

Effetti *in vitro* degli azaspiracidi su cellule epatiche

M. Pelin¹, S. Sosa¹, V. Brovedani¹, J. Kilcoyne², C. Nulty², P. Hess³, A. Tubaro¹

¹ Dip. di Scienze della Vita, Università di Trieste, Trieste, Italia

² Marine Institute, Rinville, Oranmore, Co. Galway, Ireland

³ IFREMER, Laboratoire Phycotoxines, Nantes, France

Gli azaspiracidi (AZA) sono delle tossine polieteree marine prodotte dal dinoflagellato *Azadinium spinosum* che possono essere accumulate in molluschi bivalvi eduli. Nell'uomo, l'ingestione di molluschi contaminati da questi composti può causare un'intossicazione alimentare nota come Azaspiracid Shellfish Poisoning, caratterizzata da intensi sintomi gastrointestinali. Gli AZA comprendono più di 30 analoghi, ma solo AZA-1, -2 e -3 sono regolati da una normativa dell'Unione Europea. Studi di tossicità acuta dopo somministrazione orale di questi composti nel topo hanno evidenziato danni intestinali ed epatici, questi ultimi rilevabili anche all'esame necroscopico da un marcato gonfiore del fegato, di colore chiaro. Inoltre, a seguito della somministrazione orale di AZA-1 nel topo, gli epatociti presentavano accumuli lipidici, riscontrando anche la presenza di vacuoli nella parte centro-lobulare e sotto-capsulare del fegato. Tuttavia, il meccanismo alla base degli effetti tossici degli AZA a livello epatico è tuttora ignoto.

Al fine di studiare gli effetti di AZA-1, -2 e -3 a livello epatico e fornire le basi per ipotizzare il loro meccanismo d'azione, è stato condotto uno studio *in vitro* utilizzando due linee di cellule epatiche umane, la linea non tumorale IHH e la linea tumorale HepG2. A livello delle cellule IHH, AZA-1, -2 e -3 hanno indotto una riduzione concentrazione-dipendente dell'attività mitocondriale (saggio dell'MTT) solo dopo 72h di esposizione ($EC_{50} = 1.2 \times 10^{-11}$ M, 7.0×10^{-11} M e 3.8×10^{-11} M, rispettivamente). L'effetto delle tossine è risultato pressochè non rilevabile a 48h, mentre un significativo aumento concentrazione-dipendente dell'attività mitocondriale è stata osservata dopo 24 ore di esposizione. L'effetto a 24h non sembra però essere dovuto ad un'augmentata proliferazione cellulare, come dimostrato valutando la massa cellulare (saggio della sulforodamina B, SRB). Tale saggio, infatti, non ha evidenziato alcun effetto dopo 24h di esposizione, mentre l'esposizione per 72h ad AZA-1, -2 e -3 ha ridotto la proliferazione cellulare con valori di EC_{50} pari a 1.3×10^{-11} M, 4.5×10^{-11} M e 2.1×10^{-11} M, rispettivamente. Questi effetti sono stati confermati nelle cellule HepG2, risultate leggermente più sensibili agli AZA rispetto alle cellule IHH: dopo 72h di esposizione, l'attività mitocondriale delle cellule HepG2 (saggio dell'MTT) è stata ridotta con valori di EC_{50} di 4.1×10^{-12} M (AZA-1), 8.6×10^{-12} M (AZA-2) e 4.3×10^{-12} M (AZA-3), mentre la proliferazione cellulare (saggio della SRB) è stata diminuita con valori di EC_{50} di 6.5×10^{-12} M, 2.5×10^{-11} M e 6.3×10^{-12} M, rispettivamente. Questi risultati suggeriscono che un'esposizione agli AZA per 24h possa indurre una stimolazione del metabolismo a livello mitocondriale in entrambe le linee cellulari piuttosto che un effetto proliferativo. Questo effetto sembra essere dovuto ad un'alterata funzionalità della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale poiché il rotenone (inibitore del complesso I della catena di trasporto degli elettroni) e soprattutto il tenoil-trifluoroacetone (inibitore del complesso II) sono stati in grado di abolire gli effetti degli AZA a 24 h, osservati mediante il saggio dell'MTT. Questi risultati, pertanto, forniscono le basi per ulteriori studi volti ad identificare il meccanismo d'azione degli azaspiracidi a livello epatico.