

A2. PROFILO TOSSICOLOGICO DELLE CIANOTOSSINE

Emanuela Testai*, Franca M. Buratti

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**emanuela.testai@iss.it*

A2.1. Introduzione

A causa dell'aumento del carico di nutrienti in corpi idrici superficiali associati ad attività agricole e ad altre attività antropiche, così come ad eventi estremi come siccità, alluvioni o aumenti di temperatura legati a cambiamenti climatici, i cianobatteri hanno trovato condizioni favorevoli alla loro crescita fino a densità tanto elevate da formare fioriture e schiume. La presenza di fioriture di cianobatteri in corpi idrici superficiali utilizzati sia per attività ricreative che come fonte di acque da destinare all'uso umano possono rappresentare un rischio per la salute della popolazione esposta, a causa della produzione di tossine cianobatteriche, prodotte come metaboliti secondari.

Le cianotossine possono essere raggruppate in base alla loro struttura chimica in tre gruppi principali: i) eptapeptidi ciclici come le microcistine (MC), le nodularine (NOD) e la cilindrospermopsina (CYN); ii) alcaloidi come le anatoxine e le saxitossine e iii) tossine lipopolisaccaridiche (LPS).

Alternativamente sono raggruppate a seconda degli effetti che producono in:

- epatotossine (più di 100 MC, circa 9 NOD);
- citotossine (CYN);
- neurotossine (anatoxine e saxitossine; β -N-metilamino-L-alanina, BMAA);
- tossine irritative (LPS).

Le cianotossine descritte finora rappresentano molto probabilmente solo una piccola percentuale delle possibili tossine prodotte dai cianobatteri, che sintetizzano anche altri metaboliti secondari non ancora ben caratterizzati relativamente al loro profilo tossicologico. I cianobatteri infatti possono produrre un numero elevato di altri peptidi bioattivi, incluse microviridine, microginine e ciano-peptolidi, ma poco si sa sulla loro funzione, sulla presenza nell'ambiente e sull'impatto sulla salute umana e ambientale (1). Ciascuna cianotossina può essere prodotta da più di una specie, così come una stessa specie/ceppo può sintetizzare tossine diverse (per dettagli su questo aspetto *vedi* paragrafo A7.2).

La popolazione può essere esposta alle cianotossine i) durante attività ricreative e professionali (es. pescatori, sportivi professionisti), ii) in seguito all'uso potabile delle acque contaminate e altri usi umani (uso delle acque nella produzione alimentare, nelle procedure di dialisi, ecc.), iii) attraverso il consumo di cibi contaminati (soprattutto prodotti ittici) e di integratori alimentari a base di cianobatteri e a seguito di uso irriguo (2, 3). Relativamente all'esposizione attraverso l'uso ricreativo delle acque, le vie di esposizione più rilevanti sono: la via cutanea, attraverso il contatto diretto con le acque contaminate, la via inalatoria (sia per i bagnanti che per chi svolge attività nelle aree circostanti il corpo idrico contaminato) e la via orale (associata, ad esempio, all'ingestione involontaria di acqua durante il nuoto). È evidente che durante l'attività di balneazione tutte e tre le vie possono essere coinvolte contemporaneamente e che esiste, indipendentemente dalla via di esposizione, la potenzialità di produrre sia effetti locali al punto di contatto (es. pelle, occhi, epitelio gastro-intestinale e delle vie respiratorie) che effetti sistemici a seguito di assorbimento e ingresso in circolo.

Per la valutazione del rischio associata alla esposizione durante le attività di balneazione e ricreative è importante considerare che: i) la stagionalità delle fioriture rende gli scenari di esposizione cronica poco plausibili; ii) le specie che fioriscono esclusivamente durante la stagione invernale costituiscono un rischio limitato per la balneazione; iii) nelle aree in cui si verificano frequentemente fioriture in concomitanza dello svolgimento di attività ricreative e/o di balneazione, gli scenari più rappresentativi sono quelli di esposizione subacuta/subcronica.

I rischi potenziali sono associati sia alle proprietà chimico fisiche e al profilo tossicologico delle cianotossine che alla identificazione degli scenari e dei livelli di esposizione, in grado di causare effetti locali al sito di contatto (effetti topici) o effetti sistemici in seguito ad assorbimento e distribuzione ai vari organi bersaglio. Di seguito verrà preso in considerazione il profilo tossicologico delle varie tossine, evidenziando gli effetti prodotti (topici e/o sistemici) a seconda delle via di esposizione. La via orale sarà la prima ad essere descritta poiché a questa via di esposizione si riferisce la maggior parte dei dati disponibili sul profilo tossicologico delle varie cianotossine.

A2.2. Effetti dovuti ad esposizione per la via orale

A2.2.1. Microcistine e nodularine

Le MC e le NOD sono peptidi ciclici costituiti da sette (MC) o cinque (NOD) amminoacidi. Una caratteristica comune di entrambi i gruppi di epatotossine è l'amminoacido Adda (acido-3-ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4(E),6(E)-dienoico) che in natura si trova solo nei cianobatteri. Le variazioni strutturali derivano dalla sostituzione di due (MC) o un (NOD) amminoacido e diversi altri cambiamenti (es. demetilazioni in vari gruppi funzionali); queste differenze portano a più di 100 congeneri di MC e 9 varianti di NOD (4,5). Nella Figura A2.1 è mostrata la struttura chimica del congenere MC-LR, uno dei più diffusi, caratterizzato dalla presenza di leucina (L) e arginina (R) come L-amminoacidi in posizione 2 e 4 (6). Sulla base della tossicità acuta la MC-LR è considerata tra i congeneri con la più elevata epatotossicità e conseguentemente è la più studiata.

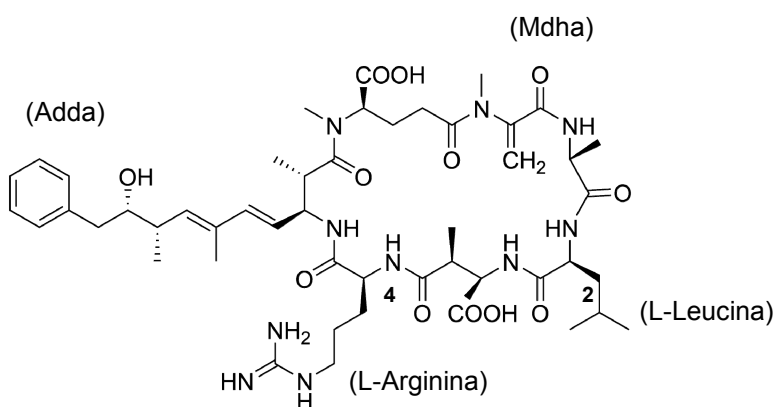


Figura A2.1. Struttura chimica della MC-LR, caratterizzata dalla presenza di leucina (L) in posizione 2 e di arginina (R) in posizione 4

Il meccanismo di azione delle MC è associato alla specifica inibizione delle fosfatasi PP1 e PP2A, alterando la fosforilazione delle proteine cellulari coinvolte nei segnali di trasduzione (7). La capacità di inibire *in vitro* la PP1 e PP2A è più o meno comparabile tra i singoli congeneri con valori di IC₅₀ (concentrazione in grado di inibire il 50% dell'attività dell'enzima) nell'ordine del nanomolare (8-11). Ad alti livelli di esposizione (rappresentativi delle intossicazioni acute), la MC-LR provoca una cascata di eventi (alterazioni del citoscheletro, perossidazione lipidica, stress ossidativo, apoptosi) che portano a tossicità centro-lobulare con aree di emorragia intra-epatica, dovuta al danneggiamento dei capillari sinusoidali. A basse dosi, tipiche dell'esposizione a lungo termine, l'inibizione delle fosfatasi inducono proliferazione cellulare e ipertrofia epatica (7). È stato dimostrato che le MC inducono stress ossidativo producendo ossigeno reattivo (*Reactive Oxygen Species*, ROS) sia *in vivo* che *in vitro* (12), probabilmente a causa del legame dell'epatotossina all'aldeide deidrogenasi mitocondriale (ALDH2): è noto infatti che l'alterazione di questa attività enzimatica anche nell'uomo è coinvolta nell'induzione dello stress ossidativo (13).

L'entità della tossicità dipende sia dalla durata che dai livelli di esposizione ed è determinata dal bilancio tra assorbimento, detossificazione ed escrezione delle MC. La MC-LR è altamente idrofila e non può attraversare le membrane cellulari per trasporto passivo. È assorbita attivamente dalla mucosa intestinale tramite il sistema di trasporto degli anioni organici (*Organic Anion-Transporting Polypeptide*, OATP); entra poi negli epatociti grazie all'attività sia dei trasportatori degli acidi biliari che degli OATP (10). Anche gli altri congeneri si servono di questi trasportatori che sono espressi anche nel rene e nella barriera emato-encefalica, spiegando parzialmente alcuni disordini neurologici osservati nell'uomo durante una intossicazione fatale in Brasile (14) e macro alterazioni della funzionalità renale a dosi sub-letali (55 µg/kg) (15). Per alcune MC specifiche come la MC-LF e MC-LW (16) e più recentemente anche per la MC-LR (17,18) sono stati riportati anche effetti neurotossici. Per questo motivo è stato ipotizzato un ruolo dei cianobatteri e delle cianotossine nella eziologia della sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e dell'Alzheimer suggerendo che la neurotossicità delle MC possa essere legata a processi neurodegenerativi (17, 19, 20).

Minimi cambiamenti strutturali tra le MC portano a differenze di 3-4 volte nell'assorbimento, distribuzione tissutale ed escrezione (21): tali differenze cinetiche spiegherebbero la tossicità congenere-specifica, visto che l'inibizione delle fosfatasi misurata *in vitro* con i diversi congeneri è comparabile. È stato dimostrato che i trasportatori epatici OATP1B1 e 1B3 sono selettivi rispetto ai congeneri nel loro trasporto negli epatociti umani: a parità di concentrazione nominale di esposizione, MC-LW e MC-LF inducono effetti citotossici a concentrazioni più basse di MC-LR e MC-RR (10), perché la concentrazione intracellulare è in realtà più elevata a causa di un maggior *uptake*. Inoltre le cellule HEK293 che sovra-esprimono OATP1B1 o 1B3 risultano più sensibili alla MC-LR rispetto alla MC-RR suggerendo un assorbimento inferiore della MC-RR (9,10).

Relativamente alla biotrasformazione, le MC sono coniugate con il glutatone ridotto (GSH) nel fegato sia degli organismi acquatici (22) sia dei mammiferi (23, 24). La reazione può avvenire sia spontaneamente che enzimaticamente, catalizzata dalle glutatone-S-transferasi, e coinvolge il gruppo metilico della N-metil-deidro-alanina (opposta all'Adda). I coniugati mantengono una attività inibitoria minima residua rispetto al composto parentale e sono escreti principalmente nelle urine (25), per cui la reazione rappresenta una via di detossificazione. La coniugazione è stata caratterizzata principalmente con MC-LR in estratti cellulari di organismi acquatici e di topo (26, 27) e *in vivo* in invertebrati, piante, mitili pesci e roditori (22, 23, 28, 29). Sono disponibili anche dati su MC-RR su topo (24) e pesci (30,31) *in vivo* e in linee cellulari BY-2 da piante di tabacco (32). In generale le informazioni sulla biotrasformazione nell'uomo sono scarse. Recentemente la formazione dell'addotto è stata caratterizzata per MC-

LR e MC-RR, usando sia GST umane ricombinanti che citosol epatico umano: i dati mostrano che l'uomo è in grado di metabolizzare le MC, e che la detossificazione della MC-RR risulta più efficiente rispetto alla MC-LR (33,34), contribuendo ulteriormente a spiegare la differenza di tossicità acuta tra i vari congeneri.

La tossicità acuta della MC-LR dopo somministrazione intra-peritoneale (ip) nei topi indica una LD₅₀ (*Lethal Dose* 50% degli animali trattati) = 50 µg/kg peso corporeo (pc), mentre per via orale il composto risulta meno tossico (LD₅₀ = 5000 µg/kg pc e anche più alta nel ratto) (35,36). La tossicità acuta orale più bassa di 30-100 volte dipende probabilmente da differenze tossico-cinetiche, legate alla via di esposizione: il sistema di trasporto attivo coinvolto nell'assorbimento attraverso la mucosa gastrointestinale (GI) è bypassato dall'iniezione ip, rendendo la MC-LR direttamente biodisponibile per l'internalizzazione negli epatociti (2). Questa ipotesi è parzialmente supportata da studi di distribuzione che mostrano come nel topo, dopo somministrazione orale e ip i livelli epatici di ³H-dihydro-MC-LR radio-marcata differiscono di circa 80 volte (37-39). Perciò la somministrazione ip non è completamente rappresentativa delle reali condizioni di esposizione umana associate principalmente con il consumo di acqua e cibo contaminato e quindi mostra un limitato valore per la valutazione del rischio.

La tossicità acuta è molto variabile tra i congeneri: la MC-LA, -YR e -YM, mostrano una LD₅₀ ip simile alla MC-LR, il che ha fatto presupporre che la presenza di amminoacidi idrofobici come l'alanina o la fenilalanina non influisca sulla tossicità acuta (40). La MC-RR che ha degli amminoacidi polari in posizione sia 2 che 4, ha una LD₅₀ 10 volte più alta della MC-LR (41, 42). Per altri congeneri i valori di LD₅₀ cadono in un ampio range di valori compreso tra 50 e 1200 µg/kg pc (Tabella A2.1), ma l'informazione non è disponibile per tutti i congeneri (es. MC-LW e -LF).

Tabella A2.1. Differenze in tossicità acuta delle varianti di MC

Tossina	ip LD ₅₀ (µg/kg)	PM	Struttura*
MC-LR	50	994	cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
[D-Asp ³]MC-LR	50	970	cyclo-(D-Ala-L-Leu-D- Asp -L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
[L-MeLan ⁷]MC-LR	1000	1115	cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu- L-MeLan -)
[6(Z)-Adda ⁵]MC-LR	>1200	994	cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg- 6(Z)Adda -D-Glu-Mdha-)
MC-LA	50	909	cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L- Ala -Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-RR	500	1037	cyclo-(D-Ala- L-Arg -D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
[Dha ⁷]MC-RR	180	980	cyclo-(D-Ala- L-Arg -D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu- Dha -)
[6(Z)-Adda ⁵]MC-RR	>1200	1037	cyclo-(D-Ala- L-Arg -D-MeAsp-L-Arg- 6(Z)Adda -D-Glu-Mdha-)
MC-YR	150-200	1044	cyclo-(D-Ala- L-Tyr -D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-YA	60-70	959	cyclo-(D-Ala- L-Tyr -D-MeAsp- L-Ala -Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-AR	250	952	cyclo-(D-Ala- L-Ala -D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-M(O)R	700-800	1028	cyclo-(D-Ala- L-Met(O) -D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)

*I residui amminoacidici diversi dalla MC-LR sono riportati in grassetto

ip= intraperitoneale; PM= Peso Molecolare

Dati da (40)

La stereochimica del gruppo Adda e la configurazione dei suoi doppi legami sono cruciali per l'inibizione delle PP1 e PP2A indotte dalle MC (43). Tuttavia l'Adda di per se non è capace di inibire la PP1 e la PP2A e non mostra tossicità se iniettata per via ip nei topi anche a dosi molto alte (10 mg/kg pc) (44).

Tra gli studi disponibili di tossicità ripetuta il più rilevante è stato condotto sul topo, che è più suscettibile agli effetti acuti indotti dalle MC rispetto agli altri roditori. In tale studio la MC-LR è stata somministrata oralmente tramite gavaggio per 90 giorni a 3 dosi differenti (35)

identificando la dose a cui non si osserva alcun effetto (*No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL): 40 µg/kg pc/giorno (35). Lievi danni epatici sono stati osservati in un numero limitato di animali trattati con la dose immediatamente superiore, 200 µg/kg pc/giorno, che perciò è stata identificata come LOAEL (*Lowest Adverse Effect Level*, la dose più bassa che dava effetto), mentre alla più alta dose testata di 1mg/kg pc/giorno tutti gli animali mostravano lesioni epatiche tipiche dell'azione della MC-LR. Quando in un altro studio i topi sono stati trattati attraverso la dieta con un estratto contenente MC-LR, regime di somministrazione più simile all'esposizione umana, il valore di NOAEL è risultato più alto: 333 µg/kg pc/giorno (45), attribuibile a differenze di tossicocinetica. Infatti il gavaggio corrisponde ad un'unica dose bolo, che implica una più alta concentrazione nei tessuti rispetto a quella derivante da una graduale introduzione mediante la dieta, dando la possibilità ai sistemi di detossificazione/escrizione di lavorare efficientemente (senza essere saturati).

Riguardo altri *end-point* tossicologici rilevanti per la valutazione del rischio, la MC-LR pura non ha mostrato attività teratogena nei topi e in colture embrionali di topo (46). Risultati contrastanti sono stati descritti in relazione ad effetti embriotossici e teratogeni nella rana a seguito di esposizione con estratti di cianobatteri che producono MC-LR (46-48). Quando visibili, gli effetti embriotossici non correlavano con il contenuto di MC, suggerendo che gli estratti potessero contenere altri composti bioattivi oltre le MC. Trattamenti ip acuti e sub-acuti (3,75-30 µg/kg pc al giorno) (49) o prolungati (1-3,2-10 µg/L per 3 e 6 mesi per via orale) (50) con MC-LR hanno suggerito la presenza di effetti tossici *in vivo* sul sistema riproduttivo maschile dei roditori, a partire dalla dose intermedia (3,2-10 µg/L) con riduzione dei livelli di testosterone, atrofia testicolare, alta incidenza di anomalie spermatiche dose e tempo dipendenti (49, 50). Tuttavia, i dati relativi alla somministrazione ip hanno un valore limitato; nel caso dell'altro studio è utile sottolineare che l'espressione degli OATP (particolarmente di OATP1B2) non è mai stata confermata nel testicolo, per cui a meno che non siano presenti altre vie, finora non identificate, resta da capire come la MC-LR possa essere entrata nelle cellule del sistema riproduttivo maschile per causare i danni descritti, ponendo un serio limite, ammesso dagli stessi autori, ai risultati dello studio.

Sono disponibili dati anche sul sistema riproduttivo femminile, a seguito di esposizione a MC-LR (0, 5, e 20 µg/kg) di topi femmina per 28 giorni via ip: sono stati descritti alla dose più alta aumento del peso delle ovaie, del livello nel siero del progesterone, ma non del FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) o del LH (*Luteinizing Hormone*), con disturbi del ciclo di estro derivante probabilmente da un effetto diretto sulle ovaie nelle quali è stata trovata presenza di MC-LR (51). Tuttavia, deve essere ancora sottolineato l'uso di una via di somministrazione poco rappresentativa: se questi studi possono avere un valore per l'identificazione di un potenziale *hazard*, hanno un valore limitato per la valutazione del rischio.

Anche alla luce di recenti pubblicazioni può essere ragionevolmente esclusa una diretta interazione con il DNA, responsabile dell'attività genotossica (52-54). I risultati positivi di danno al DNA sia *in vivo* che *in vitro* sono stati ottenuti solo a dosi altamente citotossiche, suggerendo il coinvolgimento della DNA endonucleasi (55-57). Le MC pure a concentrazioni fino a 10 mg/mL non sono mutagene nei batteri (54), mentre possono dare qualche risultato positivo se testate come estratti, probabilmente per la presenza di qualche altro componente non identificato (54). Nelle cellule di mammifero mostrano di indurre formazione di ROS con danno indiretto del DNA e formazione di micronuclei (53). In cellule epatiche (epatociti primari e HepG2), che presumibilmente esprimono attività degli OATP, l'induzione di ROS si osserva a concentrazioni nanomolari (53). È stata ipotizzata inoltre l'interferenza con due pathway di riparazione del DNA, per cui l'induzione di danno ossidativo al DNA e conseguente inibizione del riparo ed esposizione a basse concentrazioni potrebbero contribuire alla instabilità genomica (53).

La MC-LR non ha mostrato nessuna induzione di tumori quando somministrata per gavaggio per 28 settimane (80 µg/kg pc/giorno) (58). L'attività di promozione tumorale della MC-LR (associata alla inibizione delle fosfatasi) è stata evidenziata (59,60) e confermata dalla somministrazione della cianotossina con noti cancerogeni come l'aflatossina B1 e la dietil-nitrosammina (61,62). L'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) ha rivisto i dati disponibili sulla cancerogenicità della MC-LR, concludendo che non ci sono evidenze sufficienti sia nell'uomo che nei modelli sperimentali animali sulla cancerogenicità della MC-LR. Comunque sulla base di dati su meccanismi di promozione tumorale, la IARC ha classificato la MC-LR come possibile cancerogeno nell'uomo (Group2B) (63).

La MC-LR è la MC più studiata, ma recentemente cominciano ad essere pubblicati lavori su altri congeneri con caratteristiche strutturali diverse per esempio congeneri più idrofobici, avendo un triptofano (W) o una fenilalanina (F) al posto dell'arginina (R): recentemente vari studi *in vitro* hanno mostrato una loro maggiore tossicità rispetto la MC-LR. La MC-LW e LF sono risultate più citotossiche per esempio negli epatociti umani, nelle cellule embrioniche di rene che esprimono i trasportatori OATP e nelle cellule Caco-2 (10,11). Anche nelle cellule cerebrali murine si evidenziano maggiori effetti neurodegenerativi (MC-LF >> MC-LW > MC-LR) dipendenti dalla concentrazione e dal congenere (16). Poiché MC-LW e MC-LF inibiscono le fosfatasi in maniera simile o più debolmente della MC-LR (9-11), la loro maggiore tossicità è stata attribuita ad una maggiore facilità ad entrare nelle cellule per la maggiore affinità dei trasportatori (16) o per una differente interazione con le membrane (64) e per una diversa possibilità di essere detossificate (34). La rilevanza di questi dati può essere esemplificata considerando i dati di un recente studio (65) in cui si evidenziava che MC-LW e MC-LF erano presenti nel 32% di campioni d'acqua di laghi tedeschi contenenti MC contribuendo in media, quando presenti, al 10% della concentrazione totale di MC. Gli autori però ipotizzavano che considerando la loro possibile alta tossicità il loro contributo alla tossicità totale delle MC saliva al 45% (65).

La NOD è un penta-peptide che condivide con le MC non solo una struttura chimica simile, ma anche il meccanismo di azione che prevede l'inibizione delle fosfatasi (66, 67). Ad oggi sono state individuate 9 varianti, due delle quali prodotte da *Nodularia* in Nuova Zelanda, con variazioni anche sull'Adda in grado di ridurne quasi totalmente la tossicità. Infatti è l'Adda che blocca l'attività fosfataseica interagendo con il gruppo idrofobico dell'enzima, ostruendo così l'entrata del substrato nella tasca catalitica. Il residuo D-Glu è essenziale per l'induzione della tossicità, tanto che la esterificazione del carbossile libero la elimina. Le NOD non sono comunque così ben studiate come le MC.

La LD₅₀ ip nei topi è simile a quella calcolata per la MC-LR (50-70 µg/kg pc); non sono disponibili dati rilevanti per la valutazione del rischio sulla tossicità ripetuta (5). Risulta comunque ragionevole considerare almeno come "worst case" la comparazione con MC-LR e adottare il suo valore di NOAEL, esprimendo le concentrazioni di NOD come MC-LR equivalenti.

La tossina si distribuisce principalmente nel fegato dopo iniezione intravenosa (iv) di una dose non letale nel topo (68) ma anche l'intestino e il sangue hanno livelli significativi di tossina. Similmente alle MC, la NOD viene trasportata dall'intestino al fegato, dove entra per trasporto attivo dovuto a un non specifico OATP. È epatotossica e il danno epatico include perossidazione lipidica, perdita di integrità delle membrane, apoptosi, frammentazione del DNA. Al contrario delle MC-LR la NOD non lega covalentemente la PP1 e la PP2A pur mostrando simile capacità inibitoria (67). La NOD inibisce l'attività della PP2A in maniera più efficiente della PP1 a concentrazioni simili alle MC (~0,1 nM).

Viste le dimensioni inferiori dell'anello della NOD rispetto alle MC, è stato proposto che possa entrare più facilmente negli epatociti e possa essere la ragione del fatto che la NOD è considerata un promotore tumorale più potente della MC-LR (53,68). Rispetto alla genotossicità, *in vitro* ha mostrato di comportarsi come le MC, induce ROS e conseguente danno ossidativo al DNA e interferisce nei *pathway* di riparazione; aumenta la frequenza di cellule polinucleate suggerendo che possa agire come aneugeno (53). I dati disponibili sono ancora limitati per affermare che la NOD possa avere un potenziale genotossico/cancerogeno e per tale motivo è attualmente classificata dalla IARC come sospetto cancerogeno per l'uomo (Group 3) (53).

A2.2.2. Cilindrospermopsina

La molecola della CYN è composta da un gruppo guanidinico triciclico combinato con un idrossimetil-uracile (Figura A2.2). È considerata una citotossina, poiché produce effetti sia epatotossici che nefrotossici, sebbene altri organi possono anche essere danneggiati in seguito all'esposizione (69-72).

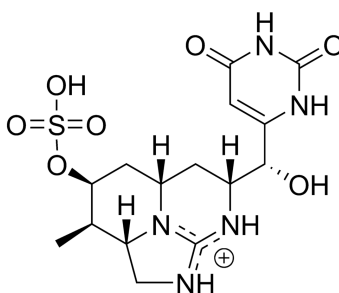


Figura A2.2. Struttura chimica della CYN

La CYN è altamente idrofila e il suo assorbimento intestinale necessita di un sistema di trasporto attivo, come anche per entrare negli epatociti attraverso il sistema di trasporto degli acidi biliari (73). Comunque, a causa delle piccole dimensioni della molecola è possibile anche una limitata diffusione passiva attraverso le membrane biologiche, come evidenziato da studi *in vitro* che mostrano effetti citotossici anche in linee cellulari che non esprimono il sistema di trasporto degli acidi biliari (73).

Quando [^{14}C]-CYN (0,2 mg/kg pc) è stata somministrata nei topi per via ip, 6 ore dopo il trattamento la radioattività fu recuperata principalmente nel fegato e in maniera minore nel rene, rispettivamente il 20,6% e il 4,3% della dose somministrata. Nel fegato circa il 2% della dose iniettata era ancora rilevabile una settimana dopo la somministrazione. La principale via di eliminazione è l'escrezione urinaria: il 50-70% della radioattività somministrata risultava presente nelle urine entro 6-12 ore; il 72% della dose urinaria escreta, pari a circa il 50% della dose somministrata, era il composto parentale (74), indicando che solo metà della CYN subiva biotrasformazione.

Dati sperimentali sia *in vivo* nei roditori (74, 75) che *in vitro* in epatociti primari (76,77) sebbene indirettamente (con uso di inibitori e induttori) indicano che la CYN è bioattivata dal citocromo P450 (P450). La sostanziale deplezione del GSH osservata dopo somministrazione orale di CYN nei ratti fa ipotizzare che possa essere ulteriormente metabolizzata attraverso la coniugazione con il GSH (76). Tuttavia la riduzione della quantità di GSH può essere anche

attribuita all'inibizione della sintesi del GSH, con riduzione della capacità di detossificazione delle cellule (77).

La CYN ha una tossicità acuta tardiva e progressiva: dopo un trattamento con dose letale il decesso sopraggiunge in un ampio intervallo di tempo (24-120 ore). Infatti la LD₅₀ nei topi dopo iniezione ip di CYN pura è 2,1 mg/kg pc dopo 24 ore, ma è 10 volte più bassa (LD₅₀= 0,2 mg/kg pc) quando il periodo di osservazione è prolungato a 120-144 ore (70). Un andamento simile è stato visto anche iniettando nei topi estratti di *Cylindrospermopsis raciborskii* contenenti CYN. Il valore di LD₅₀ a 7 giorni era circa 0,18 mg CYN equivalenti/kg pc. L'estratto somministrato ai topi per via orale causa una minore tossicità acuta (LD₅₀ orale=4,4-6,9 mg CYN eq/kg pc dopo 2-6 giorni), (71,78) dovuta probabilmente a differenze di tossicocinetica (2). Il danno epatico acuto è localizzato nelle aree centrolobulari, essendo caratterizzato da vacuolizzazione degli epatociti e incremento della pigmentazione dei nuclei e del citoplasma. Le principali espressioni della tossicità renale sono aumento del lumen dei tubuli prossimali, alterazioni nei glomeruli e necrosi (69).

Il meccanismo di azione della CYN tal quale è stato associato all'inibizione della sintesi proteica (72), mentre i metaboliti molto probabilmente agiscono con differente modalità (79). Infatti, in esperimenti *in vitro* con epatociti di topo, concentrazioni di CYN $\leq 0,5\mu\text{M}$ inibiscono la sintesi proteica, ma la necrosi si verificava solo a concentrazioni 10 volte più alte. La presenza di inibitori del P450 preveniva la morte delle cellule (osservata in 18 ore) ma non l'inibizione della sintesi delle proteine. Questo suggerisce che, a basse concentrazioni di CYN, la tossicità è prevalentemente dovuta al composto parentale via inibizione della sintesi proteica, mentre a più alte concentrazioni i composti tossicologicamente rilevanti sono molto probabilmente rappresentati dai metaboliti della CYN con effetti citotossici (80,81). Inoltre in una serie di linee cellulari di mammifero sono riportati effetti inibitori della crescita cellulare o citotossicità (12,82-86). Studi recenti hanno dimostrato che la CYN induce stress ossidativo mediato dai ROS che producono perossidazione lipidica in epatociti primari (12,87) e apoptosi anche a concentrazioni dell'ordine del nanomolare (88).

Tra gli studi di tossicità ripetuta disponibili, due sono stati considerati rilevanti per la valutazione del rischio: 1) topi trattati per 10 settimane con 3 dosi di estratti di *C. raciborskii* contenenti CYN disciolti nell'acqua da bere (corrispondenti a 0, 216, 432, e 657 μg tossina equivalenti/kg pc al giorno), e 2) topi trattati per 11 settimane per gavaggio con CYN purificata (0, 30, 60, 120, and 240 $\mu\text{g/kg}$ pc al giorno) (89). Entrambi i trattamenti mostrarono un incremento dose-dipendente del peso di fegato e rene, alterazioni negli enzimi plasmatici (usati come marker di tossicità epatica e renale) e consistenti cambiamenti istopatologici ad alte dosi. Nessun NOAEL poté essere derivato dallo studio con l'estratto, poiché gli effetti furono evidenti in tutti gli animali ad ogni dose. Nello studio con la CYN pura, gli effetti renali si evidenziavano a dosi più basse e fu identificato un NOAEL di 30 $\mu\text{g/kg}$ pc al giorno, sulla base dell'incremento del peso del rene osservato alla dose testata immediatamente superiore (60 $\mu\text{g/kg}$ pc al giorno=LOAEL). Comparando i due studi allo stesso livello di equivalenti di tossina (216 e 240 μg tossina equivalenti/kg pc al giorno) il grado di severità degli effetti era più alto nel caso della somministrazione dell'estratto rispetto alla tossina pura. Il risultato suggerisce che altri costituenti dei cianobatteri oltre alla CYN possono contribuire alla tossicità.

È disponibile anche un ulteriore studio sub-cronico che descrive la tossicità orale in topi esposti a CYN nell'acqua da bere per 42 settimane (90), i cui risultati supportano qualitativamente quanto evidenziato precedentemente, confermando che il fegato e il rene sono i principali target della tossicità indotta dalla CYN. Inoltre furono anche riportati l'aumento dei livelli di colesterolo nel sangue e fegato e le variazioni dei parametri ematici (elevato ematocrito e deformazione dei globuli rossi). Tuttavia a causa del disegno sperimentale non standardizzato (gruppo sperimentale costituito da un animale per sesso trattato con CYN a dose giornaliera

gradualmente crescente ogni 8 settimane da 10 a 55 µg/kg pc) (91), non è possibile derivare da questo studio un adeguato valore di riferimento.

Per quanto riguarda altri *end-point* tossicologici, la struttura chimica della tossina (presenza di gruppi simil-guanidina e solfati potenzialmente reattivi) potrebbe suggerire una possibile interazione con il DNA che porti ad eventuale attività genotossica. Nonostante una serie di dati apparentemente contrastanti, sembra generalmente accettato che la CYN necessiti di essere metabolicamente attivata per poter esplicare effetti genotossici, clastogenici e aneugenici (53). In una linea cellulare di linfoblasti mancante di competenza metabolica, la CYN indusse danno citogenetico (formazioni di micronuclei e perdita cromosomiale) solo a concentrazioni (1–6 µM) alle quali erano già evidenti inibizione della sintesi delle proteine e palese citotossicità (92). Risultati simili furono ottenuti anche nelle cellule CHOK1 mancanti di qualsiasi attività metabolica mediata dal P450 (83). L'attività mutagenica di estratti di cianobatteri produttori di CYN nei test di Ames senza attivazione metabolica ha dato risultati positivi per 4 dei 10 campioni studiati, al contrario della tossina pura, probabilmente a causa della presenza di altri componenti presenti ma non identificati (54). Una possibile attività genotossica non secondaria agli effetti citotossici è stata suggerita dai risultati positivi del *comet assay* in epatociti di topo metabolicamente competenti, trattati con concentrazioni non tossiche di CYN ($\leq 0,05$ µM) (93): la positività del saggio fu annullata dal trattamento degli epatociti con inibitori del P450 (93), suggerendo che il potenziale genotossico sia associato alla bioattivazione P450-dipendente della CYN. È stata riportata anche la formazione degli addotti al DNA (94) e la frammentazione del DNA nel fegato (95) *in vivo*, ma poiché le dosi testate erano simili o poco più basse della LD₅₀, tali effetti possono essere molto probabilmente attribuiti ad una conseguenza della citotossicità; studi più recenti hanno tuttavia evidenziato la formazione di rotture singole del DNA nei linfociti periferici umani trattati con dosi non citotossiche (CYN 0, 0,05, 0,1 and 0,5 µg/mL) (53). Nella linea cellulare epatica HepG2 (che ha qualche residua attività metabolica), la CYN (a 0,25 and 0,5 µg/mL per 24h) causa rotture senza danni ossidativi al DNA, né induzione di apoptosi, suggerendo che le cellule con DNA danneggiato non siano rimosse efficientemente con possibile aumento di rischio di mutazioni (96). Prolungando l'esposizione a 72h venivano indotte rotture doppie al DNA, cambiamenti morfologici e ridotta vitalità cellulare dose- e tempo-dipendenti non dovuta a citotossicità, come evidenziato dal mancato aumento della LDH (97).

È disponibile un solo studio per evidenziare una possibile attività cancerogena indotta dalla CYN (98), estratti di *C. raciborskii* contenenti CYN (500 e 1500 µg/kg pc) sono stati somministrati per via orale nel topo (una dose ogni due settimane per 3 volte) seguita dalla somministrazione di 10 µg di O-tetradecanoyl-forbole 13-acetate (TPA), un promotore tumorale conosciuto, due volte a settimana per 30 settimane (98). I risultati suggeriscono una qualche attività cancerogena, sebbene l'inusuale disegno sperimentale (dosi molto alte e frequenza di somministrazione di un estratto invece della tossina, che come abbiamo visto può influire sull'attività genotossica), il numero limitato di animali usati e la mancanza sia di dose dipendenza che di significatività statistica, non permette al momento di trarre alcuna conclusione.

È stato ipotizzato che la CYN possa avere tossicità riproduttiva: la somministrazione ip di 50 µg/kg a topi femmine gravide nei giorni di gestazione (*Gestational Day*, GD) 13-17 riduce l'ampiezza della nidiata, il peso dei piccoli sopravvissuti, sanguinamento gastrointestinale e la ridotta crescita postnatale dei cuccioli maschi (99). Il periodo gestazionale della somministrazione sembra avere un peso, infatti la dose di 50 µg/kg assunta nel periodo GD 8-12 (periodo dell'organogenesi) dava una più alta tossicità materna (50% di mortalità circa contro lo 0% della somministrazione a GD 13-17) (100), sorprendentemente senza tossicità fetale (99). La somministrazione ip e la presenza di tossicità materna non permettono di trarre conclusioni sui risultati di questi due studi e d'altro canto uno studio più recente con esposizione orale di ratti a dosi 0,03, 0,3 e 3 µg/kg (valori simili o più alti della *Tolerable Daily Intake*; vedi paragrafo

A4.2) durante la gravidanza non diede alcun effetto né sulla capacità riproduttiva degli adulti né effetti teratogeni sulla prole (101).

A2.2.3. Anatossina-a e omoanatossina-a

L'anatossina-a (ATX-a) è un alcaloide biciclico con similarità strutturali ma non farmacologiche con la cocaina; la presenza di un addizionale gruppo metilico la differenzia dalla omoanatossina-a (HATX-a) (Figura A2.3), ma le loro proprietà tossicologiche sono praticamente identiche.

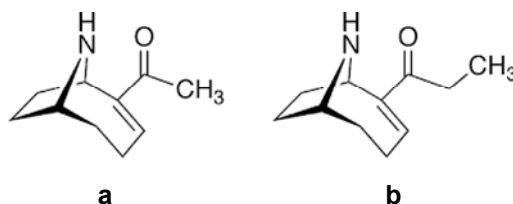


Figura A2.3. Struttura chimica della anatossina-a (a) e della omoanatossina-a (b)

La ATX-a è un potente agente depolarizzante pre- e post-sinaptico, che lega i recettori nicotinici per l'acetilcolina nel sistema nervoso centrale e periferico e nelle giunzioni neuromuscolari (6). La tossicità differisce tra gli stereoisomeri dell'ATX-a: l'enantiomero (+)ATX-a mostra una più elevata affinità per i recettori nicotinici rispetto l'acetilcolina e la nicotina, provocando una più potente azione contrattile e iper-stimolazione muscolare (102, 103). ATX-a può interagire anche con i recettori muscarinici ma il legame sembra meno selettivo (104).

La tossina ha un'elevata tossicità acuta, la LD₅₀ ip nel topo è 250-375 µg/kg pc e la morte è dovuta alla paralisi muscolare e all'insufficienza respiratoria che sopraggiunge in breve tempo (2-6 min) (105,106), mentre dopo somministrazione orale la LD₅₀ è > 5000 µg/kg pc e la morte avviene dopo un periodo di latenza (107). L'iniezione diretta iv mostra una tossicità più alta (iv LD₅₀<60 µg/kg pc) (103) e una morte praticamente istantanea (108). La tossicità acuta dell'HATX-a è simile (ip LD₅₀ =330 µg/kg pc nel topo) con sovrapposizione dei sintomi e morte entro 5-10 minuti (109). Quando somministrata oralmente per gavaggio anche la HATX-a è 10 volte meno tossica (110). In vitro è stata dimostrata l'attività citotossica dell'ATX-a in cellule non neuronali e l'induzione della formazione di ROS nei timociti coltivati di ratto (53).

La ATX-a è rapidamente assorbita dopo ingestione e ampiamente distribuita a vari tessuti incluso il cervello, successivamente è facilmente degradata, perciò si può ipotizzare che abbia un basso potenziale di bioaccumulo.

Sono disponibili alcuni studi di tossicità ripetuta per via orale (periodi di trattamento <2 mesi) per ATX-a (103, 108): in tutti non è stato osservato alcun effetto anche alle dosi più alte testate (120 e 510 µg/kg pc al giorno in due studi diversi), perciò non si è potuto derivare un vero e proprio valore di NOAEL, anche se la dose più alta testata potrebbe essere considerata con un apporccio molto conservativo come un valore di riferimento. Sembra quindi che siano gli effetti acuti di maggior interesse per la salute umana.

Quando l'ATX-a è stata somministrata a roditori durante la gravidanza, nella finestra gestazionale rilevante per lo sviluppo neurologico, nessuna anormalità fetale e né effetti ritardati neuro-comportamentali sono stati evidenziati nei piccoli dopo esposizione in utero, né alcun

effetto di tossicità materna (103, 106, 111). Successivamente altri studi hanno descritto l'insorgere di alcuni effetti comportamentali durante lo sviluppo, come il calo dell'attività locomotoria dovuto all'azione depolarizzante (112). Dopo somministrazione ip alle madri a dosi (200 µg/kg) in grado di indurre tossicità materna (diminuzione dell'attività motoria) fu evidenziato il calo del peso dei feti (103,106,111).

Nei topi maschi trattati ip ATX-a (50, 100 e 150 µg/kg al giorno) per 7 giorni, la tossina causò danni testicolari istopatologici dose dipendente (113). La somministrazione ip non è rappresentativa dell'esposizione umana e non possono perciò essere tirate conclusioni certe relativamente alla possibilità che l'esposizione a basse dosi ripetute di ATX-a possa causare problemi all'apparato riproduttivo maschile.

Per quanto riguarda la genotossicità dell'ATX-a o del suo omologo, è disponibile uno studio che ha valutato la capacità mutagena della ATX-a pura nel test di Ames a diverse concentrazioni (0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5 and 10 µg/mL): i risultati sono stati negativi in tutte le condizioni sperimentali testate (anche in combinazione con MC e CYN (54).

A2.2.4. Anatossina-a(s)

L'anatossina-a(s) (ATX-a(s)) è l'estere fosforico dell' N-idrossiguanidina (Figura 4): come gli insetticidi organofosforici, con cui condivide la struttura chimica, inibisce irreversibilmente l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) nelle giunzioni neuromuscolari (87), bloccando l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina, il cui accumulo porta ipereccitabilità nervosa. L'attività anti-colinesterasica dell'ATX-a(s) è limitata al sistema nervoso periferico, infatti l'attività dell'AChE celebrale rimane inalterata anche a dosi letali di neurotossina (114). La sua affinità per l'AChE eritrocitaria umana è relativamente alta e perciò il rischio di intossicazioni acute nella popolazione non è trascurabile, ed è più alto di quello stimabile per alcune specie acquatiche (115).

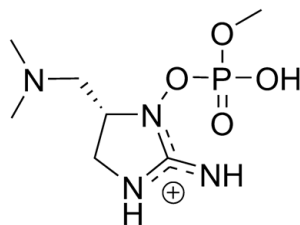


Figura A2.4. Struttura chimica della ATX-a(s)

La LD₅₀ nel topo dopo iniezione ip è 20-40 µg/kg pc (tempo di sopravvivenza 5-30 minuti) (114,116,117). Sebbene abbia una struttura molto differente dall'ATX-a, ne condivide gli effetti indotti come causa del decesso (debolezza muscolare, dispnea e convulsioni prima dell'arresto respiratorio), seppure con un meccanismo diverso (118). Un sintomo tipico dell'ATX-a(s) è l'ipersalivazione visco-mucoide, infatti la "s" del suo nome sta per "salivazione".

Dati su somministrazione orale o sulla tossicità cronica e/o subcronica non sono al momento disponibili. L'ATX-a(s) dà risultati di mutagenicità negativi nel test di Ames con e senza attivazione metabolica testando fino a 2 µg, mentre in vitro fu osservato un aumento delle rotture cromosomali nei linfociti umani alla dose più elevate (0,8 µg/mL) (119).

A2.2.5. Saxitossina e analoghi

Le tossine PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) sono una famiglia di più di 57 congeneri o analoghi (120). La molecola di base è formata da un gruppo tetra-idropurinico e due subunità di guanidina; sulla base dei sostituenti si dividono in 4 sottogruppi: i più importanti sono i carbamoil-derivati di cui fanno parte la saxitossina (STX) e la neo-saxitossina (NEO) che hanno struttura simile a quella dei carbammati (Figura A2.5).

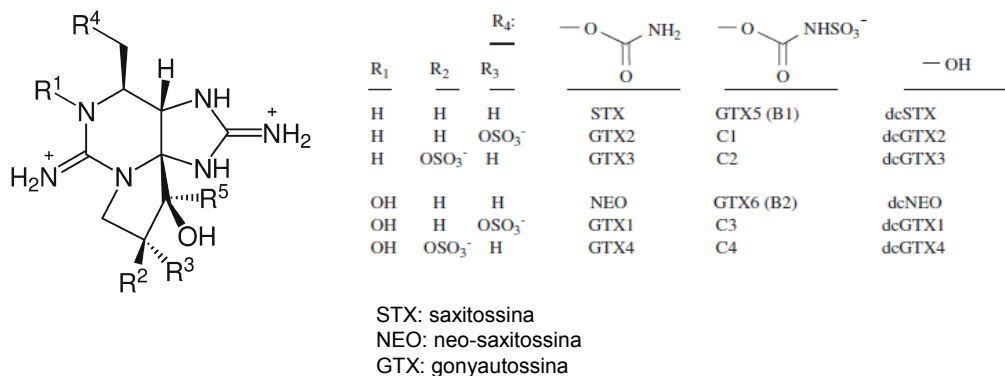


Figura A2.5. Struttura chimica delle principali tossine PSP

La maggior parte dei dati tossicologici riportati sono stati ottenuti con la STX prodotta da organismi marini, mentre sono limitate le informazioni disponibili per la STX prodotta dai cianobatteri d'acqua dolce. Comunque la struttura chimica e il profilo tossicologico delle tossine sono gli stessi, indipendentemente dalla sorgente. Le varie tossine PSP differiscono significativamente nella tossicità: la STX e la NEO sono le più potenti. Il meccanismo di azione è basato sul blocco dei canali del Na⁺ nelle cellule neuronali con blocco della trasmissione nervosa e conseguente asfissia per paralisi dei muscoli respiratori (121, 122) e dei canali di K⁺ e Ca²⁺ nelle cellule cardiache, che impedendo la propagazione del potenziale d'azione possono causare fatali aritmie cardiache (123, 124). Nel topo la LD₅₀ ip per la STX è 10 µg/kg pc e la orale 263 µg/kg pc (125) e valori simili sono stati riportati anche nei ratti (126).

Non ci sono antidoti raccomandati e il trattamento nelle fasi iniziali dell'avvelenamento include l'eliminazione della tossina ancora non assorbita, usando carbone attivo e respirazione artificiale. L'emivita della STX nell'organismo è circa 90 minuti e le possibilità di sopravvivenza aumentano significativamente dopo 12 ore dall'esposizione iniziale (127). I mammiferi hanno di solito varie isoforme dei canali del Na⁺ con differente sensibilità alla STX. Questa differenza è dovuta alla variazione nella sequenza di amminoacidi della sub-unità alfa del canale, perciò una singola mutazione può conferire l'insensibilità alla STX. Il gruppo guanidinico e gli ossidril sul carbonio 12 come anche la catena laterale carbamoile sono coinvolti nel processo di legame al canale, cioè una molecola di STX legandosi si pone nel poro di conduzione ionica (127). La rimozione del gruppo carbamoile dà luogo a una molecola con circa il 60% della attività tossica originale. La tossicità degli analoghi della STX varia notevolmente: le tossine con struttura simile ai carbammati sono 10-100 volte più potenti degli N-sulfo-carbamoil derivati. Questi ultimi sono comunque labili e possono essere convertiti facilmente nei più tossici analoghi carbammici (127).

Il meccanismo biologico dell'azione è stato chiarito per il 50% degli analoghi naturali, suggerendo che potrebbe essere sostanzialmente uguale per tutte le tossine all'interno della

famiglia associata alle PSP, anche se la forma della curva dose/tempo di decesso dell'animale, alla base del *Mouse BioAssay* (MBA), non è simile per tutte le tossine (128).

Le tossine PSP possono bioaccumulare in crostacei e molluschi i quali sembrano essere resistenti agli effetti tossici (129), questo implica la possibilità di alti livelli di esposizione tra i predatori compreso l'uomo (130).

Recentemente è stato evidenziato *in vitro* con microsomi epatici umani l'ossidazione e la glucuronidazione della STX come pathway metabolico di detossificazione (131). È da sottolineare però che la biotrasformazione della STX in NEO via N-ossidazione potrebbe essere in realtà un processo di bioattivazione, perché il metabolita è tossico e recentemente è stata evidenziata la maggiore tossicità acuta della NEO per via orale (128). Sembra che tale reazione avvenga anche *in vivo* dopo l'ingestione: infatti la NEO è stata ritrovata nei tessuti e nelle urine di vittime di avvelenamenti che avevano ingerito campioni contaminati da STX ma non da NEO, risultata assente nel contenuto gastrico (132). Questo è quindi un aspetto da tener presente nella valutazione del rischio per l'uomo.

I composti N-sulfocarbamoile sono sensibilmente meno tossici delle corrispondenti tossine carbamoiliche. Comunque in condizioni acide, come nell'ambiente gastrico, il gruppo solfato (SO_3^-) si perde, convertendo la tossina nell'analogo carbamoilico (133), con incremento di tossicità fino a 40 volte. Anche questa conversione può perciò avere rilevanti conseguenze sulla salute, poiché anche se il prodotto ittico dovesse contenere tossine N-sulfocarbamoiliche debolmente tossiche, queste ultime possono dar luogo a episodi di avvelenamento severo dopo ingestione e idrolisi acida nello stomaco. I numerosi casi di intossicazioni umane hanno permesso di studiare gli effetti acuti dovuti all'ingestione di STX direttamente sull'uomo, ricavandone informazioni importanti per la derivazione di valori di riferimento (134-136) (vedi capitolo A4).

Alcune evidenze di attività teratogena sono state ottenute nei pesci e nelle larve di anfibi nei quali le concentrazioni di STX $\geq 10 \mu\text{g/L}$ hanno causato ritardo nella crescita con malformazioni e mortalità a $500 \mu\text{g/L}$ (137,138). Sui mammiferi non sono disponibili dati.

Per valutare la contemporanea esposizione a più analoghi della STX, aventi differente tossicità, è stato proposto un modello per prevedere gli effetti neurotossici combinati di miscele binarie e ternarie di STX (126, 139). Il modello indica che la tossina più potente è la componente più rilevante, mentre gli analoghi meno tossici avrebbero bisogno di essere un ordine di grandezza più concentrati per contribuire significativamente alla potenza cumulativa tossica (126).

Come riportato nel report della *European Food Safety Authority* (EFSA) del 2009 sulle tossine marine (140) non ci sono dati sugli effetti cronici delle tossine del gruppo STX sia negli animali che nell'uomo, per cui il CONTAM Panel non ha potuto stabilire una TDI. Il fatto che il gruppo sia costituito da una serie di congeneri con potenziale di tossicità diversa ha indotto l'EFSA a calcolare i valori di *Toxicity Equivalence Factor* (TEF) per le varie tossine del gruppo delle STX, valutando così le potenze tossiche relative da utilizzate per la valutazione del rischio, dando più peso ai dati più recenti e a quelli dove si sono usati materiali di riferimento certificati. Sono stati valutati vari studi che utilizzavano il mouse bioassay (MBA) per calcolare le potenze relative della STX e i suoi analoghi e studi *in vitro* sul blocco dei canali del sodio in culture di cellule neuronali (141). Tali TEF sono riferiti alle singole tossine e non calcolabili per le possibili miscele. La maggior parte dei dati sono ottenuti con il MBA che usando l'iniezione ip come via di somministrazione non rappresentano la reale via di esposizione umana e lo stesso Panel EFSA conclude nel report che a supporto di questi TEF sono necessari ulteriori dati tossicologici ottenuti con somministrazione orale.

Molto recentemente alcuni autori (128) hanno evidenziato che il TEF calcolato sul MBA può essere diverso da quello calcolato usando altri parametri tossicologici come LD_{50} orale. In

questo studio sono riportati i dati di tossicità acuta di STX, NEO, e altri analoghi usando due vie di somministrazione orale (gavaggio e dieta) e dopo iniezione ip. La LD₅₀ ip per la STX è 8,3 µg/kg pc mentre quella orale =356 µg/kg pc (gavaggio) e 958 µg/kg pc (dieta) con un NOAEL orale dopo gavaggio di 163 µg/kg pc. Per la NEO invece la LD₅₀ ip è pari a 2,8 µg/kg pc mentre la orale era 221 e 397 µg/kg pc per gavaggio e dieta con un NOAEL di 87 µg/kg pc. I sintomi dell'intossicazione erano simili dopo somministrazione orale e ip con comparsa ritardata, dopo 20-40 min dal dosaggio, nel caso della somministrazione orale. L'assunzione con la dieta portava a una morte ritardata rispetto alla somministrazione per gavaggio come anche il recupero degli animali trattati con dosi sub letali. La curva dose risposta ip è molto ripida (LD₀ meno del 10 % inferiore alla LD₅₀) mentre la dose per gavaggio che non ha dato effetto era tra il 34 -55% della LD₅₀ orale (128). Inoltre viene evidenziato che non c'è correlazione positiva tra la LD₅₀ ip e i risultati del MAB per le tossine PSP testate proponendo di calcolare il TEF usando la LD₅₀ orale. Ad esempio, la NEO avrebbe un TEF >1, essendo più tossico della STX che è usata come sostanza di riferimento, mentre usando il MBA sarebbe pari a 1, come riportato nel parere EFSA (128), con una conseguente possibile sottostima della sua tossicità.

A2.2.6. β-N-metilamino-L-alanina (BMAA)

È stato evidenziato che tutti i cianobatteri conosciuti possedendo i geni che codificano per gli enzimi coinvolti con la sua biosintesi (118) possono produrre a livelli significativi la BMAA un amminoacido non essenziale (142) (Figura A2.6). La BMAA è stata finora identificata in Inghilterra (143), Perù (144), Sud Africa (145), Cina (146) e Florida (147).

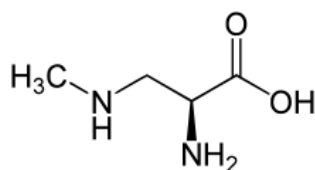


Figura A2.6. Struttura della BMAA

Sebbene con opinioni contrastanti, alla BMAA sono stati attribuiti effetti neurotossici (148,149). Agisce principalmente sui neuroni motori per fissazione sui recettori del glutammato, in aggiunta può causare anche errato ripiegamento (*misfolding*) della proteina intraneuronale caratteristica della neurodegenerazione (150). Studi successivi (149, 151, 152) hanno confermato effetti simili in vari neuroni importanti come quelli motori spinali, corticali ecc. Più recentemente comunque è stato ipotizzato che la BMAA potrebbe essere erroneamente incorporata come un amminoacido nelle proteine attraverso meccanismi traslazionali. Questa possibile incorporazione potrebbe rappresentare un meccanismo di azione alternativo, poiché la formazione di aggregati proteici mal ripiegati (*misfolded*) nella struttura terziaria è uno delle caratteristiche di diverse malattie neurodegenerative come la SLA, l'Alzheimer, il Parkinson e la demenza. La BMAA può essere associata a proteine endogene, dando luogo a concentrazioni elevate legate ai tessuti umani (*sink*), il successivo rilascio lento potrebbe spiegare la fase di latenza tra l'esposizione e la fine della malattia neurodegenerativa.

La correlazione tra BMAA e neuro-degenerazione sembra essere supportata da un numero crescente di studi che sottolineano l'apparente bioaccumulo del metabolita nella catena alimentare e l'evidenza sperimentale a sostegno degli effetti tossicologici sulla funzione

neuronale e della memoria (153-158). Infatti diversi studi sui ratti trattati in età neonatale (9-10 giorni) con dosi che andavano dai 50 ai 600 mg/kg pc hanno mostrato effetti transienti neuro-comportamentali con iperattività nei neonati e presenza di BMAA in alcune regioni cerebrali come l'ippocampo e lo striato, così come disturbi cognitivi a lungo termine negli adulti anche alle dosi più basse, che non davano morte cellulare acuta o a lungo termine (153,158).

Il dibattito legato alla BMAA deriva dalla presenza di molti dati contrastanti. È stato dimostrato *in vitro* su 3 linee cellulari umane che la tossicità della BMAA è bassa con una ED₅₀ di 1430-1604 μ M che è comparabile a quella del supplemento nutrizionale beta-alanina, ed è 300-400 volte meno tossica dell'acido glutammico, il più abbondante amminoacido nell'organismo (159). Gli autori hanno evidenziato che tali risultati erano simili a quelli già ottenuti su linee cellulari non umane (149, 151). Altri autori d'altra parte hanno sottolineato che tali linee cellulari sono cellule immortalizzate altamente proliferative che differiscono significativamente nelle caratteristiche fisiologiche dai neuroni normali *in vivo* (160). La bassa citotossicità *in vitro* tuttavia sembra in accordo con gli studi *in vivo* in cui per avere degli effetti neurotossici nei primati dovevano essere somministrati 100-350 mg/kg pc/giorno di BMAA per molte settimane, dosi elevate che comunque nei topi non davano alcun effetto (161,162). Tali dosi sarebbero per un adulto di 50 kg pari all'assunzione giornaliera di 25 mg BMAA per diverse settimane e considerando il contenuto di BMAA nella farina di semi di cicas (circa 5 μ g/g) ipotizzata come fonte principale di esposizione per l'uomo nell'isola di Guam, corrisponderebbe ad un consumo di 1 kg al giorno per raggiungere la dose di 100 mg/kg pc.

Comunque è interessante notare che, anche se da sola la BMAA è improbabile possa causare deficit neurologici a meno che non vengano usate dosi molto elevate, le concentrazioni a partire da 10-30 μ M possono potenziare l'azione di altri agenti neurotossici (149), portando allo sviluppo di malattie neurologiche dopo esposizione cronica.

A2.3. Effetti dovuti ad esposizione per la via cutanea

Alla via di esposizione cutanea sono essenzialmente associati gli effetti topici su pelle e occhi, e le tossine maggiormente coinvolte sono le endotossine lipopolisaccaridiche (LPS). Tuttavia anche attraverso le altre vie potrebbero essere evidenziati effetti al sito di contatto, così come a seguito di assorbimento attraverso la cute (che però generalmente funziona da barriera e ha una permeabilità inferiore rispetto all'epitelio gastro-intestinale e a quello respiratorio) anche una esposizione cutanea potrebbe causare effetti sistemici.

Si conoscono anche altre tossine, come le aplasia- e lingbia-tossine responsabili di effetti topici, ma al momento la loro presenza è stata descritta solo in acque tropicali e subtropicali e quindi non sembrano essere rilevanti alle nostre latitudini.

A2.3.1. Endotossine LPS

Le endotossine LPS sono componenti esterni delle membrane cellulari della maggior parte dei cianobatteri come anche dei batteri gram-negativi. La molecola consiste di tre regioni: un glicolipide interno acilato (lipide A) e un'area centrale di liposaccaridi che lega la subunità interna con il polimero carboidrato specifico esterno (catena O-specifica) (163) (Figura A2.7). Tra i batteri questa sub-unità esterna mostra la principale diversità ed è la base della specificità sierologica ma anche il lipide A è variabile. Le endotossine LPS cianobatteriche differiscono poco da quelle tipiche degli altri batteri, anche se hanno la presenza di piccole quantità di fosfati (164, 165).

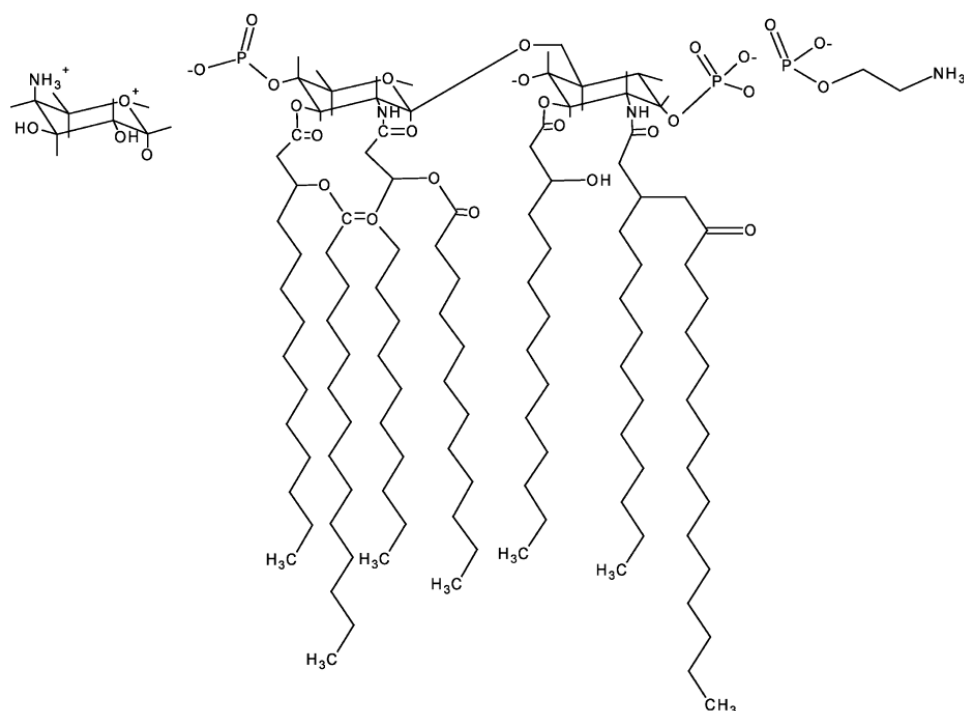


Figura A2.7. Struttura generica delle endotossine LPS

L'esposizione alle endotossine LPS è stata associata ad effetti locali dovuti a contatto diretto tra cui irritazione oculare e cutanea, problemi gastrointestinali o reazioni allergiche. Comunque questi tipi di effetti non sono stati mai riprodotti sperimentalmente e il loro meccanismo di azione è sconosciuto. Infatti la potenziale induzione di gastroenteriti e problemi infiammatori è stata spesso presunta in analogia con gli effetti dei LPS da batteri gram-negativi che sono estesamente studiati.

La tossicità delle endotossine LPS è associata all'interazione con fattori mediati dall'ospite. Le LPS si legano a recettori trans-membrana della famiglia *Toll-like* iniziando una cascata di risposte mediate dall'ospite, tra le quali il rilascio di citochine e altri mediatori dell'infiammazione, stimolazione di monociti e macrofagi e aggregazione di neutrofili e piastrine microcapillari con conseguente danno vascolare (166).

Alcuni dati indiretti hanno suggerito un ruolo delle LPS nelle intossicazioni cianobatteriche. Infatti risultati da test di massimizzazione hanno indicato che differenti estratti cianobatterici inducono alto grado di sensibilizzazione cutanea indipendente dalla produzione di tossina intracellulare (167). Più recentemente uno studio ha mostrato che le LPS cianobatteriche ottenute da *Microcystis* spp. stimolano nella microglia del cervello di ratto la produzione e il rilascio di mediatori neuro-infiammatori inclusi radicali superossido, citochine/chemochine, interleuchine, il fattore necrotico tumorale- α (*tumor necrosis factor- α* , TNF- α) e altre proteine collegate, ma tale attività è stata osservata solo a dosi considerevolmente alte: le LPS da *Microcystis* spp. sono risultate circa 1.000 volte meno potenti delle LPS di *Escherichia coli* (168). Gli effetti pro-infiammatori delle LPS da campioni di colture di laboratorio o di fioritura di *Microcystis* spp. sono stati usati su un modello *ex vivo* di sangue umano ed è stato visto anche in questo caso che rispetto alle LPS batteriche quelle da *Microcystis* spp. hanno una potenza pirogena almeno 12 volte più bassa (169).

Tra i differenti batteri gram-negativi la porzione lipide A è considerata la componente LPS responsabile degli effetti tossici i quali possono essere estremamente variabili, fino ad avere LPS completamente inattive (170). La struttura della sub-unità lipide A nella molecola LPS cianobatterica non è stata finora chiaramente identificata, ma probabilmente le differenze sopra descritte rispetto alle tossine batteriche potrebbe essere attribuita proprio a variazione della porzione del Lipide A. Comunque è utile ricordare che durante la fioritura cianobatterica molti altri composti organici (tra cui aldeidi, terpenoidi e chetoni), alcuni dei quali sono dotati di proprietà irritanti e sensibilizzanti, sono dissolti in acqua. Perciò è possibile che gli effetti irritanti e sensibilizzanti osservati finora erano dovuti alla concomitante presenza di differenti agenti eziologici.

Si sa molto poco sugli effetti sistemici delle endotossine LPS, alcuni dati sulla mortalità dei topi dopo iniezione di estratti di LPS da differenti cianobatteri indicano che la LD₅₀ varia tra 40 e 190 mg/kg pc, sebbene alcuni estratti non abbiano causato morte a 250 mg/kg pc. In aggiunta sono state descritte lesioni dermo-necrotiche nella pelle dei conigli dopo la sequenziale iniezione sottocutanea e iv degli stessi estratti LPS (170).

Negli embrioni di zebrafish sono stati evidenziati effetti delle LPS estratte da *Microcystis* spp. su diversi *pathway* ed enzimi di detossificazione: sono state riportati riduzione delle glutatione-transferasi in tutti i trattamenti (250 µg/L), moderato aumento della glutatione perossidasi mentre la glutatione-reduttasi è rimasta invariata. I livelli totali di glutatione erano elevati negli embrioni trattati ma i livelli relativi di glutatione ridotto e ossidato non erano alterati, suggerendo che lo stress ossidativo non è coinvolto in questi effetti, come supportato dalla mancanza di effetti sulla superossido dismutasi e la catalasi. Tali effetti erano comparabili a quelli indotti dalle LPS di *E. coli* (171).

Un altro effetto biologico delle LPS cianobatteriche è il potenziamento della tossicità dei metalli pesanti (cadmio) almeno negli embrioni di zebrafish anche se apparentemente non dovuto a calo dell'attività delle glutatione transferasi (172).

A2.3.2. Altre cianotossine

Sospensioni acquose algali di fioriture sia di *Microcystis* spp. che di *Anabaena* spp. mostrano basso potenziale per l'irritazione cutanea e danno risultati contrastanti per l'irritazione oculare, mentre nei test di sensibilizzazione cutanea si hanno chiari risultati positivi. Comunque è probabile che siano presenti negli estratti algali altri componenti oltre le cianotossine intacellulari con possibile potenziale irritativo e sensibilizzante. Infatti, non è mai stata trovata correlazione tra il contenuto di tossine e l'effetto.

La MC-LR mostra debole capacità sensibilizzante anche quando è stata testata ad alte concentrazioni (1,5 mg/mL) (167). Inoltre i ceppi axenici sono risultati allergenici (167).

La capacità irritante della CYN è stata testata nei conigli con test intradermico per iniezione di 0,2 mL di estratto liofilizzato da *Aphanizomenon ovalisporum*. I risultati hanno mostrato una moderata risposta irritativa della pelle (167). Per valutare la sensibilizzazione cutanea è stato fatto il test di massimizzazione usando sia l'estratto liofilizzato di *C. raciborskii* contenente 0,015 mg CYN/g che l'estratto di ceppo non tossico di *A. ovalisporum*. ottenendo in entrambi i casi un chiaro risultato positivo (167). Conseguentemente l'alta azione sensibilizzante mostrata dagli estratti di cianobatteri non può essere associata con la presenza di CYN e potrebbe essere attribuita ad altri costituenti cellulari come le endotossine LPS.

A2.3.3. Tossine tropicali

Altre cianotossine sono state identificate, soprattutto nelle zone costiere marine delle Hawaii e dell'Indo-Pacifico, indicate genericamente come dermatotossine, tra le quali ci sono la aplysiatossina, la debromoaplysiatossina e la lyngbyatossina.

Queste tossine sono state indicate come gli agenti causanti dermatiti da contatto ('scabbia del nuotatore') nelle Hawaii (173), irritazione oculare e delle vie respiratorie (174) e di intossicazioni dovute ad ingestione di carne contaminata di una tartaruga marina, *Cheloniamidas* (175), che dipendono, come effetto primario, dalla tossicità locale al sito di contatto nella mucosa gastro-intestinale. Negli anni 1993-1998 in Madagascar il consumo di carne da tartarughe marine ha portato ad alcuni episodi di avvelenamento: di 414 persone intossicate 29 sono decedute. I sintomi descritti includevano gastriti acute, ulcere alla bocca, bruciore della mucosa boccale e della lingua con la comparsa di papule, salivazione, mal di testa, debolezza e febbre (176).

L'aplysiatossina è un bislattone fenolico (Figura A2.8), che iniettato ip nel topo ha un valore di LD₅₀ di 100-120 µg/kg pc. Le cause della morte sono il sanguinamento dell'intestino tenue preceduto dalla dilatazione dei vasi linfatici e congestione dei capillari nella lamina propria (177,178). A dosi subletali il principale effetto è rappresentato da diarrea indotta da ipersecrezione per edema nell'intestino ceco (177).

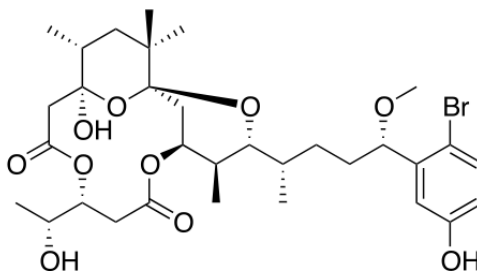


Figura A2.8. Struttura della aplysiatossina

Dopo somministrazione orale la tossicità è ridotta e gli effetti subletali dell'intestino tenue furono osservati a dosi molto più alte (3 mg/kg pc). Per iniezione iv (100 mg/kg) i vasi sanguigni bersaglio sono quelli nel polmone, la deposizione di fibrina nell'arteria polmonare dilatata causa la comparsa di una fessura nella parete dell'arteria con conseguente sanguinamento. Inoltre effetti di sanguinamento erano anche presenti nell'intestino tenue dovuto a deposizione di fibrina nel lumen per distensione della parete del capillare (178).

Anche la debromoaplysiatossina è un bislattone fenolico e differisce dall'aplysiatossina poiché non ha un atomo di Br legato all'anello fenolico. Entrambe causano severe irritazioni oculari e cutanee ma considerando la possibile esposizione inalatoria è stato suggerito che possano anche indurre differenziazione squamosa terminale nelle cellule epiteliali bronchiali umane (179).

La lyngbyatossina è un alcaloide indolico (Figura A2.9) ed ha molte similarità nel meccanismo di tossicità con l'aplysiatossina; infatti iniezioni ip di dosi letali nel topo (250 µg/kg pc) indussero danni gravi nei capillari dei villi portando a sanguinamento dell'intestino tenue.

Dosi subletali causarono erosione nello stomaco e nell'intestino tenue e crasso e infiammazione del polmone (LD₅₀ orale 250 µg/kg pc) (180). Dopo somministrazione orale l'esito patologico a dosi subletali fu per lo più lo stesso ma gli effetti comparirono a dosi più alte (600-1.000 µg/kg pc). Sono state identificate tre sue isoforme: a, b, c, ma la b e la c hanno rispettivamente un'attività pari a 1/200 e 1/20 della isoforma a.

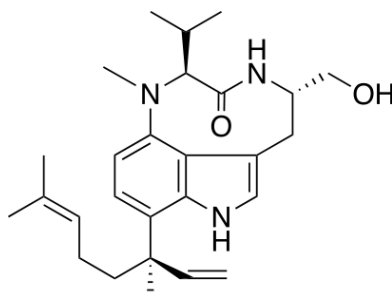


Figura A2.9. Struttura della lyngbyatossina a

Le lyngbyatossine sono debolmente lipofile, la penetrazione attraverso la pelle dopo un'ora di esposizione è pari a $26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ quindi circa il 6% della dose è assorbita (179): è quindi possibile che possano verificarsi anche effetti sistemici, soprattutto durante attività di balneazione, in cui gran parte della superficie corporea è esposta, dando luogo a livelli circolanti tutt'altro che trascurabili.

Al momento non sono disponibili dati su la tossicità sistemica per dosi ripetute indotta da aplysiatossina o lyngbyatossina ma sono noti come potenti promotori tumorali, come anche la debromoaplysiatossina, agendo attraverso il potenziamento della proteina chinasi-C come fa il TPA anche se non con la stessa capacità (181-183).

A2.4. Effetti dovuti ad esposizione per la via inalatoria

Recentemente si sta considerando come non trascurabile anche l'esposizione inalatoria data la possibilità durante le attività ricreative in acqua di formazione di aerosol respirabili durante le fioriture e anche la presenza di cianobatteri nelle polveri desertiche (184-186).

I dati sugli animali per questa via espositiva sono limitati. Nel 1994 è stato condotto uno studio che riportava che la tossicità di MC per applicazione intratracheale risultava comparabile a quelli indotti dall'iniezione ip (107), anche se entrambe le vie sono poco rappresentative della reale esposizione inalatoria. I danni erano prodotti alle mucose del tratto respiratorio superiore (necrosi estesa della mucosa olfattiva e respiratoria nasale) che progrediva alla zone respiratorie più profonde fino agli alveoli. La LD_{50} era $250 \mu\text{g}/\text{kg pc}$ e veniva osservate lesioni dose-dipendenti al fegato. Inoltre la somministrazione di una dose subletale di MC-LR ($31,3 \mu\text{g}/\text{kg pc}$) per via intranasale aveva un effetto cumulativo per la tossicità acuta della ATX-a, abbassandone di 4 volte la LD_{50} . La somministrazione giornaliera ripetuta per 7 giorni di MC ($31,3 \mu\text{g}/\text{kg pc}$) produceva un effetto cumulativo con un incremento finale del peso del fegato del 75% (107), simile all'effetto prodotto da una singola dose di $500 \mu\text{g}/\text{kg pc}$, somministrata per la stessa via (87% di aumento del peso del fegato).

In uno studio più recente è stata somministrata per via inalatoria a topi BALB/c maschi $260\text{--}265 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di MC per 7 giorni, evidenziando degenerazioni multifocali da minime a moderate, necrosi dell'epitelio respiratorio e atrofia di quello olfattivo (187). Il NOAEL per le lesioni nasali è stato stimato di $3 \mu\text{g}/\text{kg pc}$ o $20 \text{ ng}/\text{cm}^2$ di epitelio nasale (187).

Recentemente è stato evidenziato anche un effetto sui polmoni da CYN somministrata a topi per via intratracheale (di nuovo poco rappresentativa della via reale di esposizione): una dose subletale ($70 \mu\text{g}/\text{kg pc}$) di CYN semi-purificata causa compromissione della meccanica polmonare preceduta da infiammazione del parenchima polmonare e stress ossidativo (188).

A causa del fatto che i frammenti della parete cellulare sono prontamente trasformati in aerosol, l'inalazione di LPS potrebbe contribuire a spiegare gli effetti negativi correlati ai cianobatteri noti come “sintomi simil-influenzali” (*flu-like symptoms*), caratterizzati da tosse, brividi, mal di gola e febbre. Comunque nessuna chiara associazione è stata trovata e perciò può essere concluso che le implicazioni sanitarie dei LPS cianobatterici sono scarsamente comprese e questo argomento richiederebbe ulteriori ricerche.

Bibliografia

1. Welker M, von Dohren H. Cyanobacterial peptides-Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:530-63.
2. Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol* 2008;38:97-125.
3. Vichi S, Lavorini P, Funari E, Scardala S, Testai E. Contamination by Microcystis and microcystins of blue-green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population. *Food Chem Toxicol* 2012;50:4493-9.
4. Kaasalainen U, Fewer DP, Jokela J, Wahlsten M, Sivonen K, Rikkinen J. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *PNAS* 2012;109:5886-91.
5. Chen Y, Shen D, Fang D. Nodularins in poisoning. *Clin Chim Acta* 2013;425:18-29.
6. Carmichael WW. Toxins of fresh water cyanobacteria. In: Tu A (Ed.). *Handbook of natural toxins*. New York and Basel: Dekker, Inc.; 1988. Vol 3. p. 121-47.
7. Gehringer M.M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Letters* 2004;557:1-8.
8. Hoeger SJ, Schmid D, Blom JF, Ernst B, Dietrich DR. Analytical and functional characterization of microcystins [Asp3]MC-RR and [Asp3,Dhb7]MC-RR: consequences for risk assessment? *Environ Sci Technol* 2007;41: 2609-16.
9. Monks NR, Liu S, Xu J, Yu H, Bendelow AS, Moscow JA. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:587-98.
10. Fischer A, Hoeger SJ, Stemmer K, Feurstein DJ, Knobloch D, Nussler A, Dietrich DR. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;245:9-20.
11. Vesterkvist PSM, Misiorek JO, Spoof LEM, Toivola DM, Meriluoto JAO. Comparative Cellular Toxicity of Hydrophilic and Hydrophobic Microcystins on Caco-2 Cells. *Toxins* 2012;4:1008-23.
12. Gutierrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Camean AM. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food Chem Toxicol* 2013;53:139-52.
13. Chen T, Cui J, Liang Y, Xin X, Young DO, Chen C, Shen PP. Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicol* 2006;220:71-80.
14. Azevedo SM, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR., Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 2002; 181:441-6.
15. Lowe J, Souza-Menezes J, Freire DS, Mattos LJ, Castiglione RC, Barbosa CM, Santiago L, Ferrão FM, Cardoso LH, da Silva RT, Vieira-Beiral HJ, Vieyra A, Morales MM, Azevedo SM, Soares

- RM. Single sublethal dose of microcystin-LR is responsible for different alterations in biochemical, histological and physiological renal parameters. *Toxicon* 2012;9:601-9.
16. Feurstein D, Stemmer K, Kleinteich J, Speicher T, Dietrich DR. Microcystin congener- and concentration-dependent induction of murine neuron apoptosis and neurite degeneration. *Toxicol Sci* 2011;124:424-31.
 17. Li GY, Cai F, Yan W, Li C, Wang J. A proteomic analysis of MCLR-induced neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Toxicol Sci* 2012;127:485-95.
 18. Li GY, Yan W, Cai F, He Y, Chen N, Wang JH. Spatial learning impairment and pathological change in rats induced by acute exposure to microcystin-LR. *Environ Toxicol* 2012;22:1-8.
 19. Metcalf JS, Codd GA. Cyanobacteria, neurotoxins and water resources: Are there implications for human neurodegenerative disease? *Amyotrophic Lateral Scler* 2009;10:74-8.
 20. Stipa G, Taiuti R, de Scisciolo G, Arnetoli G, Tredici MR, Biondi N, Barsanti L, Lolli F. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis as an infectious disease: a possible role of cyanobacteria? *Med Hypotheses* 2006;67:1363-71.
 21. Meriluoto JAO, Nygard S, Dahlelm AM, Eriksson JE. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydro-microcystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxicon* 1990;29:1439-46.
 22. Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, Beattie KA, Krause E, Codd GA, Steinberg CEW. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim Biophys Acta* 1998;1425:527-33.
 23. Kondo F, Ikai J, Oka H, Masanao O, Ishikawa N, Harada K-I, Matsuura K, Murata H, Suzuki M. Formation, characterization and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem Res Toxicol* 1992;5:591-6.
 24. Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, Nagata S, Ueno Y, Suzuki M, Harada K-I. Detection and identification of metabolites of microcystins in mouse and rat liver. *Chem Res Toxicol* 1996;9:1355-9.
 25. Dittmann E, Wiegand C. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:7-17.
 26. Šetlíková I, Wiegand C. Hepatic and branchial glutathione S-transferases of two fish species: substrate specificity and biotransformation of microcystin-LR. *Comp Biochem Physiol, Part C* 2009;149:515-23.
 27. Takenaka S. Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001;9:135-9.
 28. Pflugmacher S, Wiegand C, Beattie KA, Krause E, Steinberg CE, Codd GA. Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (cav.) trin. ex steud. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:846-52.
 29. Pflugmacher S, Wiegand C, Werner S, Schröder H, Kankaanpää H. Activity and substrate specificity of cytosolic and microsomal glutathione S-transferase in Australian black tiger prawns (*Penaeus monodon*) after exposure to cyanobacterial toxins. *Environ Toxicol* 2005;20:301-7.
 30. He J, Chen J, Xie P, Zhang D, Li G, Wu L, Zhang W, Guo X, Li S. Quantitatively evaluating detoxification of the hepatotoxic microcystins through the glutathione and cysteine pathway in the cyanobacteria-eating bighead carp. *Aquat Toxicol* 2012;116-117:61-8.
 31. Wu L, Xie P, Chen J, Zhang D, Liang G. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantitation of microcystin-RR and its metabolites in fish liver. *J Chromatog A* 2010;1217:1455-62.

32. Huang WM, Xing W, Li DH, Liu YD. The role of Glutathione metabolism in tolerance of tobacco BY-2 suspension cells to Microcystin-RR. *Bull Environ Contam Toxicol* 2008;80:215-9.
33. Buratti FM, Scardala S, Funari E, Testai E. Glutathione Transferases catalyzing the conjugation of the hepatotoxin Microcystin-LR. *Chem Res Toxicol* 2011;24:926-33.
34. Buratti FM, Scardala S, Funari E, Testai E. The conjugation of microcystin-RR by human recombinant GSTs and hepatic cytosol. *Toxicol Lett* 2013;219:231-8.
35. Fawell JK, James CP, James HA. *Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water*. Marlow, UK: Foundation of Water Research; 1994. (Report No. FR 0359/2/DoE 3358/2).
36. Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Human Exp Toxicol* 1999;18:162-7.
37. Nishiwaki R, Ohta T, Sueoka E, Suganuma M, Harada K-I, Watanabe MF, Fujiki H. Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity. *Cancer Lett* 1994;83:283-9.
38. Robinson NA, Miura GA, Matson CF, Dinterman RE, Pace JG. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. *Toxicon* 1989;27:1035-42.
39. Robinson NA, Pace JG, Matson CF, Miura GA, Lawrence WB. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256:176-82.
40. Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas EE. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J Toxicol Environ Health Part B* 2005;8:1-37.
41. Kotak BG, Kenefick SL, Fritz DL, Rousseaux CG, Prepas E, Hruday SE. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. *Water Res* 1993;27:495-506.
42. Wolf HU, Frank C. Toxicity assessment of cyanobacterial toxins mixtures. *Environ. Toxicol.* 2002;17:395-9.
43. Harada K, Ogawa K, Matsuura K, Murata H, Suzuki M, Watanabe MF, Itezono Y, Nakayama N. Structural determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chem Res Toxicol* 1990;3:473-81.
44. Harada K, Imanishi S, Kato H, Mizuno M, Ito E, Tsuji K. Isolation of ADDA from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon* 2004;44:107-9.
45. Schaeffer DJ, Malpas PB, Barton LL. Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon flos-aquae*. *Ecotoxicol Environ Safety* 1999;44:73-80.
46. Chernoff N, Hunter ES, Hall LL, Rosen MB, Brownie CF, Malarkey D, Marr M, Herkovits J. Lack of teratogenicity of microcystin-LR in the mouse and toad. *J Appl Toxicol* 2002;22:13-7.
47. Dvorakova D, Dvorakova K, Blaha L, Marsalek B, Knotkova Z. Effects of cyanobacterial biomass and purified microcystins on malformations in *Xenopus laevis*: teratogenesis assay (FETAX). *Environ Toxicol* 2002;17:547-55.
48. Buryskova B, Hilscherova H, Babica M, Vrskova D, Marsalek B, Blaha L. Toxicity of complex cyanobacterial samples and their fractions in *Xenopus laevis* embryos and the role of microcystins. *Aquat Toxicol* 2006;80:346-54.
49. Wang X, Ying F, Chen Y, Han X. Microcystin (-LR) affects hormones level of male mice by damaging hypothalamic-pituitary system. *Toxicon* 2012;59:205-14.
50. Chen Y, Xu J, Li Y, Han X. Decline of sperm quality and testicular function in male mice during chronic low-dose exposure to microcystin-LR. *Reprod Toxicol* 2011;31:551-7.

51. Wu J, Shao S, Zhou F, Wen S, Chen F, Han X. Reproductive toxicity on female mice induced by microcystin-LR. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013.
52. Runnegar M.T.C., Falconer I.R. The *in vivo* and *in vitro* biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *S Afr J Sci* 1982;78:363-6.
53. Žegura B, Štraser A, Filipic M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins. A review. *Mutat Res* 2011;727:16-41.
54. Sieroslawska A. Assessment of the mutagenic potential of cyanobacterial extracts and pure cyanotoxins. *Toxicon* 2013;74:76-82.
55. Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Lee BL, Ong CN. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat Res* 1999;442:69-77.
56. Rao PVL, Bhattacharya R, Parida MM, Jana AM, Bhaskar ASB. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage *in vivo* and *in vitro*. *Environ Toxicol Pharmacol* 1998;5:1-6.
57. Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu D-S, Zhang L-S, Suzuki T, Hayashi M, Honma M. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mut Res* 2004;557:1-6.
58. Ito E, Kondo F, Terao K, Harada K-I. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon* 1997;35:1453-57.
59. Hirota F, Masami S. Tumor promoters - Microcystin-LR, Nodularin and TNF- α and human cancer development. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2011;11:4-18.
60. Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992;118:420-4.
61. Wangth HB, Zhuth HG. Promoting activity of microcystins extracted from waterblooms in SHE cell transformation assay. *Biomed Environ Sci* 1996;9:46-51.
62. Sekijima M, Tsutsumi T, Yoshida T, Harada T, Tashiro F, Chen G, Yu S, Ueno Y. Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B1-initiated rats. *Carcinogenesis* 1999;20:161-5.
63. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2010;94:v-vii, 1-412.
64. Vesterkvist PS, Meriluoto JA. Interaction between microcystins of different hydrophobicities and lipid monolayers. *Toxicon* 2003;41:349-55.
65. Faassen EJ, Lüring M. Occurrence of the microcystins MC-LW and MC-LF in Dutch surface waters and their contribution to total microcystin toxicity. *Mar Drugs* 2013;11:2643-54.
66. Yoshigawa S, Matsushima R, Watanabe MF, Harada K-I, Ichihara A, Carmichael WW, Fujiki H. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:609-14.
67. Ufelmann H, Krüger T, Luckas B, Schrenk D. Human and rat hepatocyte toxicity and protein phosphatase 1 and 2A inhibitory activity of naturally occurring desmethyl-microcystins and nodularins. *Toxicology* 2012;293:59-67.
68. Ohta T, Sueoka E, Iida N, Komori A, Suganuma M, Nishiwaki R., Tatematsu M, Kim SJ, Carmichael WW, Fujiki H. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Res* 1994;54:6402-6.
69. Falconer IR, Hardy SJ, Humpage AR, Froschio SM, Tozer GJ., Hawkins P.R. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environ Toxicol* 1999;14:143-50.

70. Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC. Cyindrospermopsin- a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* 1992;114:7941-7942.
71. Seawright AA, Nolan CC, Shaw GR, Chiswell RK, Norris RL, Moore MR, Smith MJ. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environ Toxicol* 1999; 14: 235-142.
72. Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada K-I, Ito E, Watanabe M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cyindrospermopsin isolated from blue-green alga *U. natans*. *Toxicon* 1994;32:833-43.
73. Chong MWK, Wong BSF, Lam PKS, Shaw GR, Seawright AA. Toxicity and uptake mechanism of cyindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. *Toxicon* 2002;40:201-11.
74. Norris R, Seawright AA, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, Moore MR. Distribution of ¹⁴C-cyindrospermopsin *in vivo* in the mouse *Environ Toxicol* 2001;16:498-505.
75. Norris RL, Seawright AA, Shaw GR, Senogles P, Eaglesham GK, Smith MJ, Chiswell RK, Moore MR. Hepatic xenobiotic metabolism of cyindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Toxicon* 2002;40:471-6.
76. Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Ge JL, Lu SC. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cyindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:235-41.
77. Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Lu SC. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cyindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1995;49:219-25.
78. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO).
79. Frosocio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cyindrospermopsin. *Environ Toxicol* 2001;16:408-12.
80. Frosocio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cyindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol* 2003;18:243-51.
81. Bazin E, Mourot A, Humpage AR, Fessard V. Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cyindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. *Environ Mol Mutagen* 2010;51:251-9.
82. Bain P, Shaw G, Patel B. Induction of p53-regulated gene expression in human cell lines exposed to the cyanobacterial toxin cyindrospermopsin. *J Toxicol Environ Health A* 2007;70:1687-93.
83. Fessard V, Bernard C. Cell alterations but no DNA strand breaks induced *in vitro* by cyindrospermopsin in CHOK1 cells. *Environ Toxicol* 2003;18:353-9.
84. Frosocio SM, Fanok S, Humpage AR. Cytotoxicity screening for the cyanobacterial toxin cyindrospermopsin. *J Toxicol Environ Health A* 2009;72:345-9.
85. Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos A, Moreno FJ, Cameán AM. Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin Cyindrospermopsin on the human cell line Caco-2. *Water Res* 2012;46:1566-75.
86. Neumann C, Bain P, Shaw G. Studies of the comparative *in vitro* toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycyindrospermopsin. *J Toxicol Environ Health A* 2007;70:1679-86.
87. Liebel S, Oliveira Ribeiro CA, Silva RC, Ramsdorf WA, Cestari MM, Magalhães VF, Garcia JR, Esquivel BM, Filipak Neto F. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cyindrospermopsin exposure. *Toxicol In Vitro* 2011;25:1493-1500.

88. Lopez-Alonso H, Rubiolo JA, Vega F, Vieytes MR, Botana LM. Protein synthesis inhibition and oxidative stress induced by cylindrospermopsin elicit apoptosis in primary rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 2013;26:203-12.
89. Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss Albino mice: determination of No Observed Adverse Effect level for deriving a Drinking Water Guideline Value. *Environ Toxicol* 2003;18:94-103.
90. Dillenberg HO, Dehnel MK. Toxic waterbloom in Saskatchewan. *Can Med Assoc* 1960;83:1151-4.
91. Sukenik A, Reisner M, Carmeli S, Werman M. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: long-term exposure to low doses. *Environ Toxicol* 2006;21:575-82.
92. Humpage AR, Fenech M, Thomas P, Falconer IR. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat Res* 2000;472:155-61.
93. Humpage AR, Fontaine F, Froscio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P450 and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health Part A* 2005;68:739-53.
94. Shaw G, Seawright AA, Moore RE, Lam PK. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicological activity. *Ther Drug Monit* 2000;22:89-92.
95. Shen XY, Lam PKS, Shaw GR, Wickramasinghe W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 2002;40:1499-501.
96. Štraser A, Filipic M, Gorenc I, Žegura B. The influence of cylindrospermopsin on oxidative DNA damage and apoptosis induction in HepG2 cells. *Chemosphere* 2013;92:24-30.
97. Štraser A, Filipic M, Novak M, Žegura B. Double strand breaks and cell-cycle arrest induced by the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in HepG2 cells. *Mar Drugs* 2013;11:3077-90.
98. Falconer IR, Humpage AR. Preliminary evidence for *in vivo* tumor initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 2001;16:192-5.
99. Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Humpage AR, Falconer IR, Marr M, Chernoff N. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicon* 2007;49:855-64.
100. Chernoff N, Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Malarkey DE, Bradfield CA, Liu Y, Schmid JE, Jaskot RH, Richards JH, Wood CR, Rosen MB. Toxicity and recovery in the pregnant mouse after gestational exposure to the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *J Appl Toxicol* 2011;31:242-54.
101. Sibaldo de Almeida C, Costa de Arruda AC, Caldas de Queiroz E, Matias de Lima Costa HT, Fernandes Barbosa P, Araújo Moura Lemos TM, Nunes Oliveira C, Pinto E, Schwarz A, Kujbida P. Oral exposure to cylindrospermopsin in pregnant rats: Reproduction and foetal toxicity studies. *Toxicon* 2013;74:127-9.
102. Swanson KL, Allen CN, Aronstam RS, Rapoport H, Albuquerque EX. Molecular mechanisms of the potent and stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. *Mol Pharmacol* 1986;129:250-7.
103. Fawell JK, Mitchell RE, Hill R., Everett DJ. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Human Exp Toxicol* 1999;18:168-73.
104. Osswald J, Rellán S, Gago A, Vasconcelos V. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ Int* 2007;33:1070-89.

105. Fawell JK, James HA. *Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of anatoxin-a and a method for its determination in reservoir water*. Marlow, UK: Foundation of Water Research; 1994. (Report No.FR0434/DoE 3728).
106. Rogers EH, Hunter ES, Moser VC, Phillips PM, Herkovits J, Muñoz L, Hall LL, Chernoff N. Potential developmental toxicity of anatoxin-a, a cyanobacterial toxin. *J Appl Toxicol* 2005;25:527-34.
107. Fitzgeorge RB, Clark SA, Keevil CW. Routes of intoxication. In: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E (Ed.). *Detection methods for cyanobacterial toxins*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1994. p. 69-74.
108. Astrachan NB, Archer BG, Hilbelink DR. Evaluation of the sub-acute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon* 1980;18:684-8.
109. Namikoshi M, Murakami T, Watanabe MF, Oda T, Yamada J, Tsujimura S, Nagai H, Oishi S. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new nontoxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* 2003;42:533-8.
110. Lilleheil G, Andersen RA, Skulberg OM, Alexander J. Effects of a homoanatoxin-a-containing extract from *Oscillatoria formosa* (Cyanophyceae/Cyanobacteria) on neuromuscular transmission. *Toxicon* 1997;35:1275-89.
111. MacPhail RC, Farmer JD, Jarema KA, Chernoff N. Nicotine effects on the activity of mice exposed prenatally to the nicotinic agonist anatoxin-a. *Neurotoxicol Teratol* 2008;27:593-8.
112. Jarema KA, Poling A, MacPhail RC. Effects of weekly exposure to anatoxin-a and nicotine on operant performance of rats. *Neurotoxicol Teratol* 2008;30:220-7.
113. Yavasoglu A, Karaaslan MA, Uyanikgil Y, Sayim F, Yavasoglu UK. Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice. *Exp Toxicol Pathol* 2008;60:391-6.
114. Cook WO, Beasley VR, Dahlelm AM, Dellinger JA, Harlin KS, Carmichael WW. Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity. *Toxicon* 1988;26:750-3.
115. Carmichael WW, Mahmood NA, Hyde EG. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In: Hall S, Strichartz G (Ed.). *Marine Toxins: origins, structure and molecular pharmacology*. Washington, DC: American Chemical Society; 1990. p. 87-106.
116. Mahmood WA, Carmichael WW. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 1987;25:1211-27.
117. Matsunaga S, Moore RE, Niemczura WP, Carmichael WW. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J Am Chem Soc* 1989;111:8021-3.
118. Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 2010;56:813-28.
119. Repavich WM, Sonzogni WC, Standridge JH, Wedepohl RE, Meisner LF. Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: Acute and chronic toxicity. *Water Res* 1990;24:225-31.
120. Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, Moffitt MC, Neilan BA. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Mar Drugs* 2010;8:2185-211.
121. Kao CY. Paralytic shellfish poisoning. In: Falconer IR (Ed.) *Algal Toxins in seafood and drinking water*. San Diego, CA: Academic Press Inc; 2008. p. 75-86.
122. Rossini GP, Hess P. Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning. In: Luch A (Ed.). *Molecular, clinical and environmental toxicology*. Basel: Birkhäuser; 2010. p. 65-122.

123. Su Z, Sheets M, Ishida H, Barry WH. Saxitoxin blocks L-type ICa. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:324-9.
124. Wang J, Salata JJ, Bennett PB. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K⁺ channels. *J Gen Physiol* 2003;121:583-98.
125. Mons MN, Van Egmond HP., Speijers G.J.A. Paralytic shellfish poisoning: A review. *RIVM* 1998;Report 388802 005.
126. Llewellyn LE. The behaviour of mixture of paralytic shellfish toxins in competitive binding assay. *Chem Res Toxicol* 2006;19:661-7.
127. Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann M, Neilan B. On the Chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs* 2010;8:1650-80.
128. Munday R, Thomas K, Gibbs R, Murphy C, Quilliam MA. Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration. *Toxicon* 2013;76:77-83.
129. Llewellyn LE, Bell PM, Moczydlowski EG. Phylogenetic survey of soluble saxitoxin-binding activity in pursuit of the function and molecular evolution of saxiphilin, a relative of transferrin. *Proc Biol Sci* 1997;264:891-902.
130. Negri AP, Jones GJ. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. *Toxicon* 1995;33:667-78.
131. Garcia C, Barriga A, Diaz JC, Lagos M, Lagos N. Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicon* 2010;55:135-44.
132. Garcia C, del Carmen Bravo M, Lagos M, Lagos N. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon* 2004;43:149-58.
133. Aune T. Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood. In: De Koe WJ, Samson RA, Van Egmond P, Gilbert J, Sabino M (Ed.). *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*. Wageningen, Netherlands: Ponsen & Looyen; 2001. p. 515-26.
134. FAO. *Marine biotoxins*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2004. (FAO Food And Nutrition Paper 80). Disponibile all'indirizzo: <http://Www.Fao.Org/Docrep/007/Y5486e/Y5486e00.HTM>; ultima consultazione 6/11/14.
135. Shumway SE. Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve mollusc are not the only vectors. *Fish Sci* 1995;3:1-31.
136. Orr PT, Jones GJ, Hamilton GR. Removal of saxitoxins from drinking water by granular activated carbon, ozone and hydrogen peroxide-implications for compliance with Australian drinking water guidelines. *Water Res* 2004;38:4455-61.
137. International Programme on Chemical Safety. Aquatic marine and freshwater biotoxins. In: World Health Organization (Ed). *Environmental health criteria*. Geneva: WHO; 1984. Vol 37. Disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_numerical/en/; ultima consultazione 15/12/14.
138. Oberemm A, Becker J, Codd GA, Steinberg C. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environ Toxicol Water Qual* 1999;14:107-15.
139. Llewellyn LE. Predictive toxinology: An initial foray using calculated molecular descriptors to describe toxicity using saxitoxin as a model. *Toxicon* 2007;50:901-7.

140. EFSA Panel on Contaminants in the food chain. Marine biotoxins in shellfish - Saxitoxin group. *EFSA Journal* 2009;1019:1-76.
141. Vale C, Alfonso A, Vieytes MR, Romarís XM, Arévalo F, Botana AM, Botana LM. *In vitro* and *in vivo* evaluation of paralytic shellfish poisoning toxin potency and the influence of the pH of extraction. *Anal Chem* 2008;80:1170-6.
142. Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:5074-8.
143. Metcalf JS, Banack SA, Lindsay J, Morrison LF, Cox PA, Codd GA. Co-occurrence of beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004. *Environ Microbiol* 2008;10:702-8.
144. Johnson HE, King SR, Banack SA, Webster C, Callanaupa WJ, Cox PA. Cyanobacteria (Nostoc commune) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *J Ethnopharmacol* 2008;118:159-65.
145. Esterhuizen M, Downing TG. Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicol Environ Safety* 2014;71:309-16.
146. Li A, Tian Z, Li J, Yu R, Banack SA, Wang Z. Detection of the neurotoxin BMAA within cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Toxicon* 2010;55:947-53.
147. Brand LE, Pablo J, Compton A, Hammerschlag N, Mash DC. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in South Florida aquatic food Webs. *Harm Algae* 2010;9:620-35.
148. Miller G. Guam's deadly stalker: on the loose worldwide. *Science* 2006;313:428-31.
149. Lobner D, Piana PMT, Salous AK, Peoples RW. β -N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Disease* 2007;25:360-6.
150. Banack SA, Caller TA, Stommel EW. The cyanobacteria derived toxin Beta-N-Methylamino-L-Alanine and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Toxins* 2010;2:2837-50.
151. Rao SD, Banack SA, Cox PA, Weiss JH. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Exp Neurol* 2006;201:244-52.
152. Cucchiaroni ML, Viscomi MT, Bernardi G, Molinari M, Guatteo E, Mercuri NB. Metabotropic glutamate receptor 1 mediates the electrophysiological and toxic actions of the cycad derivative beta-N-Methylamino-L-alanine on substantia nigra pars compacta DAergic neurons. *J Neurosci* 2010;30:5176-88.
153. Karlsson O, Roman E, Brittebo EB. Long-term cognitive impairments in adult rats treated neonatally with beta-N-Methylamino-L-Alanine. *Toxicol Sci* 2009;112:185-95.
154. Karlsson O, Lindquist NG, Brittebo EB, Roman E. Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (b-N-Methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicol Sci* 2009;109:286-95.
155. Liu X, Rush T, Zapata J, Lobner D. (beta)-N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc. *Exp Neurol* 2009;217:429-33.
156. Purdie EL, Metcalf JS, Kashmiri S, Codd GA. Toxicity of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine to three aquatic animal species. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10:67-70.
157. Karlsson O, Roman E, Berg A-L, Brittebo EB. Early hippocampal cell death, and late learning and memory deficits in rats exposed to the environmental toxin BMAA ([beta]-N-methylamino-L-alanine) during the neonatal period. *Behav Brain Res* 2011;219:310-20.
158. Karlsson O, Berg A-L, Lindström A-K, Hanrieder J, Arnerup G, Roman E, Bergquist J, Lindquist NG, Brittebo EB, Andersson M. Neonatal exposure to the cyanobacterial toxin BMAA induces

- changes in protein expression and neurodegeneration in adult hippocampus. *Toxicol Sci* 2012;130:391-404.
159. Lee M, McGeer PL. Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement beta-alanine. *Neurobiol Aging* 2012;33:1440-7.
 160. Chiu AS, Gehringer MM, Welch JH, Neilan BA. Does β -Amino-N-methylaminopropionic Acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int J Environ Res Public Health* 2011;8:3728-46.
 161. Perry TL, Bergeron C, Biro AJ, Hansen S. Beta-N-methylamino-L-alanine. Chronic oral administration is not neurotoxic to mice. *J Neurol Sci* 1989;94:173-80.
 162. Cruz-Aguado R, Winkler D, Shaw CA. Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary beta-methylamino-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;84:294-9.
 163. Jann K and Jann B. Structure and biosynthesis of O-antigens. In: Rietschel ET (Ed.) *Handbook of endotoxin* Amsterdam, Elsevier;1984. p. 138-86.
 164. Mayer H, Wecksser J. 'Unusual' lipid A's: structures, taxonomical relevance and potential value for endotoxin research. In: Rietschel ET (Ed.) *Chemistry of endotoxin*. Amsterdam: Elsevier; 1984. p. 221-47.
 165. Kaya K. Toxic microcystis. In: Watanabe M, Harada K.-I, Carmichael WW, Fujiki H (Ed.). *Toxicology of microcystins*. Boca Raton, UK: CRC Press; 1996. p. 175-202.
 166. Heumann D, Glauser MP, Calandra T. The generation of inflammatory responses. In: Sussman M (Ed.). *Molecular medical microbiology*. London: Academic Press; 2002. p. 687-727.
 167. Torokne A, Palovics A, Banckine M. Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria – experimental evidence. *Environ Toxicol* 2001;32:512-16.
 168. Mayer AMS, Clifford JA, Aldulescu M, Frenkel JA, Holland MA, Hall ML, Glaser KB, Berry J. Cyanobacterial *Microcystis aeruginosa* lipopolysaccharide elicits release of superoxide anion, thromboxane B2, cytokines, chemokines and matrix metalloproteinase-9 by rat microglia. *Toxicol Sci* 2011;121:63-72.
 169. Bláhová L, Adamovský O, Kubala L, Svihálová Sindlerová L, Zouneková R, Bláha L. The isolation and characterization of lipopolysaccharides from *Microcystis aeruginosa*, a prominent toxic water bloom forming cyanobacteria. *Toxicon* 2013;76:187-96.
 170. Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environ Health Glob Acc Sci Source* 2006;5:7.
 171. Jaja-Chimedza A, Gantar M, Mayer GD, Gibbs PD, Berry JP. Effects of cyanobacterial lipopolysaccharides from microcystis on glutathione-based detoxification pathways in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Toxins* 2012;4:390-404.
 172. Notch EG, Miniutti DM, Mayer GD. Cyanobacterial LPS potentiates cadmium toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Toxicol* 2011;26:498-505.
 173. Serdula M, Bartolini G, Moore RE, Gooch J, Wiebenga N. Seaweed itch on windward Oahu. *Hawaii Med J* 1982;41:200-1.
 174. Osborne NJT, Webb PM, Shaw GR. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environ Int* 2001;27:381-92.
 175. Yasumoto T. Fish poisoning due to toxin of microalgal origins in the Pacific. *Toxicon* 1998;36:1515-8.
 176. Champetier RG, Ranaivonson G, Ravaonindrina N, Rakotonjanabelo AL, Rasolofonirina N, Roux JF, Yasumoto T. Un problème de santé publique réémergent à Madagascar: les intoxications collectives par consommation d'animaux marins. Aspect épidémiologiques, cliniques et toxicologiques des épisodes notifiés de Janvier à Janvier 1998. *Arch Inst Pasteur* 1998;64:71-6.

177. Ito E, Nagai H. Morphological observations of diarrhea in mice caused by aplysiatoxin the causative agent of the red alga *Gracilaria coronopifolia* poisoning in Hawaii. *Toxicon* 1998;36:1913-20.
178. Ito E, Nagai H. Bleeding from the small intestine caused by aplysiatoxin, the causative agent of the red alga *Gracilaria coronopifolia* poisoning. *Toxicon* 2000;38:123-32.
179. Rzymiski P, Poniedziattek B. Dermatotoxins synthesized by blue-green algae (*Cyanobacteria*). *Post Dermatol Alergol* 2012;1:47-50.
180. Ito E, Satake M, Yasumoto T. Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice. *Toxicon* 2002;40:551-6.
181. Fujiki H, Mori M, Nakayasu M, Terada M, Sagimura R, Moore RE. Indole alkaloids: dihydroteleocidin B, teleocidin and lyngbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3872-6.
182. Fujiki H, Saganuma M, Nakayasu M, Hoshino H, Moore RE, Sagimura T. The third class of new tumor promoters, polyacetates (debromoaplysiatoxin and aplysiatoxin), can differentiate biological actions relevant to tumor promoters. *Gann* 1982;73:497-9.
183. Fujiki H, Sugimura T, Moore RE. New classes of environmental tumor promoters: indole alkaloids and polyacetates. *Environ Health Perspect* 1983;50:85-90.
184. Backer LC, McNeel SV, Barber T, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, Zhou Y, Jhonson TB, Nierenberg K, Aubel M, LePrell L, Chapman A, Foss A, Corum S, Hill VR, Kieszak SM, Cheng Y-S. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicon* 2010;55:909-21.
185. Wood SA, Dietrich DR. Quantitative assessment of aerosolized cyanobacterial toxins at two New Zealand lakes. *J Environ Monit* 2011;13:1617-24.
186. Metcalf JS, Richer R, Cox PA, Codd GA. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Sci Total Environ* 2012;421-422:118-23.
187. Benson JM, Hutt JA, Rein K, Boggs SE, Barr EB, Fleming LE. The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure. *Toxicon* 2005;45:691-8.
188. Oliveira VR, Carvalho GMC, Avila MB, Soares RM, Avezedo SMFO, Ferreira TS, Valença SS, Faffe DS, Araujo Zin W. Time-dependence of lung injury in mice acutely exposed to cylindrospermopsin. *Toxicon* 2012;60:764-72.