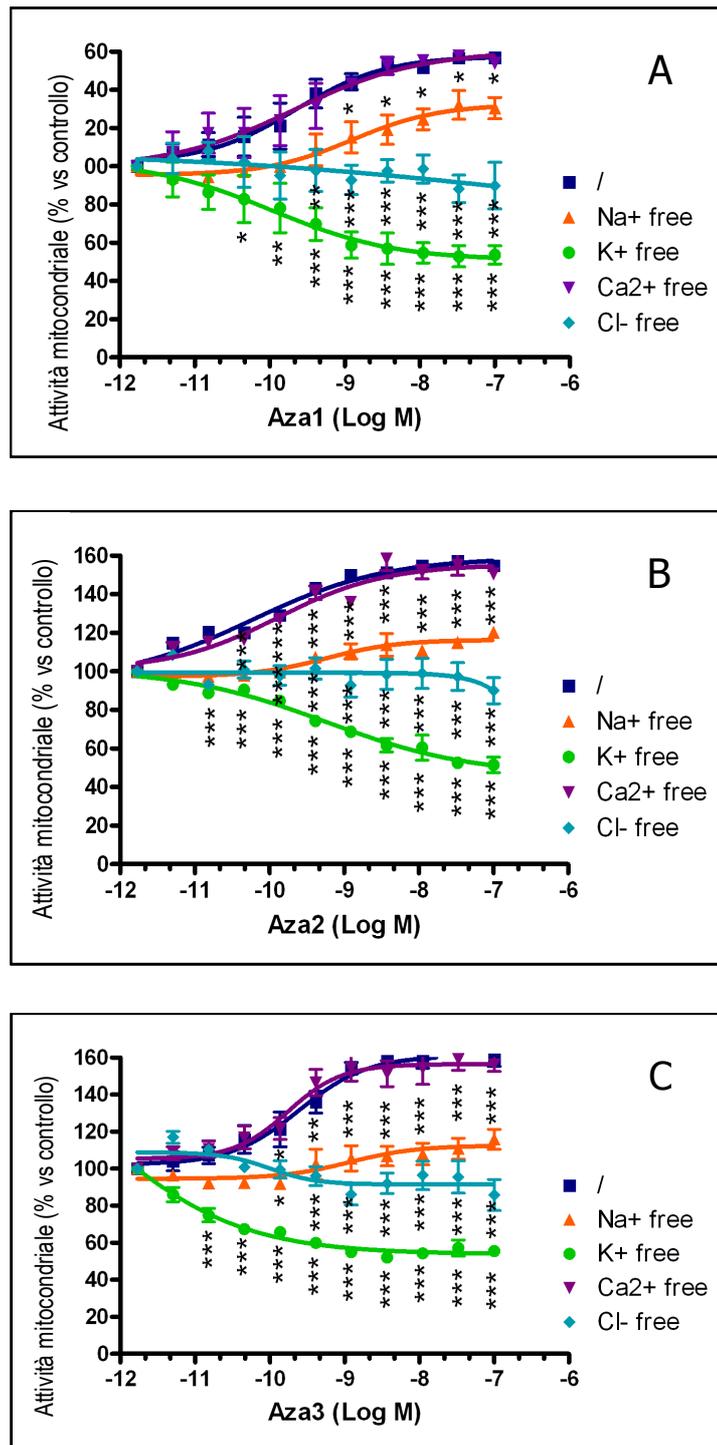


Figura 31. Effetto dei terreni privi di alcuni ioni sull'aumentata attività mitocondriale nelle cellule IHH esposte ad AZA1 (A), AZA2 (B) e AZA3 (C) per 24 ore (test dell'MTT). Le cellule sono state esposte agli AZAs in terreni Na⁺, K⁺, Ca²⁺ o Cl⁻-free e l'attività mitocondriale è stata confrontata con quella delle cellule esposte alle tossine in presenza degli ioni. I dati sono espressi come media dell'attività mitocondriale rispetto a quella delle cellule di controllo non trattate (100% attività mitocondriale) ± E.S. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Differenza significativa tra attività mitocondriale nelle cellule incubate in terreno contenente gli ioni e quella nelle cellule

incubate in terreno privo di ioni: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA a due vie e Bonferroni post-test).

4.2.6. Ruolo dei canali K_{ATP} , hERG e della Na^+/K^+ -ATPasi nell'alterata attività mitocondriale indotta dagli AZAs

Poiché l'aumentata attività mitocondriale nelle cellule IHH esposte agli AZAs per 24 ore era ridotta maggiormente in assenza di ioni K^+ , è stato valutato il ruolo di alcuni canali e pompe per questi ioni nel modulare gli effetti degli AZAs. I trasportatori degli ioni K^+ selezionati (i canali degli ioni K^+ ATP-sensibili o K_{ATP} , i canali degli ioni K^+ voltaggio-dipendenti o hERG e la Na^+/K^+ -ATPasi o NaKA) sono compresi tra quelli maggiormente espressi a livello epatico, come riportato dal *Model Organism Protein Expression Database* (MOPED, Higdon et al., 2014). A tale scopo, le cellule IHH sono state pre-trattate per un'ora con inibitori o attivatori dei trasportatori per gli ioni K^+ , quali l'inibitore dei canali K_{ATP} glibenclamide (concentrazione finale: 100 μ M), l'inibitore dei canali hERG cisapride (5 μ M), l'attivatore dei canali K_{ATP} minoxidil (100 μ M), l'attivatore dei canali hERG NS-1643 (30 μ M) e l'inibitore della NaKA ouabaina (10 μ M). Le cellule sono state quindi esposte a concentrazioni scalari di AZA1, AZA2 e AZA3 per 24 ore (1.0×10^{-7} - 1.0×10^{-9} M) e 72 ore (1.0×10^{-9} M - 1.0×10^{-11} M), prima del test dell'MTT.

In Figura 32 è rappresentata l'attività mitocondriale (% rispetto a quella delle cellule di controllo non trattate con le tossine) nelle cellule pre-esposte agli inibitori o attivatori dei canali K_{ATP} ed hERG o alla ouabaina ed incubate con AZA1 (A), AZA2 (B) o AZA3 (C) per 24 ore in confronto all'attività mitocondriale nelle cellule incubate agli AZAs senza pre-trattamento con gli inibitori o attivatori. Gli inibitori glibenclamide, cisapride ed ouabaina sono stati in grado di ridurre in maniera significativa l'aumentata attività mitocondriale indotta dagli AZAs, a partire dalle concentrazioni di 1.0×10^{-9} M, con un effetto pressoché costante all'aumentare della concentrazione degli AZAs fino a 1.0×10^{-7} M. Al contrario, gli attivatori minoxidil e NS-1643 non hanno esercitato alcun effetto significativo.

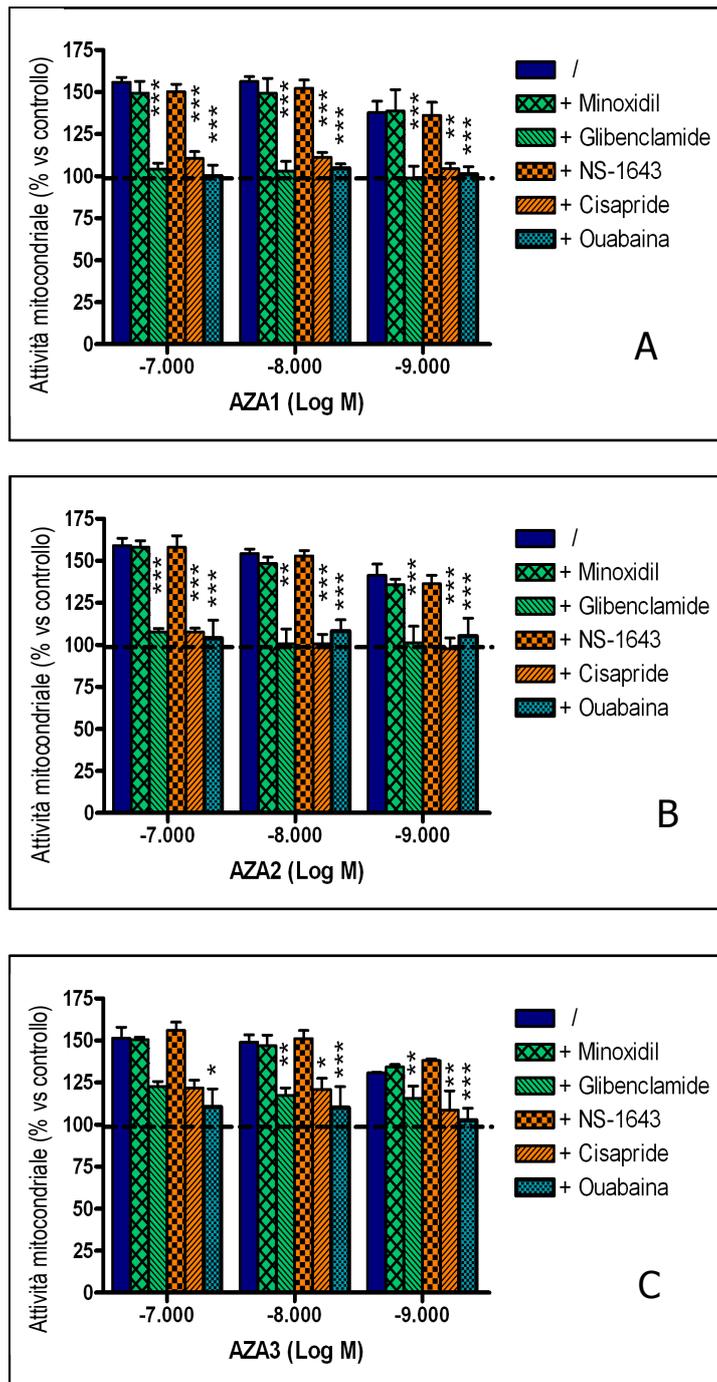


Figura 32. Effetto degli inibitori o attivatori dei trasportatori di ioni K^+ (K_{ATP} , hERG e NaKA) sull'aumentata attività mitocondriale nelle cellule IHH esposte ad AZA1 (A), AZA2 (B) ed AZA3 (C) per 24 ore. Le cellule sono state esposte per 1 ora a glibenclamide (100 μ M), cisapride (5 μ M), ouabaina (10 μ M), minoxidil (100 μ M) o NS-1643 (30 μ M) e successivamente agli AZAs per 24 ore. L'attività mitocondriale è stata valutata mediante il test dell'MTT. I dati sono espressi come media dell'attività mitocondriale rispetto alle cellule di controllo non trattate (100% attività mitocondriale) \pm E.S. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Differenza significativa tra cellule esposte alle tossine con e senza pre-trattamento con gli inibitori o attivatori dei

trasportatori per il K^+ : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA a due vie e Bonferroni post-test).

In Figura 33 è riportata l'attività mitocondriale (% rispetto alle cellule di controllo non trattate) nelle cellule IHH pre-trattate con gli inibitori o attivatori dei canali K_{ATP} ed hERG ed esposte ad AZA1 (A), AZA2 (B) ed AZA3 (C) per 72 ore, in confronto a quella delle cellule esposte alle tossine senza pre-trattamento con gli inibitori o attivatori dei canali K_{ATP} ed hERG. La presenza degli inibitori o attivatori dei trasportatori di ioni K^+ non è stata in grado di influenzare l'aumentata attività mitocondriale provocata dall'esposizione agli AZAs per 72 ore. Dopo 72 ore di esposizione agli AZAs, non è stato possibile valutare l'effetto indotto dal pre-trattamento con ouabaina a causa dell'elevata citotossicità di questo glicoside (10 μ M).

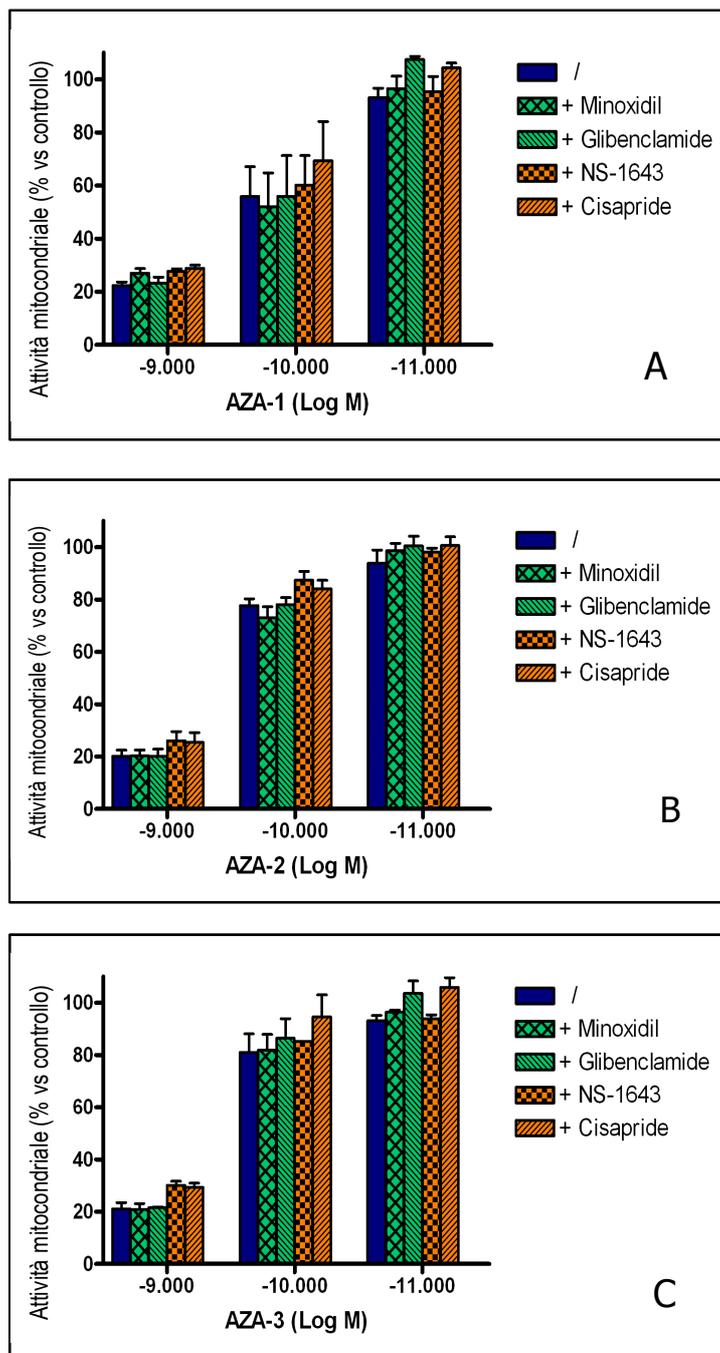


Figura 33. Effetto degli inibitori o attivatori dei trasportatori di ioni K^+ (K_{ATP} e hERG) sull'aumentata attività mitocondriale nelle cellule IHH esposte ad AZA1 (A), AZA2 (B) ed AZA3 (C) per 72 ore. Le cellule sono state esposte per 1 ora a glibenclamide (100 μ M), cisapride (5 μ M), minoxidil (100 μ M) o NS-1643 (30 μ M) e successivamente agli AZAs per 72 ore. L'attività mitocondriale è stata valutata mediante il test dell'MTT. I dati sono espressi come media dell'attività mitocondriale rispetto alle cellule di controllo non trattate (100% attività mitocondriale) \pm E.S. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Differenza significativa tra cellule

esposte alle tossine con e senza pre-trattamento con gli inibitori o attivatori dei trasportatori per il

K⁺: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 (ANOVA a due vie e Bonferroni post-test).

5. DISCUSSIONE

Gli azaspiracidi (AZAs) sono una famiglia di tossine marine lipofile, che comprende più di 30 analoghi prodotti da dinoflagellati dei generi *Azadinium* e *Amphidoma* o derivanti dalla biotrasformazione di alcuni AZAs di origine algale nei molluschi che li accumulano (Tillmann et al., 2009 e 2012; Furey et al., 2010). Queste tossine si accumulano in modo particolare i mitili, il cui consumo provoca un'intossicazione nell'uomo, nota come *Azaspiracid Shellfish Poisoning* (AZP) e caratterizzata da nausea, vomito, diarrea e forti crampi allo stomaco (Ofuji et al., 1999a). Dopo la loro scoperta, nel 1995, tali tossine sembravano essere limitate ai molluschi provenienti dall'Irlanda ma negli ultimi anni le alghe produttrici e gli AZAs sono stati rilevati in diverse aree geografiche (Tillmann et al., 2014).

Attualmente, solo tre analoghi (AZA1, AZA2 ed AZA3) sono regolamentati nell'Unione Europea, dove il massimo livello ammissibile nei molluschi è pari a 160 µg di equivalenti di AZA1 per kg di parti edibili. La concentrazione totale dei tre analoghi, espressa come equivalenti di AZA1/kg, viene calcolata in base alla letalità di AZA1-3 dopo somministrazione intraperitoneale nel topo (AZA2>AZA3>AZA1), da cui si sono derivati i relativi TEFs (*Toxic Equivalency Factors*) pari a 1.0, 1.8 e 1.4 per AZA1, 2 e 3, rispettivamente (EFSA, 2008; Twiner et al., 2012a). Tuttavia, poiché l'esposizione a queste tossine avviene per ingestione, i TEFs da utilizzare per calcolare la concentrazione degli AZAs nei molluschi dovrebbero essere ottenuti da studi comparativi di tossicità per via orale, finora mancanti.

Pertanto, il primo scopo di questa tesi è stato quello di condurre uno studio sulla tossicità acuta per via orale di AZA1, 2 e 3 nel topo in modo da derivare i relativi TEFs. Le tossine sono state somministrate a topi CD-1 femmina mediante *gavage*, rilevando la sintomatologia e la letalità fino a 24 ore (tempo del sacrificio) e fino a 14 giorni, in sottogruppi di topi sopravvissuti al trattamento. Entro 24 ore, si è osservata letalità a partire da 230 µg/kg di AZA1 (2/16 topi), 500 µg/kg di AZA2 (3/16 topi) e 650 µg/kg di AZA3 (1/16 topi), con delle DL₅₀ pari a 443 µg/kg, 626 µg/kg e 875 µg/kg, rispettivamente per AZA1, 2 e 3. Dai valori di DL₅₀, che hanno indicato una potenza tossica per via orale nell'ordine AZA1>AZA2>AZA3, sono stati derivati i valori di TEFs, pari a 1.0 (AZA1), 0.7 (AZA2) e 0.5 (AZA3), diversi da quelli precedentemente calcolati dopo somministrazione intraperitoneale (EFSA, 2008, Twiner et al., 2012a). Pertanto, questi valori di TEFs, ottenuti mediante uno studio comparativo di tossicità acuta per via orale impiegando tossine con lo stesso grado di purezza, possono essere proposti quali fattori di conversione da impiegare per determinare il contenuto in AZAs nei molluschi.

Nei topi trattati con ciascuna delle tossine si sono osservati: immobilità, tremori, respiro addominale, ipotermia e cianosi. Alla dose di 1100 µg/kg di AZA1 ed a dosi di AZA3 maggiori a 850 µg/kg, è stato osservato anche *jumping*, mentre nessun topo ha sviluppato diarrea, tipica delle

intossicazioni umane. I topi sopravvissuti al trattamento ed osservati per 14 giorni, non hanno invece mostrato altri sintomi di tossicità. L'analisi macroscopica ha rilevato alterazioni solo nei topi morti spontaneamente o in quelli sacrificati a 24 ore, riguardanti principalmente il fegato che, nei topi morti almeno 5 ore dopo il trattamento o sacrificati a 24 ore, era aumentato di peso (a partire dalle dosi di 135 µg/kg di AZA1, 300 µg/kg di AZA2 e 390 µg/kg di AZA3) ed appariva rigonfio e pallido (a partire dalle dosi di 175 µg/kg di AZA1, 500 µg/kg di AZA2 e 600 µg/kg di AZA3). Alle dosi letali, si è osservato un aumento di gas, fluido e materiale solido nello stomaco, talvolta associato ad un arrossamento della parete gastrica. Inoltre, è stato evidenziato un rigonfiamento dell'intestino tenue, associato ad arrossamento della parete intestinale e presenza di un materiale fluido sanguinolento nel lume intestinale. Le analisi ematochimiche, relative ai topi morti o sacrificati a 24 ore, hanno rilevato, per tutte e tre le tossine ed a tutte le dosi, un significativo aumento dei livelli sierici delle transaminasi e della glutammato deidrogenasi, indici di danno epatico. Inoltre, si sono rilevati aumentati livelli sierici dello ione potassio, a partire dalle dosi di 500 µg/kg. L'analisi istologica ha invece mostrato che i topi trattati con la dose più alta delle tossine presentavano i villi duodenali contratti ed appiattiti ed un assottigliamento della parete enterocitaria. Parallelamente, valutando la distribuzione degli AZAs negli organi e tessuti, è stato evidenziato che, a 24 ore, i massimi livelli di AZAs erano localizzati nello stomaco ed, in ordine decrescente, nel contenuto intestinale, fegato, intestino tenue, reni, polmoni, intestino crasso, cuore e cervello; dopo 14 giorni, invece, solo AZA1 ed AZA2 erano ancora rilevabili nei tessuti.

I risultati dello studio *in vivo*, pertanto, hanno evidenziato come il fegato sia uno dei bersagli di queste tossine, in accordo con le osservazioni di studi precedenti dopo somministrazione dell'AZA1 nel topo, sia per via orale sia per via intraperitoneale, ossia epatomegalia, accumulo di lipidi e formazione di vacuoli negli epatociti (Ito et al., 2000; Twiner et al., 2008a). In base a queste osservazioni a livello epatico, considerando che il meccanismo d'azione degli AZAs non è ancora stato definito, sono stati quindi studiati gli effetti delle tre tossine nei confronti degli epatociti *in vitro*. A tal fine sono state utilizzate due linee di cellule epatiche umane: la linea non tumorale IHH e la linea tumorale HepG2.

Dapprima gli effetti citotossici degli AZAs sono stati valutati tramite il test dell'MTT che valuta l'attività mitocondriale delle cellule. Le cellule della linea IHH sono state esposte a concentrazioni scalari delle tre tossine (1.0×10^{-7} - 5.08×10^{-12} M) per 24, 48 e 72 ore. È stato osservato un effetto citotossico concentrazione-dipendente solo dopo 72 ore di esposizione delle cellule alle tre tossine, con EC_{50} pari a 2.7×10^{-11} M, 7.0×10^{-11} M e 3.8×10^{-11} M per AZA1, 2 e 3, rispettivamente. A 48 ore, invece, non si è registrato alcun effetto citotossico, mentre a 24 ore è stato rilevato un incremento concentrazione-dipendente della vitalità cellulare. Questo incremento,

evidenziato per la prima volta, poteva essere correlato ad un'augmentata attività mitocondriale indotta dalle tossine e/o ad un'augmentata proliferazione cellulare (Eshiet et al., 2014; Hashmi et al., 2015; Kinnunen et al., 2014). Al fine di verificare esso fosse dovuto ad uno stimolo proliferativo, l'effetto delle tossine è stato valutato impiegando il test della sulforodamina B (SRB), che, valutando la densità cellulare, fornisce una misura indiretta del numero di cellule e quindi della loro proliferazione (Skehan et al., 1990). Le condizioni sperimentali erano le stesse di quelle usate per il test dell'MTT ma, impiegando il test della SRB, a 72 ore si è registrato un effetto anti-proliferativo concentrazione-dipendente, con valori di EC₅₀ pari a 2.3×10^{-11} M, 4.5×10^{-11} M e 2.1×10^{-11} M per AZA1, 2 e 3, rispettivamente. Anche a 48 ore si è registrato un effetto anti-proliferativo di minore entità, mentre a 24 ore non si è osservato alcun effetto. Queste osservazioni, pertanto, indicano che l'incremento di vitalità cellulare osservato con il test MTT non sia correlato ad uno stimolo proliferativo ma piuttosto ad un'augmentata attività a livello mitocondriale.

Per assicurarci che tali risultati non fossero legati a peculiarità della linea IHH, la stessa serie di esperimenti è stata effettuata sulla linea cellulare epatica HepG2, osservando gli stessi effetti, anche se queste cellule erano leggermente più sensibili agli AZAs rispetto alle cellule IHH. Dopo 72 ore di esposizione, infatti, l'attività mitocondriale delle cellule HepG2 (saggio dell'MTT) è stata ridotta con valori di EC₅₀ pari a 4.1×10^{-12} M (AZA1), 8.6×10^{-12} M (AZA2) e 4.3×10^{-12} M (AZA3), mentre la proliferazione cellulare (saggio della SRB) è stata diminuita con valori di EC₅₀ pari a 6.5×10^{-12} M, 2.5×10^{-11} M e 6.3×10^{-12} M per AZA1, AZA2 e AZA3, rispettivamente. In generale, questi valori risultano circa di un ordine di grandezza più bassi rispetto a quelli rilevati impiegando la linea IHH.

Questi dati, pertanto, supportano l'ipotesi che gli AZAs inducano, a livello epatico, un aumento del metabolismo nei mitocondri piuttosto che un aumento della proliferazione degli epatociti. Alla luce di tale ipotesi, è stato quindi valutato l'effetto degli AZAs a livello mitocondriale, studiando il ruolo dei complessi della catena di trasporto degli elettroni I, II, III, IV e dell'ATP-sintasi degli epatociti, mediante l'utilizzo di specifici inibitori. In particolare, le cellule sono state pre-esposte per un'ora all'inibitore del complesso I rotenone (concentrazione finale: 5 µM), del complesso II tenoiltrifluoroacetone (1 mM), del complesso III antimicina-A (20 µM), del complesso IV sodio azide (150 µM) e dell'ATP-sintasi oligomicina (1 µM), prima del trattamento con le tossine per 24 ore, seguito dal test dell'MTT. Sia nella linea IHH che nella linea HepG2, solo il rotenone ed il TTFA sono stati in grado di ridurre l'augmentata attività mitocondriale indotta dagli AZAs. Questo risultato ha quindi suggerito un significativo coinvolgimento dei complessi I e II della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale nell'azione degli AZAs, risultato supportato da uno studio di proteomica in cui è riportato un incremento dell'espressione di proteine coinvolte

nella fosforilazione ossidativa indotto da AZA1 su cellule neuronali, tra cui la NADH-deidrogenasi (Kellmann et al., 2009). Inoltre, questi dati sono in accordo con l'aumento di sintesi dell'ATP osservato nelle cellule di neuroblastoma SH-SY5Y a partire da 6 ore d'esposizione ad AZA1 (Kellmann et al., 2009).

Poiché la corretta funzionalità mitocondriale è strettamente legata ad un corretto equilibrio protonico, è stato quindi verificato se l'aumentata attività mitocondriale indotta dagli AZAs potesse dipendere da una variazione nella permeabilità della membrana mitocondriale agli ioni H^+ . A tal fine, le cellule sono state pre-incubate per un'ora con lo ionoforo nigericina, che scambia ioni H^+ con gli ioni K^+ a livello delle membrane mitocondriali, per verificare se essa influenzasse gli effetti degli AZAs. Tale effetto è stato valutato impiegando la linea IHH, più sensibile agli AZAs rispetto alla linea HepG2. Il test dell'MTT ha rivelato che la nigericina determinava una significativa riduzione dell'aumentata attività mitocondriale indotta dagli AZAs. Siccome la funzionalità della NADH reduttasi dipende dalla differenza di pH attraverso le membrane mitocondriali (Lambert e Brand, 2004), questo risultato induce ad ipotizzare un'alterata funzionalità del complesso I piuttosto che un'aumentata espressione proteica di questo complesso.

Gli equilibri protonici attraverso la membrana mitocondriale sono strettamente controllati e controbilanciati da un corretto equilibrio di vari ioni, mantenuto da una vasta serie di specifici canali e trasportatori (Bernardi, 1999; Garlid e Paucek, 2003). Si è quindi pensato di valutare il ruolo di alcuni ioni, quali Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- e K^+ , sugli effetti mediati dagli AZAs a livello mitocondriale. A tal scopo, le cellule IHH sono state incubate in particolari terreni di coltura *ion-free*, privi di questi ioni, in presenza dei tre AZAs per 24 ore; gli effetti sono stati quindi valutati mediante il test dell'MTT. L'incubazione delle cellule in terreni privi di ioni Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- , ha rivelato che gli effetti degli AZAs a 24 ore erano influenzati dall'assenza di ioni Na^+ , Cl^- e, soprattutto, K^+ . In particolare, in terreno K^+ -free, l'aumentata attività mitocondriale indotta da AZA1, AZA2 e AZA3 è stata ridotta in modo significativo a partire da concentrazioni pari a 1.4×10^{-10} M (AZA1), 1.5×10^{-11} M (AZA2) e 4.6×10^{-11} M (AZA3). Al contrario, in presenza di terreno Ca^{2+} -free non sono stati osservati effetti significativi.

Poiché l'assenza di ioni K^+ è risultata quella che maggiormente influenzava gli effetti delle tossine, è stato valutato il ruolo di particolari trasportatori per gli ioni K^+ maggiormente espressi a livello degli epatociti (canali K_{ATP} ed hERG e la pompa Na^+/K^+ -ATPasi, Higdon et al., 2014) nella modulazione degli effetti degli AZAs. Le cellule IHH sono state pre-trattate per un'ora con inibitori ed attivatori dei canali o trasportatori, quali l'inibitore del canale K_{ATP} glibenclamide, l'inibitore del canale hERG cisapride, l'attivatore del canale K_{ATP} minoxidil, l'attivatore del canale hERG NS-1643 e l'inibitore della Na^+/K^+ -ATPasi ouabaina. Solo gli inibitori glibenclamide, cisapride e

ouabaina hanno ridotto in maniera significativa l'aumentata attività mitocondriale indotta da 24 ore di esposizione agli AZAs, mentre gli attivatori non hanno determinato alcun effetto significativo. Ciò ci ha indotto a supporre che gli AZAs possano funzionare da attivatori dei canali K_{ATP} e hERG. L'ipotesi di un effetto sui canali hERG è supportato da dati di letteratura, in cui si è ipotizzato che gli AZAs blocchino i canali hERG in uno stato aperto (Twiner et al., 2012c). Tuttavia, considerando che dopo 72 ore di esposizione agli AZAs, gli inibitori di questi canali sono risultati inefficaci nel ridurre gli effetti delle tre tossine, si può ipotizzare che l'apertura del canale K_{ATP} , hERG e l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi siano solo marginalmente coinvolti negli effetti degli AZAs ed in maniera più significativa solo nelle fasi iniziali di alterazione della funzionalità mitocondriale. Inoltre, essendo tutti e tre i trasportatori regolati dai livelli di ATP intracellulare e considerando l'abilità di AZA1 di aumentarli dopo 24 ore di esposizione (Kellmann et al., 2009), si può ipotizzare che la loro apertura sia un evento secondario agli effetti osservati sull'ATP.

In conclusione, i risultati di questo studio hanno fornito per la prima volta dei dati comparativi sulla tossicità acuta per via orale nel topo di AZA1, 2 e 3, utili per definire la potenza tossica dopo esposizione orale e derivare i rispettivi TEFs. Inoltre, essi hanno permesso di fornire le basi molecolari per ipotizzare un meccanismo di danno mitocondriale indotto dagli AZAs a livello epatico, che sembra essere strettamente correlato a squilibri ionici, in particolare a carico del K^+ , in cui appaiono coinvolti alcuni trasportatori, quali K_{ATP} , hERG e la pompa Na^+/K^+ -ATPasi. Tuttavia, resta da definire se questo effetto possa ritenersi un possibile meccanismo d'azione generale di queste tossine, oppure se esso sia limitato a livello epatico. Esperimenti sono tuttora in corso per valutare il loro ruolo su altri modelli cellulari, focalizzandosi anche sul coinvolgimento dei trasportatori di altri ioni nel meccanismo d'azione di tali tossine.

BIBLIOGRAFIA

- **Aasen, J. A., Espenes, A., Hess, P., and Aune, T. 2010.** Sub-lethal dosing of azaspiracid-1 in female NMRI mice. *Toxicon* 56, 1419–1425.
- **Aasen, J. A., Espenes, A., Miles, C. O., Samdal, I. A., Hess, P., Aune, T., 2011.** Combined oral toxicity of azaspiracid-1 and yessotoxin in female NMRI mice. *Toxicon* 57, 909-917.
- **Alfonso, A., Roman, Y., Vieytes, M. R., Ofugi, K., Satake, M., Yasumoto, T., Botana, L. M., 2005.** Azaspiracid-4 inhibits Ca²⁺ entry by stored operated channels in human T lymphocytes. *Biochemical Pharmacology* 69, 1627–1636.
- **Alfonso, A., Vieytes, M. R., Ofuji, K., Satake, M., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Botana, L. M., 2006.** Azaspiracids modulate intracellular pH levels in human lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346, 1091-1099.
- **Anon, 2011.** *Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance*, 4th edn. Washington, DC: Department of Health and Human Services, Public Health Service, US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 468p.
- **Aune, T. 2009.** Oral toxicity of mixtures of lipophilic marine algal toxins in mice. In: Lassus, P. (ed.) *7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*, Nantes, France, June 14–19, 2009. Versailles, France: Quae Publishing.
- **Aune, T., Espenes, A., Aasen, J. A. B., Quilliam, M. A., Hess, P., Larsen, S., 2012.** Study of possible combined toxic effects of azaspiracid-1 and okadaic acid in mice via the oral route. *Toxicon* 60, 895-906.
- **Bellocci, M., Sala, G. L., Callegari, F., Rossini, G. P., 2010.** Azaspiracid-1 inhibits endocytosis of plasma membrane proteins in epithelial cells. *Toxicological Sciences* 117, 109-121.
- **Bernardi P., 1999.** Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* 1999; 79:1127–1155.
- **Blay, P.K.S., Brombacher, S., Volmer, D.A., 2003.** Studies on azaspiracid biotoxins. III. Instrumental validation for rapid quantification of AZA 1 in complex biological matrices. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17, 2153–2159.

- **Brana Magdalena, A., Lehane, M., Krysz, S., Fernandez, M. L., Furey, A., James, K. J., 2003.** The first identification of azaspiracids in shellfish from France and Spain. *Toxicon*, 42, 105-108.
- **Cao, Z., Lepage, K. T., Frederick, M. O., Nicolaou, K. C., and Murray, T. F., 2010.** Involvement of caspase activation in azaspiracid-induced neurotoxicity in neocortical neurons. *Toxicol. Sci.* 114, 323–334.
- **De Schrijver, K., Maes, I., De Man, L., Michelet, J., 2002.** An outbreak of diarrhoeic shellfish poisoning in Antwerp, Belgium. *Eurosurveillance Monthly* 7, 138-141.
- **Draisci, R., Palleschi, L., Ferretti, E., Furey, A., James, K.J., Satake, M., Yasumoto, T., 2000.** Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification of azaspiracid in shellfish. *Journal of Chromatography* 871, 13–21.
- **EFSA, 2008a.** Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – azaspiracids. *The EFSA Journal* 723, 1–52.
- **EFSA, 2008b.** Marine biotoxins in shellfish—Yessotoxin group: Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA J.* 907, 1–62.
- **EFSA, 2009a.** Marine biotoxins in shellfish—Pectenotoxin group: Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA J.* 1109, 1–47.
- **EFSA, 2009b.** Marine biotoxins in shellfish—summary on regulated marine biotoxins. Scientific opinion on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal* 1–23.
- **Eshiet, E.R., Zhu, J., Smith, E.E., 2014.** Lyophilized tea extracts of *Brickellia cavanillesii* (Asteraceae): in vitro characterization of biological activity. *J. Food Sci.* 79(7): T1454-61.
- **FAO, 2004.** Marine biotoxins. *FAO Food and Nutrition Paper* 80.
- **FAO/IOC/WHO, 2004.** Report of the Joint FAO/IOC/WHO Ad Hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs, September 26–30, 2004. Available from: http://www.fao.org/ag/agn/food/risk_biotoxin_en.stm Oslo, Norway.
- **Finney, D. J., 1971.** *Probit Analysis*, 3rd ed., Cambridge University Press, 32 E. 57th St., New York, Ny 10022.

- **Flanagan, A. F., Callanan, K. R., Donlon, J., Palmer, R., Forde, A., Kane, M., 2001.** A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins. *Toxicon* 39, 1021-1027.
- **Forsyth, C. J., Xu, J. Y., Nguyen, S. T. et al., 2006.** Antibodies with broad specificity to azaspiracids by use of synthetic haptens. *Journal of the American Chemical Society* 128, 15114–15116.
- **FSAI, 2001.** Risk Assessment of Azaspiracids (AZAs) in Shellfish. Food Safety Authority of Ireland.
- **FSAI, 2006.** Risk assessment of azaspiracids in shellfish. A report of the Scientific Committee of the food safety authority of Ireland.
- **Furey, A., Braña-Magdalena, A., Lehane, M., Moroney, C., James, K. J., Satake, M., Yasumoto, T., 2002.** Determination of azaspiracids in shellfish using liquid chromatography–tandem electro spray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16, 238–242.
- **Furey, A., Moroney, C., Braña Magdalena, A., Saez, M. J. F., Lehane, M., James, K. J., 2003.** Geographical, temporal, and species variation of the polyether toxins, azaspiracids, in shellfish. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3078-3084.
- **Furey, A., O’Doherty, S., O’Callaghan, K., Lehane, M., James, K. J., 2010.** Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: toxicological and health considerations. *Toxicon* 56, 173–190.
- **Garlid, K. D., Paucek, P., 2003.** Mitochondrial potassium transport: the K⁺ cycle. *Biochimica et Biophysica Acta* 1606: 23-41.
- **Gerssen, A., Mulder, P. P. J., McElhinney, M. A., and de Boer, J., 2009.** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. *Journal of Chromatography A* 1216, 1421–1430.
- **Hashmi, M.Z., Khan, K.Y., Hu, J., Naveedullah, Su, X., Abbas, G., Yu, C., Shen, C., 2015.** Hormetic effects of noncoplanar PCB exposed to human lung fibroblast cells (HELFL) and possible role of oxidative stress. *Environ. Toxicol.* 30(12): 1385-92.

- **Hess, P., Nguyen, L., Aasen, J., Keogh, M., Kilcoyne, J., McCarron, P., Aune, T., 2005.** Tissue distribution, effects of cooking and parameters affecting the extraction of azaspiracids from mussels, *Mytilus edulis*, prior to analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Toxicon* 46, 62-71.
- **Hess, P., McCarron, P., Rehmann, N. et al., 2007.** Isolation and purification of AZAs from naturally contaminated materials, and evaluation of their toxicological effects (ASTOX). *Marine Institute, Galway, Ireland, Marine Environment & Health Series Report 28*, 128p.
- **Hess, P., Butter, T., Petersen, A., Silke, J., McMohan, T., 2009.** Performance of the EU-harmonised mouse bioassay for lipophilic toxins for the detection of azaspiracids in naturally contaminated mussel (*Mytilus edulis*) hepatopancreas tissue homogenates characterised by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Toxicon* 53,713–722.
- **Hess, P., McCarron, P., Krock, B., Kilcoyne, J. and Miles C. O., 2014.** Azaspiracids: Chemistry, Biosynthesis, Metabolism, and Detection. L. Botana (editor), *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology, and Detection*. Third Edition, Boca Raton, Taylor & Francis, 1215 p. ISBN: 978-1-4665-0514-8 . doi: 10.1201/b16662-31
- **Higdon, R., Stewart, E., Stanberry, L., Haynes, W., Choiniere, J., Montague, E., Anderson, N., Yandl, G., Janko, I., Broomall, W., Fishilevich, S., Lancet, D., Kolker, N: e Kolker, E., 2014.** MOPED Enables Discoveries through Consistently Processed Proteomics Data. *J Proteome Res.* 13:107-113.
- **Ito, E., Terao, K., McMahan, T., Silke, J., Yasumoto, T., 1998.** Acute pathological changes in mice caused by crude extracts of novel toxins isolated from Irish mussels. In *Harmful Algae*, Reguera, B.; Blanco, J.; Fernandez, M. L.; Wyatt, T., Eds. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: 1998, 588-589.
- **Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Kurita, N., McMahan, T., James, K., Yasumoto, T., 2000.** Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon* 38, 917-930.
- **Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Higashi, M., Harigaya, K., McMahan, T., Yasumoto, T., 2002.** Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon* 40, 193-203.

- **Ito, E., Frederick, M. O., Koftis, T. V., Tang, W., Petrovic, G., Ling, T., Nicolaou, K. C., 2006.** Structure toxicity relationships of synthetic azaspiracid-1 and analogs in mice. *Harmful Algae* 5, 586-591.
- **Kellmann, R., Schaffner, C. A., Gronset, T. A., Satake, M., Ziegler, M., and Fladmark, K. E., 2009.** Proteomic response of human neuroblastoma cells to azaspiracid-1. *J. Proteomics* 72, 695-707.
- **Kilcoyne, J., Keogh, A., Clancy, G., Leblanc, P., Burton, I., Quilliam, M.A., Hess, P., Miles, C.O, 2012.** Improved isolation procedure for azaspiracids from shellfish, structural elucidation of azaspiracid-6, and stability studies. *J. Agric. Food. Chem.* 60:2447–2455.
- **Kinnunen, K., Kauppinen, A., Piippo, N., Koistinen, A., Toropainen, E., Kaarniranta, K., 2014.** Cationorm shows good tolerability on human HCE-2 corneal epithelial cell cultures. *Exp. Eye. Res.* 120: 82-9.
- **Krock, B., Tillmann, U., John, U., and Cembella, A. D., 2009.** Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae* 8, 254–263.
- **James, K.J., Furey, A., Lehane, M., Moroney, C., Satake, M., Yasumoto, T., 2001.** LC-MS methods for the investigation of a new shellfish toxic syndrome–Azaspiracid Poisoning (AZP). *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Century* pp. 401–408.
- **James, K. J., Furey, A., Lehane, M., Ramstad, H., Aune, T., Hovgaard, P., Morris, S., Higman, W., Satake, M., Yasumoto, T., 2002a.** First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon* 40, 909-915.
- **James, K.J., Sierra, M.D., Lehane, M., Magdalena, A.B., Furey, A., 2003a.** Detection of five new hydroxyl analogues of azaspiracids in shellfish using multiple tandem mass spectrometry. *Toxicon* 41, 277–283.
- **James, K. J., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M., Furey, A., 2003b.** Ubiquitous ‘benign’ alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon* 41, 145–151.
- **Jauffrais, T., Kilcoyne, J., Séchet, V., Herrenknecht, C., Truquet, P., Hervé, F., Bérard, J. B., Nulty, C., Taylor, S., Tillmann, U., Miles, C. O., Hess, P., 2012a.** Production and

Isolation of Azaspiracid-1 and -2 from *Azadinium spinosum* Culture in Pilot Scale Photobioreactors. *Marine drugs* 10, 1360-1382.

- **Jauffrais, T., Marcaillou, C., Herrenknecht, C., Truquet, P., Séchet, V., Nicolau, E., Tillmann, U., Hess, P., 2012b.** Azaspiracid accumulation, detoxification and biotransformation in blue mussels (*Mytilus edulis*) experimentally fed *Azadinium spinosum*. *Toxicon* 60, 582-595.
- **Jauffrais, T., Herrenknecht, C., Sechet, V. et al., 2012c.** Quantitative analysis of azaspiracids in *Azadinium spinosum* cultures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 833–846.
- **Lehane, M., Brana-Magdalena, A., Moroney, C., Furey, A., James, K.J., 2002.** Liquid chromatography with electrospray ion trap mass spectrometry for the determination of five azaspiracids in shellfish. *Journal of Chromatography A* 950, 139–147.
- **Lopez-Rivera, A., O’Callaghan, K., Moriarty, M., O’Driscoll, D., Hamilton, B., Lehane, M., James, K. J., Furey, A., 2010.** First evidence of azaspiracids (AZAs): A family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) collected in two regions of Chile. *Toxicon* 55, 692-701.
- **McCarron, P., Giddings, S. D., Miles, C. O., and Quilliam, M. A., 2011.** Derivatization of azaspiracid biotoxins for analysis by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1218, 8089–8096.
- **McMahon, T., Silke, J., 1996.** West coast of Ireland; winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News* 14, 2.
- **McMahon, T., Silke, J., 1998.** Re-occurrence of winter toxicity. *Harmful Algae News* 17, 12-16.
- **McCarron, P., Kotterman, M., De Boer, J., Rehmann, N., Hess, P., 2007.** Feasibility of gamma irradiation as a stabilisation technique in the preparation of tissue reference materials for a range of shellfish toxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 2487-2493.
- **McCarron, P., Kilcoyne, J., Miles, C. O., Hess, P., 2009.** Formation of azaspiracids-3,-4,-6, and-9 via decarboxylation of carboxyazaspiracid metabolites from shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 160-169.

- **McCarron, P., Giddings, S., and Quilliam, M., 2011.** A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 2: Liquid chromatography–mass spectrometry, sample extraction and quantitation procedures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400, 835–846.
- **Nicolaou, K. C., Koftis, T. V., Vyskocil, S., Petrovic, G., Tang, W., Frederick, M. O., Chen, D. Y. K., Yiwei, L.; Ling, T., Yamada, T. M. A., 2004a.** Total synthesis and structural elucidation of azaspiracid-1. Final assignment and total synthesis of the correct structure of azaspiracid-1. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2859-2872.
- **Nicolaou, K. C., Vyskocil, S., Koftis, T. V., Yamada, T. M. A., Ling, T., Chen, D. Y. K., Tang, W., Petrovic, G., Frederick, M. O., Yiwei, L., Satake, M., 2004b.** Structural revision and total synthesis of azaspiracid-1, part 1: Intelligence gathering and tentative proposal. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 4312-4318.
- **Nicolaou, K. C., Koftis, T. V., Vyskocil, S., Petrovic, G., Ling, T., Yamada, T. M. A., Tang, W., Frederick, M. O., 2004c.** Structural revision and total synthesis of azaspiracid-1, part 2: Definition of the ABCD domain and total synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 4318-4324.
- **Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Petrovic, G., Cole, K. P., Loizidou, E., 2006.** Total synthesis and confirmation of the revised structures of azaspiracid-2 and azaspiracid-3. *Angewandte Chemie-International Edition* 45, 2609–2615.
- **Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., Silke, J., James, K. J., Naoki, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1999a.** Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Natural toxins* 7, 99-102.
- **Ofuji, K., Satake, M., Oshima, Y., McMahon, T., James, K. J., Yasumoto, T., 1999b.** A sensitive and specific determination method for azaspiracids by liquid chromatography mass spectrometry. *Natural toxins* 7, 247-250.
- **Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., James, K. J., Naoki, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., 2001.** Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 740-742.
- **Percopo, I., Siano, R., Rossi, R., Soprano, V., Sarno, D., Zingone A., 2012.** *Azadinium dexteroporum* sp. nov., a new species producing azaspiracids from the Mediterranean Sea. *Riunione annuale del Gruppo Algologia, Società Botanica Italiana*, 24.

- **Pizarro, T. T., Arseneau, K. O., Bamias, G., Cominelli, F., 2003.** Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol. Med.* 9, 218-222.
- **Quilliam, M.A., Hess, P., Dell'Aversano, C., 2001.** Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography–mass spectrometry. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Century* pp. 383–391.
- **Rehmann, N., Hess, P., Quilliam, M. A., 2008.** Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels *Mytilus edulis* by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 549–558.
- **Roman, Y., Alfonso, A., Louzao, M. C., de la Rosa, L. A., Leira, F., Vieites, J. M., Vieytes, M. R., Ofuji, K., Satake, M., Yasumoto, T., Botana, L. M., 2002.** Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets. *Cellular Signalling* 14, 703-716.
- **Roman, Y., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Ofuji, K., Satake, M., Yasumoto, T., Botana, L. M., 2004.** Effects of azaspiracids 2 and 3 on intracellular cAMP, [Ca²⁺], and pH. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1338-1349.
- **Ronzitti, G., Hess, P., Rehmann, N., Rossini, G. P., 2007.** Azaspiracid-1 alters the E-cadherin pool in epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 95, 427 – 435.
- **Sala, G. L., Bellocci, M., Callegari, F., Rossini, G. P., 2013.** Azaspiracid-1 Inhibits the Maturation of Cathepsin D in Mammalian Cells. *Chemical research in toxicology* 26, 444-455.
- **Samdal, I.A., Løvberg, K.E., Briggs, L.R., Kilcoyne, J., Xu, J., Forsyth, C.J., Miles, C.O. 2015.** Development of an ELISA for the Detection of Azaspiracids. *J Agric Food Chem.* 9, 63(35).
- **Satake, M., Ofuji, K., James, K. J., Furey, A., Yasumoto, T., 1998a.** New toxic event caused by Irish mussels. In *Harmful Algae*, Reguera, B.; Blanco, J.; Fernandez, M. L.; Wyatt, T., Eds. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: 1998, 468-469.
- **Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K. J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T., 1998b.** Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *Journal of the American Chemical Society* 120, 9967–9968.

- **Schippers, I. J., Moshage, H., Roelofsen, H., Müller, M., Heymans, H. S., Ruiters, M., Kuipers, F., 1997.** Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-) differentiation. *J. Cell. Biol. Toxicol.* 13, 375-386.
- **Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R., 1990.** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107-1112.
- **Taleb, H., Vale, P., Amanhir, R.; Benhadouch, A.; Sagou, R.; Chafik, A., 2006.** First detection of azaspiracids in mussels in North West Africa. *Journal of Shellfisheries Research* 25, 1067-1070.
- **Tillman, U., Elbrachter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A., 2009.** *Azadinium Spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology* 44, 63–79.
- **Tillmann, U., Salas, R., Gottschling, M., Krock, B., O’ Driscoll, D., and Elbrachter, M., 2012.** *Amphidoma languida* sp. nov. (Dinophyceae) reveals a close relationship between *Amphidoma* and *Azadinium*. *Protist* 163, 701-719.
- **Tillmann, U. , Salas, R. , Jauffrais, T. , Hess, P. and Silke, J., 2014.** AZA: The Producing Organisms—Biology and Trophic Transfer. L. Botana (editor), *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology, and Detection*. Third Edition, Boca Raton, Taylor & Francis, 1215 p. ISBN: 978-1-4665-0514-8 . doi: 10.1201/b16662-31
- **Trainer, V. L., Moore, L., Bill, B. D., Adams, N. G., Harrington, N., Borchert, J., da Silva, D. A. M., Eberhart, B. L., 2013.** Diarrhetic shellfish toxins and other lipophilic toxins of human health concern in Washington State. *Marine Drugs* 11, 1815-1835.
- **Torgersen, T., Bremnes, N. B., Rundberget, T., Aune, T., 2008.** Structural confirmation and occurrence of azaspiracids in Scandinavian brown crabs (*Cancer pagurus*). *Toxicon* 51, 93–101.
- **Trainer, V. L., Moore, L., Bill, B. D., Adams, N. G., Harrington, N., Borchert, J., da Silva, D. A. M., Eberhart, B. L., 2013.** Diarrhetic shellfish toxins and other lipophilic toxins of human health concern in Washington State. *Marine Drugs* 11, 1815-1835.

- **Twiner, M. J., Hess, P., Bottein Dechraoui, M. Y., McMahon, T., Samons, M. S., Satake, M., Yasumoto, T., Ramsdell, J. S., Doucette, G.J., 2005.** Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. *Toxicon* 45, 891 – 900.
- **Twiner, M. J., Rehmann, N., Hess, P., Doucette, G. J., 2008a.** Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an Emphasis on Human Health Impacts. *Marine Drugs* 6, 39-72.
- **Twiner, M. J., Ryan, J. C., Morey, J. S., Smith, K. J., Hammad, S. M., Van Dolah, F. M., Hess, P., McMahon, T., Satake, M., Yasumoto, T., Doucette, G.J., 2008b.** Transcriptional profiling and inhibition of cholesterol biosynthesis in human lymphocyte T cells by the marine toxin azaspiracid. *Genomics* 91, 289-300.
- **Twiner, M. J., El-Ladki, R., Kilcoyne, J., Doucette, G. J., 2012a.** Comparative effects of the marine algal toxins azaspiracid -1, -2 and -3 on Jurkat T lymphocyte cells. *Chemical Research in Toxicology* 25, 747-754
- **Twiner, M. J., Hanagriff, J. C., Butler, S. C., Madhkoor, A. K., and Doucette, G. J., 2012b.** Induction of apoptosis pathways in several cell lines following exposure to the marine algal toxin azaspiracid-1. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1493–1501.
- **Twiner, M. J., Doucette, G. J., Rasky, A., Huang, X. P., Roth, B. L., Sanguinetti, M. C., 2012c.** Marine algal toxin azaspiracid is an open-state blocker of hERG potassium channels. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1975-1984.
- **Twiner, M. J., Hess, P. and Doucette, G. J., 2014.** Azaspiracids: Toxicology, Pharmacology, and Risk Assessment. L. Botana (editor) , *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology, and Detection*. Third Edition, Boca Raton, Taylor & Francis, 1215 p. ISBN: 978-1-4665-0514-8 . doi: 10.1201/b16662-31
- **Ueoka, R., Ito, A., Izumikawa, M., Maeda, S., Takagi, M., Shin-ya, K., Yoshida, M., van Soest, R. W. M., Matsunaga, S., 2009.** Isolation of azaspiracid-2 from a marine sponge *Echinoclathria* sp. as a potent cytotoxin. *Toxicon* 53, 680-684.
- **Vale, C., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Gomez-Limia, B., Alfonso, A., Vieytes, M. R., and Botana, L. M., 2007.** Effects of azaspiracid-1, a potent cytotoxic agent, on primary neuronal cultures. A structure-activity relationship study. *J. Med. Chem.* 50, 356-363.

- **Vale, C., Wandscheer, C., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Alfonso, C., Vieytes, M. R., Botana, L. M., 2008.** Cytotoxic effect of azaspiracid-2 and azaspiracid-2-methyl ester in culture neurons: Involvement of the c-Jun-N-terminal kinase. *Journal of Neuroscience Research* 86, 2952–2962.
- **Vale, C., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Vieytes, M. R., Botana, L. M., 2009.** Cell volume decrease as a link between azaspiracid-induced cytotoxicity and c-Jun-N-terminal kinase activation in cultured neurons. *Toxicol. Sci.* 113, 158-168.
- **Vale, C., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Vieytes, M. R., and Botana, L. M., 2010.** Cell volume decrease as a link between azaspiracid-induced cytotoxicity and c-Jun-N-terminal kinase activation in cultured neurons. *Toxicol. Sci.* 113, 158–168.
- **Vilariño, N., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Cagide, E., Ares, I. R., Louzao, M. C. et al., 2006.** Cell growth inhibition and actin cytoskeleton disorganization induced by azaspiracid-1 structure-activity studies. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1459–1466.
- **Vilariño, N., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Vieytes, M. R., Botana, L. M., 2007.** Irreversible cytoskeletal disarrangement is independent of caspase activation during *in vitro* azaspiracid toxicity in human neuroblastoma cells. *Biochemical pharmacology* 74, 327-335.
- **Vilariño, N., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., Cagide, E., Alfonso, C., Alonso, E., Vieytes, M. R., Botana, L. M., 2008.** Azaspiracid substituent at C1 is relevant to *in vitro* toxicity. *Chemical research in toxicology* 21, 1823-1831.
- **Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G.K., Clardy, J., 1984.** Diarrhetic shellfish poisoning. In: *Seafood Toxins*. American Chemical Society, Washington, DC.
- **Yasumoto, T., 2001.** The chemistry and biological function of natural marine toxins. *The Chemical Record* 1, 228-242.