



DETECCIÓN DE TOXINAS MARINAS Y CARACTERIZACIÓN DE SU MECANISMO DE ACCIÓN MEDIANTE ENSAYOS CELULARES. APLICACIONES A LA IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS ALIMENTARIOS

Lucía Soliño Alonso

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Lucía Soliño Alonso

**Detección de toxinas marinas y
caracterización de su mecanismo de
acción mediante ensayos celulares.
Aplicaciones a la identificación de
riesgos alimentarios**

Tesis doctoral

Dirigida por los Dres. Jorge Diogène Fadini y Francesc X. Sureda Batlle

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i

Virgili



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Grup de Seguiment del Medi Mari de l'Institut de la Recerca i Tecnologia

Agroalimentària



Reus



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado "Detección de toxinas marinas y caracterización de su mecanismo de acción mediante ensayos celulares. Aplicaciones a la identificación de riesgos alimentarios", que presenta Lucía Soliño Alonso para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento Ciències Mèdiques Bàsiques de esta universidad.

Reus, 13 de Marzo de 2015

El/los director/es de la tesis doctoral

Francesc X. Sureda Battle

Jorge Diogène Fadini

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis directores Jorge Diogène y Francesc Sureda por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis y a los organismos URV-IRTA-Banco Santander por otorgarme la beca que la ha hecho posible.

Quisiera agradecer también a todo el personal del IRTA por la ayuda y apoyo que me han prestado en todos estos años, en especial a la Unidad de Seguiment del Medi Mari.

También agradecer al personal de la Unitat de Farmacologia de la URV porque siempre han estado pendientes de cualquier cosa que necesitara.

J'aimerais aussi remercier Valérie Fessard pour l'opportunité de réaliser un séjour à l'ANSES-Fougères et le personnel du laboratoire: Sylvie et Rachelle pour l'aide avec des cultures, Kevin et Ludovic pour m'aider avec des plaques et la lecture au HCS et Pierre-Jean pour continuer le travail.

Also, I would like to thank the collaborators in the manuscripts carried out during this PhD period, such as the staff of FDA, ANSES, CRPMEM, ARVAM and Università di Napoli Federico II.

Como no, agradecer a los compañeros doctorandos y post-docs con los que he coincidido (los que ya se han ido y los que todavía están) por estar siempre dispuestos a echar una mano con la estadística, discutir artículos, dar apoyo moral y compartir barbacoas, cumpleaños y demás.

Y por mostrarme que había vida más allá de la tesis, quisiera dar también las gracias a Ignasi y a los voluntarios de Riet Vell, a Pere (por supuestísimo) y als del lokal.

E xa que estamos, agradecer a miña familia, especialmente á Rosi por estar ahí, coma sempre e os amigos mosenses, rebumbieiros, composteláns, bichólogos, burelenses, divercientíficos, ecoloxistas, montañeiros, igafas, festivaleiros, instituteiros e todos eles ghaiteiros que cada vez que volto à terriña me fan sentir como se non me houbera marchado nunca.

Cotenido

Listado de abreviaturas	5
Introducción.....	11
1. Generalidades.....	11
2. Microalgas y bioactivos objetos de estudio	21
2.1. <i>Gambierdiscus</i> y ciguatoxinas	21
2.2. <i>Ostreopsis</i> , palitoxinas y ovatoxinas	28
2.3. <i>Dinophysis</i> y dinofisistoxinas.....	34
2.4. <i>Amphidinium</i> y amphidinoles.....	37
2.5. <i>Karlodinium</i> y karlotoxinas.....	39
2.6. <i>Karenia brevis</i> y brevetoxinas	41
3. Modelos celulares usados en este estudio.....	42
Objetivos.....	53
Material y métodos	55
1. Cultivo de microalgas y captación de toxinas del medio	55
2. Extracción y fraccionamiento	58
2.1. Microalgas	58
2.2. Muestras de pescado	62
3. Detección cromatográfica	64
4. Mantenimiento de líneas celulares	67
5. Ensayos celulares (CBA).....	70
5.1. Ensayos.....	71
5.2. Lecturas	74
6. Tratamiento de datos	80
Resultados y discusión.....	82

1. Detección de toxinas	82
1.1. Riesgo asociado a la ciguatera por consumo de peces en Guadeloupe	82
1.2. Presencia de ciguatoxinas del Caribe en el pez invasor <i>Pterois sp.</i> (pez león) en Guadeloupe	88
1.3. Estimación de los factores de equivalencia (TEFs) para ácido okadaico (OA) y las dinofisistoxinas -1 y -2 (DTX-1, DTX-2) en tres líneas celulares (N2a, NG108-15 y MCF-7)	97
2. Caracterización del mecanismo de acción	102
2.1. Identificación y evaluación de bioactivos en las microalgas piscicidas <i>A. carterae</i> y <i>K. veneficum</i>	102
2.2. Potencial inflamatorio y tumoral de extractos de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> y efectos sobre canales iónicos de las ovatoxinas a y b aisladas de una cepa de del Mediterráneo	116
Discusión general y perspectivas.....	133
Conclusiones generales	143
Bibliografía.....	147
Listado de publicaciones y contribuciones científicas.....	168

LISTADO DE ABREVIATURAS

A549: Línea celular de células de epiteliales de adenocarcinoma alveolar humano.

Ac: Anticuerpo.

ANSES: Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, l'Environnement et du travail (agencia nacional de seguridad sanitaria, de la alimentación, el ambiente y el trabajo).

ARfD: Acute Reference Dose (dosis aguda de referencia).

ATCC: American Tissue Culture Collection (colección americana de cultivo de tejidos)

BME: Basal Medium Eagle's (medio basal de Eagle).

BSA: Bovine Serum Albumine (albúmina de suero bovino).

CaCo-2: Línea celular de adenocarcinoma de colon humano.

CBA: Cell Based Assay (ensayo celular).

CFP: Ciguatera Fish Poisoning (intoxicación por consumo de pescado debido a ciguatera).

CGC: Células Granulares de Cerebelo.

CPA: Cyclopiazonic Acid (ácido ciclopiazónico).

CRPMEM: Comité Régional des Pêches Maritimes et des Élevages Marins (comité regional de pesca y de cultivos marinos).

CTX: Ciguatoxina (P-CTX indica ciguatoxina del Pacífico, C-CTX, del Caribe, I-CTX, del Índico).

DAPI: 4',6 -diamidino-2-phenylindole (4',6-diamidino-2-fenilindol).

DMSO: Dimethyl Sulfoxide (sulfóxido de dimetilo).

DSP: Diarrheic Shellfish Poisoning (intoxicación diarreaica por consumo de bivalvos).

DTX: Dinofisistoxina.

EC₅₀: 50% Effective Concentration (concentración eficaz 50%).

ECACC: European Collection of Cell Cultures (colección europea de cultivos celulares).

EFSA: European Food Safety Authority (autoridad europea de seguridad alimentaria).

ELISA: Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

EU: European Union (Unión Europea).

FDA: Food and Drug Administration (dirección de alimentación y medicamentos).

FPA: Fluorescence Polarization Assay (ensayo por polarización de fluorescencia).

GF: Growth Factor (factor de crecimiento).

HAB: Harmful Algae Bloom (afloramiento de algas nocivas).

HCS: High Content Screening (técnica de detección de sustancias mediante microscopia de fluorescencia de alto rendimiento).

HepaRG[®]: Línea celular estable de células hepáticas humanas.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia).

IL: Interleucina.

Ig: Inmunoglobulina.

iPLTX: Isobaric Palytoxin (Palitoxina isobárica).

JNK: C-jun N-terminal kinasa (quinasas c-jun N-terminal).

Ki-67: Factor de proliferación celular.

KmTx: Karlotoxina

LaCl₃: Cloruro de lantano.

LC-FL: Liquid Chromatography coupled with Fluorescence detector (cromatografía líquida acoplada a detector de fluorescencia).

LC-MS: Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry detector (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas).

LC-UVA: Liquid Chromatography coupled with Ultraviolet detector (cromatografía líquida acoplada a detector de ultravioleta).

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LOAEL: Lowest Observable Adverse Effects Level (nivel más bajo con efecto adverso observable).

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase (proteína cinasa activadora de mitógenos).

MBA: Mouse Based Assay (bioensayo en ratón).

MCF-7: Línea celular de adenocarcinoma de mama humano.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromídico.

NCX: Intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de membrana.

Neuro-2a: Línea celular estable de neuroblastoma de ratón.

NF- $\kappa\beta$: Nuclear Factor kappa-light chain enhancer of activated Beta cells (factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células beta activadas).

NG108-15: Línea celular estable de células de neuroblastoma de ratón y de glioma de rata.

Na^+/K^+ -ATPasa: Bomba intercambiadora de sodio/potasio dependiente de energía.

NSP: Neurotoxic Shellfish Poisoning (intoxicación neurotóxica por consumo de bivalvos).

O: Ouabaina.

OA: Okadaic Acid (ácido okadaico).

OVTX: Ovatoxina.

PBS: Phosphate Buffered Saline (tampón fosfato).

PbTx: Brevetoxina.

PLTX: Palitoxina.

PPIA: Protein Phosphatase Inhibition Assay (ensayo de inhibición de proteínas fosfatasas).

PTX: Pectenotoxina.

QL= Quantification limit (límite de cuantificación).

RBA: Radiobinding Assay (ensayo de unión con radioligandos).

RIA: Radioinmunoassay (radioinmunoensayo).

SBB: Superblock[®] Blocking Buffer (tampón de bloqueo Superblock[®]).

SBTI: Soybean Trypsin Inhibitor (inhibidor de tripsina de soja).

SPR: Surface Plasmon Resonance (resonancia de plasmones superficiales).

SPX: Spirolyde Toxin (espirólidos).

TEF: Toxicity Equivalency Factor (factor de equivalencia de toxicidad).

TLC: Thin Layer Chromatography (cromatografía en capa fina).

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.

TNF α : Tumoral Necrosis Factor α (factor de necrosis tumoral α).

TPA: O-12-tetradecanoilforbol-13-acetato.

TTX: Tetrodotoxina.

V: Veratridina.

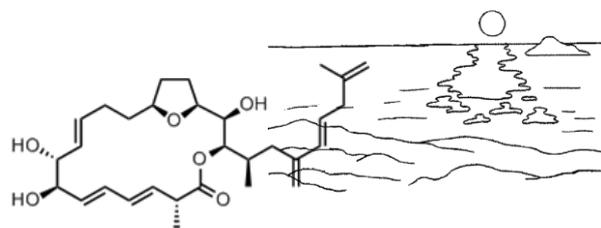
VGCC: Voltage Gated Calcium Channel (canal de calcio dependiente de voltaje).

VGSC: Voltage Gated Sodium Channel (canal de sodio dependiente de voltaje).

YTX: Yesotoxina.

γ H2ax: Histona de la familia ax tipo γ .

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES

Lo que comúnmente se denominan mareas rojas no es sino una proliferación de microalgas, que cuando las condiciones del medio les son favorables proliferan en gran número, de forma que pueden incluso llegar a colorear el mar. Normalmente esta denominación es atribuida por los trabajadores del mar a las floraciones de microalgas tóxicas, ya que en muchos casos coincide esta tinción rojiza de la superficie del mar con los episodios tóxicos en los cuales queda prohibida la venta del marisco. La terminología científica más empleada para este fenómeno viene dada por sus siglas en inglés HAB o *Harmful Algal Bloom*, es decir, un afloramiento en superficie de algas nocivas. La toxicidad de estas microalgas viene dada por su capacidad para sintetizar determinadas sustancias cuya finalidad para la microalga no está muy esclarecida y puede variar en función de la especie. Se ha observado que en ciertas microalgas pueden funcionar como mecanismo de defensa o de competencia (Adolf et al., 2007; Guisande et al., 2002; Senft-Batoh et al., 2015; Turner y Tester, 1997) o para paralizar a sus presas (Sheng et al., 2010). Pero la importancia de estas moléculas reside en que pueden acumularse a través de las redes tróficas en moluscos o peces marinos. Estos animales no suelen presentar daños debido a esta acumulación, pero al ser éstos consumidos por el ser humano, sí exhiben su toxicidad sobre las células de mamíferos. Dicha toxicidad se manifiesta en síntomas de tipo digestivo o neurotóxico, pudiendo llegar a producir la muerte del consumidor. Por ello, estas floraciones se han convertido en un riesgo para la salud pública y un problema para el comercio de productos del mar, que causa enormes pérdidas económicas al sector. Esto ha hecho que las autoridades en materia de salud pública de los países en los que este problema es persistente hayan tenido que introducir normativas y sistemas de control para la detección de los agentes tóxicos y alimentos contaminados. En la siguiente figura (figura 1) se muestran los principales lugares del mundo donde son recurrentes estos síndromes así como su incremento desde 1970 hasta 1999 (Swinker et al., 2002).

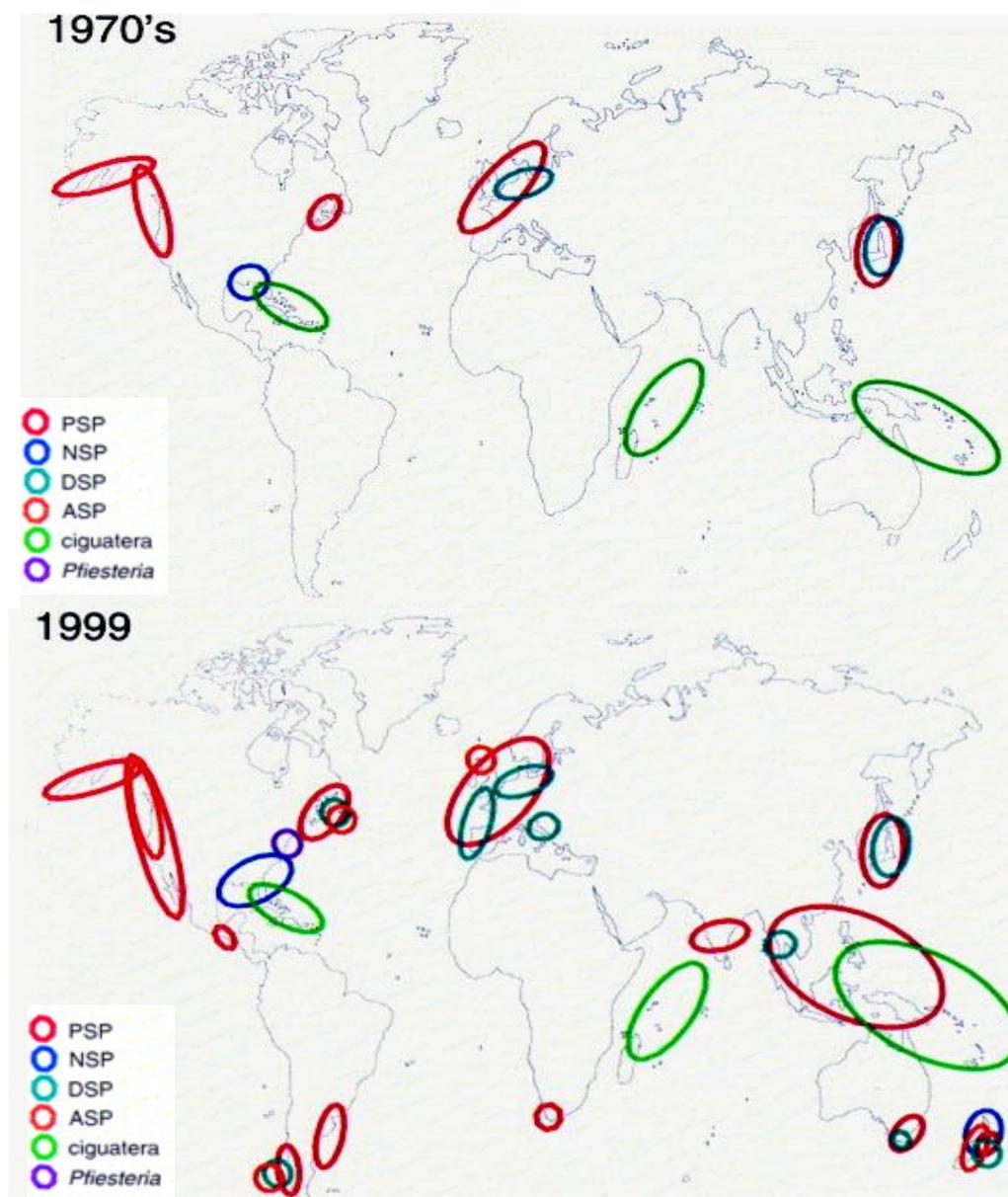


Figura 1. Principales lugares del mundo donde son recurrentes los síndromes debidos a microalgas nocivas y su incremento desde 1970 hasta 1999 (extraído de Swinker et al., 2002).

Esto ha supuesto también que se hayan invertido muchos recursos en la investigación tanto en la identificación y ecología de los organismos productores de toxinas, como en la detección de éstas en los alimentos y en su mecanismo de acción en los organismos. A raíz de estas investigaciones ha crecido el interés de estas microalgas no solo como fuente de toxinas sino también como posible fuente de productos de interés terapéutico y farmacológico. En la tabla 1 se presentan los principales síndromes y organismos productores de toxinas causantes de intoxicaciones alimentarias y organismos productores de toxinas de reciente aparición en Europa

(toxinas emergentes). En la tabla 2 se representan algunas de las sustancias producidas por dinoflagelados que, no habiendo presentado toxicidad aguda en humanos, se han propuesto como posibles bioactivos, entendiéndose como bioactivo cualquier compuesto o sustancia que tiene algún efecto sobre los tejidos vivos.

Tabla 1. Principales síndromes y organismos implicados en las intoxicaciones alimentarias debidas a HABs. En fondo gris se muestran aquellas toxinas que causan síntomas intestinales, en fondo blanco las que causan síntomas neurotóxicos. La escritura en rojo indica aquellas toxinas que son emergentes en Europa, en verde las que normalmente no causan problemas en aguas europeas. Subrayados se encuentran los métodos de detección oficiales hasta la fecha propuestos por la EFSA en la Unión Europea.

Síndrome	Toxinas	Organismo portador	Modo de acción	Estructura	Métodos de detección	Referencias
Diarrheic Shellfish Poisoning	Dinofisistoxinas (ácido okadaico, DTX-1,-2,-3)	<i>Dynophysis spp.</i> , <i>Prorocentrum spp.</i> , <i>Phalacroma rotundatum</i> Bivalvos	Inhibición de proteínas fosfatasas	Poliéter lipofílico	MBA <u>PPIA</u> ELISA SPR <u>LC/MS</u> LC/FL	(EFSA, 2008)
Paralytic Shellfish Poisoning	Saxitoxinas y derivados	<i>Alexandrium spp.</i> , <i>Gymnodinium spp.</i> , <i>Pyrodinium spp.</i> , <i>Anabaena circinalis</i> Bivalvos	Bloqueo de canales de Na ⁺ voltaje-dependientes	Tetrahidropurina hidrosoluble	MBA ELISA RBA CBA Electroforesis <u>LC/MS</u> <u>LC/FL</u>	(EFSA, 2009a)
Amnesic Shellfish Poisoning	Ácido domoico y derivados	<i>Pseudo-nitzschia spp.</i> , <i>Chondria spp.</i> Bivalvos	Activación de receptores de glutamato	Aminoácido tricarbóxico hidrosoluble	MBA ELISA SPR RBA Electroforesis <u>LC/UV</u> LC/MS <u>LC/FL</u> TCL	(EFSA, 2009b)

Síndrome	Toxinas	Organismo portador	Modo de acción	Estructura	Métodos de detección	Referencias
Ciguatera Fish Poisoning	Ciguatoxinas y derivados	<i>Gambierdiscus spp.</i> Peces	Activación de canales de Na ⁺ voltaje-dependientes	Poliéter cíclico lipofílico	MBA ELISA RIA RBA Electroforesis CBA LC/MS	(EFSA, 2010)
Clupeotoxismo	Palitoxina y derivados	<i>Prorocentrum spp.</i> <i>Palythoa spp.</i> Moluscos, crustáceos y equinodermos	Activación de la bomba Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	Poliéter cíclico polihidroxilado lipofílico/hidrofílica	MBA ELISA HNA LC/MS LC/FL	(EFSA, 2009c)
Neurotoxic Shellfish poisoning	Brevetoxinas y derivados	<i>Karenia spp.</i> <i>Chatonella spp.</i> Moluscos	Activación de canales de Na ⁺ voltaje-dependientes	Poliéter cíclico lipofílico	MBA ELISA RIA RBA LC/MS	(Watkins et al., 2008)

Tabla 2. Sustancias producidas por dinoflagelados propuestas como bioactivos de uso farmacológico pero para las que no se ha descrito toxicidad aguda en humanos.

Bioactivo	Principales dinoflagelados productores	Estructura	Modo de acción	Posibles usos farmacológicos	Referencias
Amphidinólidos, Amphidinolactonas, Caribenólidos		Macrólidos	Interferencia en filamentos de actina	Antibióticos y antitumorales	(Camacho et al., 2007; Lorente et al., 2013; Rein y Borrone, 1999)
Amphidinoles, Amphidininas, Lueteophanoles, Colopsinoles, Karatungioles	<i>Amphidinium spp.</i>	Polihidroxi-polienos	Formación de poros en las membranas plasmáticas	Antibióticos y antifúngicos	(Camacho et al., 2007; Kita et al., 2010; Mayer et al., 2009; Rein y Borrone, 1999)
Durinskioles	<i>Durinskia spp.</i>	Poliol	Desconocido. Toxicidad en pez cebra	-	(Kita et al., 2010)
Karlotoxinas	<i>Karlodinium spp.</i>	Poliéter policíclico	Formación de poros en la membrana plasmática	Antibióticos y antifúngicos	(Place et al., 2012)
Gymnodiminas, Espirólidos, Pinnatoxinas, Portimina	<i>Gymnodinium mikimotoi</i> <i>Alexandrium ostenfeldii</i> <i>Alexandrium peruvianum</i> <i>Vulcanodinium spp.</i>	Iminas cíclicas	Activación de canales L-Ca ²⁺ , inhibidores de receptores nicotínicos y muscarínicos	Investigación en Alzheimer	(Otero et al., 2011; Rein y Borrone, 1999; Selwood et al., 2013)
Maitotoxina	<i>Gambierdiscus spp.</i>	Poliéter policíclico	Bloqueo de canales Ca ²⁺	Investigación en mecanismos dependientes de Ca ²⁺	(Gusovsky y Daly, 1990)

Bioactivo	Principales dinoflagelados productores	Estructura	Modo de acción	Posibles usos farmacológicos	Referencias
Gambieroles			Bloqueo de canales K ⁺	Investigación en Alzheimer	(Rein y Borrone, 1999)
Ácido gambiérico			Desconocido	Antifúngicos	(Camacho et al., 2007; Rein y Borrone, 1999)
Brevenal, Tamulamidas	<i>Karenia brevis</i>	Poliéter policíclico	Antagonista de brevetoxina	Terapia contra NSP y CFP	(Sakai y Swanson, 2014; Truxal et al., 2010)
Formosalidos Hoffmanolido		Macrólidos	Desconocido	-	(Lorente et al., 2013; Rein y Borrone, 1999)
Prorocentrólidos Spirocentriminos	<i>Prorocentrum spp</i>	Iminas cíclicas	Desconocido	-	(Otero et al., 2011; Rein y Borrone, 1999; Sakai y Swanson, 2014)
Yesotoxina	<i>Protoceratium reticulatum</i> <i>Gonyaulax spp.</i>	Poliéter policíclico	Aumento de la permeabilidad a Na ⁺ , activación PKC, inducción apoptosis, disrupción del sistema E-caderina-catenina	Estudio y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas; antitumoral	(Camacho et al., 2007; Rein y Borrone, 1999; Sakai y Swanson, 2014)
Protoceratina	<i>Protoceratium reticulatum</i>	Poliéteres glicosídicos	Desconocido	-	(Camacho et al., 2007; Konishi et al., 2004)
Pectenotoxinas	<i>Dinophysis fortii</i> , <i>D. acuta</i>	Macrólido	Forma complejos con la actina, alteraciones en hepatocitos. Modulador de NAG-1	Antitumoral	(Camacho et al., 2007; Rein y Borrone, 1999; Yang et al., 2014)

Bioactivo	Principales dinoflagelados productores	Estructura	Modo de acción	Posibles usos farmacológicos	Referencias
Goniodomin	<i>Alexandrium hiranoi</i> <i>Goniodoma pseudogoniaulax</i>	Macrólido	Estimula la actividad de la actinmiosina ATP-asa y altera la conformación de la actina. Inhibe angiogénesis	Antifúngico	(Camacho et al., 2007; Rein y Borrone, 1999)
Zooxanthellatoxins		Polihidroxipolieno	Vasoconstricción vía incremento de calcio en músculo	-	(Camacho et al., 2007; Rein y Borrone, 1999)
Zooxantellamidas		Macrólidos	Vasoconstricción	-	(Onodera et al., 2005)
Symbioimine	<i>Symbiodinium spp.</i>	Iminas tricíclicas	Interrupción de la diferenciación de osteoclastos	Prevención osteoporosis antiinflamatorio	(Camacho et al., 2007; Kita et al., 2010)
Neosymbioimine			Desconocido	-	
Symbioramide		Poliol	Desconocido. Actividad antileucémica <i>in vitro</i>	Antitumoral	(Camacho et al., 2007)
Symbiodinólido			Apertura canales VGCC tipo N	Investigación en mecanismos dependientes de Ca ²⁺	(Kita et al., 2010)
Symbioespirol		Cadena carbónica	Antagonista de PKC	Antiinflamatorio	(Kita et al., 2010)

La detección e identificación de estos compuestos ha supuesto un gran reto para la ciencia y los organismos oficiales encargados del control y vigilancia de toxinas en productos de la pesca. Desde los primeros indicios de intoxicaciones debidas a microalgas hasta nuestros días el método de análisis más utilizado ha sido el bioensayo en ratón. Resumidamente, este ensayo consiste en la inyección intraperitoneal del extracto de la muestra en tres ratones. Los síntomas y tiempo de la muerte son registrados, de forma que la muerte de alguno de los tres ratones indicaría la presencia de toxinas. El tipo de extracción realizado y la sintomatología aportan un cierto grado de especificidad a la respuesta obtenida, que permite en ciertos casos caracterizar el tipo de toxina presente.

Desde la década de los 90, organismos internacionales como la UNESCO a través de la Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) han reunido los esfuerzos de muchos grupos de investigación para coordinar y divulgar la información referente al fenómeno de las floraciones de microalgas tóxicas. En la década de 2000 se homologaron los protocolos para control de biotoxinas marinas a nivel de la Unión Europea, siendo el bioensayo en ratón (MBA) el método de referencia para detección de toxinas diarreicas y paralizantes, mientras que para toxinas amnésicas se impusieron los métodos cromatográficos (van Egmond, 2004). Hoy en día, debido a las nuevas normativas sobre experimentación animal y el avance de las técnicas de cromatografía, las toxinas lipofílicas en la UE se analizan mediante cromatografía acoplada a espectrometría de masas. Este avance, y el hecho de que ensayos celulares *in vitro* y bioquímicos están aportando resultados interesantes, el uso del MBA ha sido reducido (European Commission, 2011). A este nuevo reto se le suma otro hecho, y es la reciente aparición en aguas europeas de microalgas alóctonas, propias de mares más cálidos y para las que no existe a nivel comunitario ninguna legislación ni método oficial de referencia. En muchos casos ni tan siquiera están establecidos los niveles de toxinas máximos permitidos y los análisis obtenidos se basan en recomendaciones derivadas de los pocos estudios epidemiológicos disponibles.

Ante esta situación, uno de los métodos que pueden ser utilizados con éxito para la detección de toxinas son los modelos celulares *in vitro*. Esta técnica se basa en el mantenimiento de una línea celular, normalmente de origen tumoral, que es

sembrada en una placa de cultivo y a la cual se añaden diferentes concentraciones del extracto del alimento o microalga a evaluar. La respuesta de las células a esa toxina puede ser cuantificada normalmente en términos de viabilidad o algún otro tipo de señal (alteración morfológica, producción de metabolitos secundarios, etc). El ensayo puede incluso ganar especificidad añadiendo fármacos conocidos que antagonicen o magnifiquen la respuesta de las células ante la toxina sospechosa de estar presente en la muestra.

El estudio de la caracterización del mecanismo de acción de las toxinas requiere de modelos celulares y técnicas más complejas y delicadas que los ensayos celulares para detección de toxinas conocidas. A pesar de esto, detección y caracterización de toxinas están íntimamente relacionadas, puesto que para desarrollar un ensayo de detección específico antes hay que evaluar el modo de acción de la toxina.

El conocimiento del mecanismo de acción de una biotoxina es de gran interés por diversos motivos. Primero, como hemos dicho anteriormente, nos permite tener la base para desarrollar métodos de detección. Segundo, nos permite identificar el potencial de ciertas sustancias bioactivas como productos de interés farmacológico.

Así pues en esta tesis se han aprovechado todas estas características que presentan los cultivos *in vitro* para trabajar con modelos celulares que nos permitan la detección de estos tóxicos de forma específica y estudiar el mecanismo de los compuestos de interés que producen algunas microalgas. Es por eso que, para mayor comprensión, se ha dividido el apartado de *resultados y discusión* de esta tesis en dos partes: *1. Detección de toxinas* y *2. Caracterización del mecanismo de acción*. La primera parte se basa en la aplicación CBA para detección específica, o como método complementario a otros más específicos, ya que amplía su información. La segunda parte se basó en la obtención de productos derivados de microalgas poco conocidos en cuanto a su mecanismo de acción para estudiar su respuesta sobre la homeostasis del calcio. También, y como resultado de una estancia realizada en el ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, l'Environnement et du Travail) de Fougères, en Francia, se realizaron estudios del potencial inflamatorio y tumoral de

algunas de estas toxinas. Estos estudios todavía están completándose en la Unidad de toxicología de los contaminantes del ANSES de Fougères.

A continuación se hará una pequeña introducción de cada una de las toxinas y organismos estudiados en esta tesis doctoral, así como las principales características de los modelos celulares seleccionados para su estudio:

2. MICROALGAS Y BIOACTIVOS OBJETOS DE ESTUDIO

2.1. *Gambierdiscus* y ciguatoxinas

El género *Gambierdiscus* incluye varias especies de dinoflagelados bentónicos acorazados que viven asociados normalmente a arrecifes coralinos y praderas de macroalgas. Son comunes en aguas tropicales y subtropicales del Pacífico, Caribe e Índico aunque recientemente se han detectado en aguas de la Macaronesia (Canarias y Madeira) (Fraga et al., 2004; Gouveia et al., 2009) y Mediterráneo (Aligizaki y Nikolaidis, 2008; Laza-Martínez et al., 2013). Algunas especies de *Gambierdiscus* producen gambiertoxinas, que son las toxinas precursoras de ciguatoxinas (CTXs), responsables de la intoxicación alimentaria por consumo de pescado llamada ciguatera (CFP). Las gambiertoxinas ingeridas por el pez sufren un proceso metabólico y, por oxidación de la molécula, dan lugar a las CTXs con una mayor toxicidad que su precursora (Yasumoto y Murata, 1993). El consumo de pescado contaminado con CTXs produce variados síntomas gastrointestinales y neurotóxicos como son diarrea, vómitos, fatiga, confusión, pérdidas de memoria y alteración de receptores sensoriales (inversión de la sensación térmica, picores, hormigueo en la piel). La intoxicación raramente produce muertes pero los síntomas pueden persistir durante meses y evidentemente alteran la calidad de vida de la persona que los padece (Bagnis et al., 1979; Ruff y Lewis, 1994).

Gambierdiscus toxicus fue identificada en 1977 como la especie causante de la ciguatera; sin embargo posteriores revisiones taxonómicas revelan que existen varias especies productoras de estas toxinas (Bagnis et al., 1980; Fraga et al., 2011; Litaker et al., 2009; Yasumoto et al., 1977). En este sentido podría decirse que *Gambierdiscus* es un género ampliamente distribuido alrededor del mundo, incluyendo especies

tóxicas y no tóxicas y que el riesgo de toxicidad en una zona concreta dependerá de la presencia de determinadas especies, o de la proporción de unas especies con respecto a otras. Sin embargo, la toxicidad de muchas especies no es conocida, todavía. Como dato curioso, la especie inicialmente descrita como la responsable de la ciguatera, *G. toxicus*, resulta no ser tóxica, según Litaker et al., 2009. A esta paradoja se suma el hecho de que nuevas especies de microalgas podrían producir este tipo de toxinas, como se ha observado en la cianobacteria *Trichodesmium sp.* (Kerbrat et al., 2010). No hay que olvidar tampoco, que el término ciguatera viene de “cigua”, el nombre que los nativos de las Antillas daban al molusco gasterópodo *Cittarium pica* (Banner, 1976; Halstead y Courville, 1965) por tanto, otras especies marinas a parte de peces podrían estar implicadas en la ciguatera.

El proceso por el cual el pescado es contaminado con CTXs es complejo y de difícil control. Las gambiertoxinas pasan de las microalgas a los peces ramoneadores, herbívoros que las consumen en los arrecifes y a través de éstos a peces carnívoros. Los peces metabolizan estas toxinas que, por oxidación se convierten en CTXs las cuales no solo presentan mayor toxicidad que su precursor, sino que además pueden acumularse en vísceras y carne durante largo tiempo (McMillan et al., 1986; Murata et al., 1990, 1989; Randall, 1958). Las especies de pescado con mayor riesgo de acumular CTXs se consideraban, por tanto, las especies de arrecife situadas en los eslabones superiores de la pirámide alimentaria (a mayor depredación y mayor tamaño más cantidad de CTXs habrían acumulado) (Randall, 1958). Esta norma se sigue utilizando como referencia para aplicar los controles alimentarios en ciertas zonas, como en las Islas Canarias. Sin embargo, recientes estudios han encontrado que esta relación solo funciona en especies concretas y por tanto no puede ser universalmente aplicada (Gaboriau et al., 2014; Soliño et al., 2015b). En este sentido parece que un importante factor que influiría en la acumulación de toxina es el lugar al cual el pez vive asociado así como sus hábitos de comportamiento alimentario y movilidad. Otra cuestión importante es que no todos los peces metabolizan la toxina de la misma manera (Yogi et al., 2011). Más de 400 especies de peces podrían ser vectores de CTXs pero solo unas cuantas han sido asociadas a intoxicaciones por ciguatera. Entre ellas *Sphyræna spp.* (barracudas), *Epinephelus spp.* (serranos), *Caranx*

spp. (seriolas), *Lutjanus spp.* (pargos), *Gymnothorax spp.* (morenas), *Mugil spp.* (múgeles), *Ctenochaetus spp.* (peces cirujano) y *Scarus spp.* (peces loro) están entre los de mayor riesgo (Lehane y Lewis, 2000). Pero, como se ha dicho, la movilidad de los peces, el reclutamiento o migración natural, el lugar donde se establecen y sus hábitos alimentarios podrían hacer aumentar esta lista. El caso del pez león, que ha sido también objeto de estudio en esta tesis es un buen ejemplo. El pez león (*Pterois volitans*) es una especie originaria del Indo-Pacífico introducida en el Caribe. Esta especie ha establecido rápidamente sus poblaciones a lo largo de las costas de Florida, el Golfo de México y América Central e incluso se ha convertido en invasora y una amenaza para los ecosistemas de arrecifes coralinos (Morris Jr y Whitfield, 2009). Una de las medidas para controlar su población ha sido incluirlo en los hábitos alimentarios de los habitantes de las costas e islas del Caribe, una zona donde *Gambierdiscus spp.* y la ciguatera son endémicas. Sin embargo debido a sus hábitos alimentarios el pez león es susceptible de acumular CTXs y su consumo supondría un riesgo para la salud pública debido a la ciguatera (Robertson et al., 2014; Soliño et al., 2015b). En uno de los estudios llevado a cabo en el marco de esta tesis se corroboró este hecho como se explicará más adelante en el apartado correspondiente de *Resultados y discusión*.

A las dificultades que entraña el control de las CTXs hay que sumar las dificultades respecto a su detección e identificación. Las CTXs no pueden ser detectadas por el olor ni el sabor de los alimentos y no se degradan con el congelado o cocinado. Las moléculas de las CTXs son complejas y comprenden poliéteres policíclicos estables, con propiedades lipofílicas. Numerosos congéneres y precursores han sido identificados hasta el momento, aunque normalmente se agrupan en tres grandes grupos dependiendo del lugar en el que fueron descubiertas y en el que son prevalentes. Así, se definen P-CTXs (Pacífico), C-CTXs (Caribe) y I-CTXs (Índico). Sinónimos de P-CTX son P-CTX-1, P-CTX-1B, CTX-1B (figura 2).

El método más utilizado hasta el momento para detección de CTXs ha sido el bioensayo en ratón. Sin embargo, debido a su variabilidad, baja especificidad, elevado límite de detección y cuestiones éticas que entraña el uso de animales como método de rutina, se están estudiando alternativas para sustituir los bioensayos con animales.

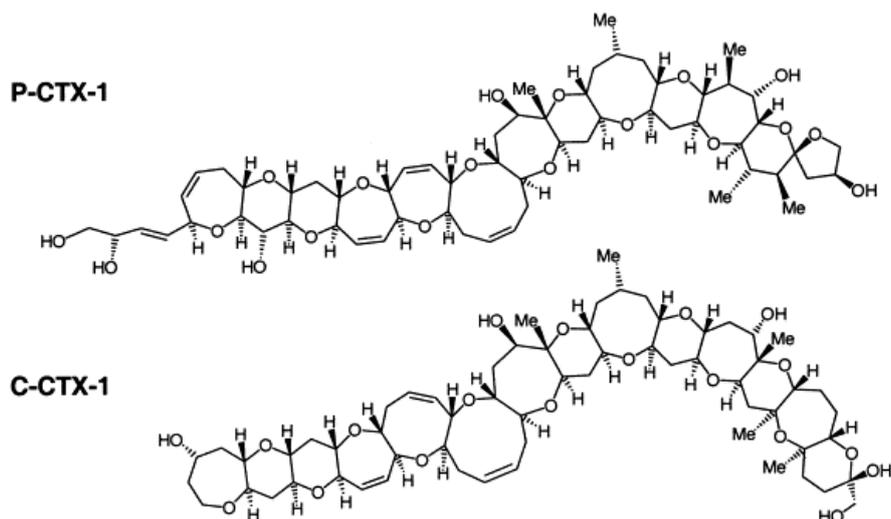


Figura 2. Estructura de las principales ciguatoxinas P-CTX y C-CTX extraído de (Hamilton et al., 2002).

A nivel europeo este hecho viene además impulsado por la normativa europea Commission Regulation EU nº 15/2011 (European Comission, 2011) que prohibirá a finales de 2015 el uso de ratones como método de rutina para detección de tóxicos. Los métodos cromatográficos son unos de los más prometedores para detección de toxinas lipofílicas y para sustituir al bioensayo en ratón. No obstante, sus altos costes y necesidad de personal especializado lo hacen poco práctico en ciertos casos. Los ensayos inmunológicos tampoco han sido hasta ahora optimizados, debido a la baja afinidad de la CTX por los anticuerpos. El RBA (*radiobinding assay*) y los CBA (*cell based assay*) han dado buenos resultados y estos últimos han demostrado en varios estudios su capacidad de detectar la toxina a niveles muy bajos (Caillaud et al., 2012; Pawlowicz et al., 2013; Stewart y McLeod, 2014) y en una gran variedad de tejidos.

Por su carácter lipofílico las CTXs pueden bioacumularse en el tejido adiposo y atravesar la membrana celular. Su mecanismo de acción es mediante la unión al sitio 5 del dominio IV de canales de sodio voltaje dependientes (VGSC) y el bloqueo de estos en su estado abierto (figura 3). Esto provoca la formación de poros permeables al sodio y despolarización celular, lo que se traduce en alteraciones neuromusculares y otros síntomas neurológicos relacionados con la ciguatera (Baden, 1989; Bidard et al., 1984; Lewis y Endean, 1986; Lombet et al., 1987; Setliff et al., 1971).

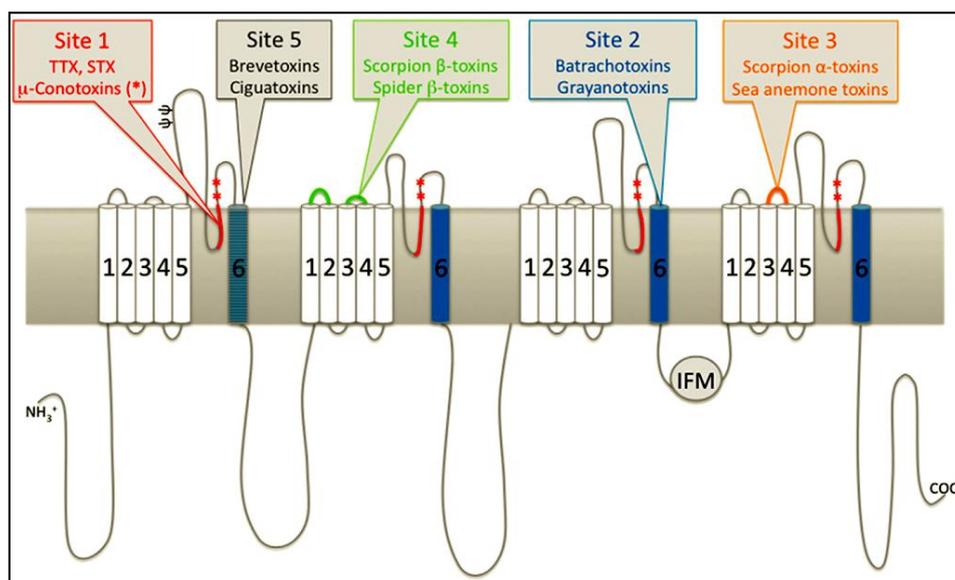


Figura 3. Canal de Na^+ voltaje-dependiente mostrando el sitio de unión de diferentes toxinas, entre ellas las CTX, en el “site 5”. Extraído de (Daneshian et al., 2013).

Los CBA aprovechan esta capacidad de la toxina para tener una respuesta específica. En células excitables como las Neuro-2a esta interacción resulta en una entrada de sodio y despolarización. Si las células no son capaces de contrarrestar estos efectos se producen daños irreversibles y mueren. Con bajas dosis de CTX podemos asegurar la respuesta mediante la adición de veratridina que actúa activando los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC) y ouabaína (O/V+) que bloquea la bomba Na^+/K^+ -ATPasa e impide que la célula utilice este recurso para contrarrestar la entrada de Na^+ intercambiándolo por K^+ . Si añadimos la toxina a niveles cada vez mayores esto resultará en la muerte de las células a mayores concentraciones mientras que las mismas concentraciones de CTXs, sin la adición de los dos compuestos (O/V-), no causarán efectos en las células. Con esto se consigue un incremento de la sensibilidad y la especificidad del ensayo con la obtención final de dos curvas dosis-respuesta: en ausencia o presencia de O/V. La primera es la curva control donde ningún efecto debería ser observado (y si se observa es posiblemente debido a alguna interferencia de la matriz de la muestra) y la segunda presentaría mayor mortalidad a mayor concentración de estándar o muestra tóxica.

El uso de estándares de referencia nos permite calcular la concentración del analito en las muestras, a partir del valor de toxina purificada para el cual se obtiene el 50% de

viabilidad (EC_{50}) y el EC_{50} obtenido en la curva de la muestra (Manger et al., 2014, 2001, 1995).

El CBA para detección de CTXs junto con detección por cromatografía acoplada a espectrometría de masas se ha propuesto como una buena alternativa por varios autores (Caillaud et al., 2012; Dickey y Plakas, 2010; Soliño et al., 2014).

La ciguatera es un problema persistente e infravalorado en muchos países tropicales cuya economía de subsistencia se basa mayoritariamente en la venta de pescado local. Es también un problema persistente a nivel europeo en los territorios de la UE de ultramar como la Polinesia o las Antillas francesas. En los últimos años, ha pasado también a ser un problema para el estado español y portugués, al encontrarse el organismo productor en aguas de la Macaronesia (Canarias y Madeira)(Fraga et al., 2011, 2004; Gouveia et al., 2009) y producirse las primeras intoxicaciones por consumo de pescado capturado en estas aguas (Nuñez et al., 2012; Otero et al., 2010; Pérez-Arellano et al., 2005). Asimismo, debido a que los peces de arrecife se exportan a áreas donde la ciguatera no es endémica esto debería ser realmente un problema global (Lehane y Lewis, 2000). La regulación europea establece que los estados deben controlar los productos pesqueros para asegurar que toxinas como ciguatoxinas no pasan al mercado pero no establece ningún límite de carga de toxina preciso ni método de detección (European Commission, 2003).

A los problemas de control y detección habría que sumar la dificultad de establecer límites legales de toxina por la dificultad que supone la obtención de datos toxicológicos en humanos.

Dentro de la Unión Europea, Francia es uno de los estados más afectados debido a sus territorios coloniales. En la Polinesia y La Réunion, se ha llevado a cabo durante años programas de control para recoger datos epidemiológicos y poder gestionar el riesgo de ciguatera y desde 2010 las autoridades regionales de Guadeloupe también envían datos de intoxicaciones y restos de pescado a los laboratorios de referencia franceses (Hossen et al., 2013). Sin embargo todavía son escasos los datos documentados de intoxicaciones donde se pueda establecer la cantidad de toxina a la que la persona ha estado expuesta, pues estos, se toman a partir de los restos de comida y la estimación

de la cantidad de pescado consumido y esta información no está siempre disponible. Basándose en los datos existentes de toxicidad aguda, la EFSA estableció en 2010 (EFSA, 2010) unos niveles recomendados (no de referencia) de toxicidad aguda (ARfD); es decir, la cantidad de sustancia que puede ser ingerida en un periodo de 24 horas o menos sin riesgo aparente para la salud. Estos niveles son para P-CTX-1, 0,01 µg P-CTX-1/kg pescado y 0,1 µg C-CTX-1/kg pescado para C-CTX-1 (Vernoux y Lewis, 1997).

Debido a la falta de regulaciones oficiales, Francia ha establecido, a nivel local, prohibiciones en la comercialización de algunos pescados susceptibles de contener CTXs u otras toxinas en áreas endémicas. Por ejemplo, en Guadeloupe la lista de peces que están completamente prohibidas o bajo restricciones para la pesca incluye especies de la familia *tetrodonidae* como los peces globo (en este caso debido a la tetrodotoxina, TTX), *Sphyræna* (conocidos vulgarmente como barracudas) y otros géneros como *Caranx*, *Seriola*, *Gymnothorax*, *Mycteroperca*, *Alphestes*, *Epinephelus* y *Lutjanus* (*Arrêté Préfectoral n° 2002/1249 du 19/08/2002*, 2002) (Figura 4). Sin embargo, como se ha dicho anteriormente, esta lista podría aumentar con el descubrimiento de nuevas especies que pueden acumular toxinas o con nuevos datos epidemiológicos que proporcionen mayor certidumbre a la hora de calcular los LOAEL y definir las especies susceptibles de acumular toxinas.

Guadeloupe es una de las zonas de la UE que se ve afectada por la ciguatera del Caribe (C-CTX), considerada un orden de magnitud menos tóxica que la del pacífico (P-CTX). Dada la dificultad de calcular los niveles tóxicos mínimos aceptables por la escasez de datos toxicológicos, se han centralizado esfuerzos en recoger todos los datos posibles en caso de intoxicación. Estos datos son centralizados en el ANSES donde se realizan bioensayos en ratón de los restos de comida. Para conocer los niveles reales de toxinas que pueden desencadenar síntomas el ANSES, el IRTA y el FDA realizaron un trabajo común analizando los remanentes de peces implicados en 27 intoxicaciones para detectar la cantidad de toxinas que pueden desencadenar los síntomas de la ciguatera. A pesar de los muchos avances que se han producido desde la década de los 60 respecto a la ciguatera, todavía quedan estas importantes cuestiones a mejorar, algunas de las cuales se han tratado en esta tesis y serán tratadas con más detalle en los apartados referidos a *resultados y discusión*.

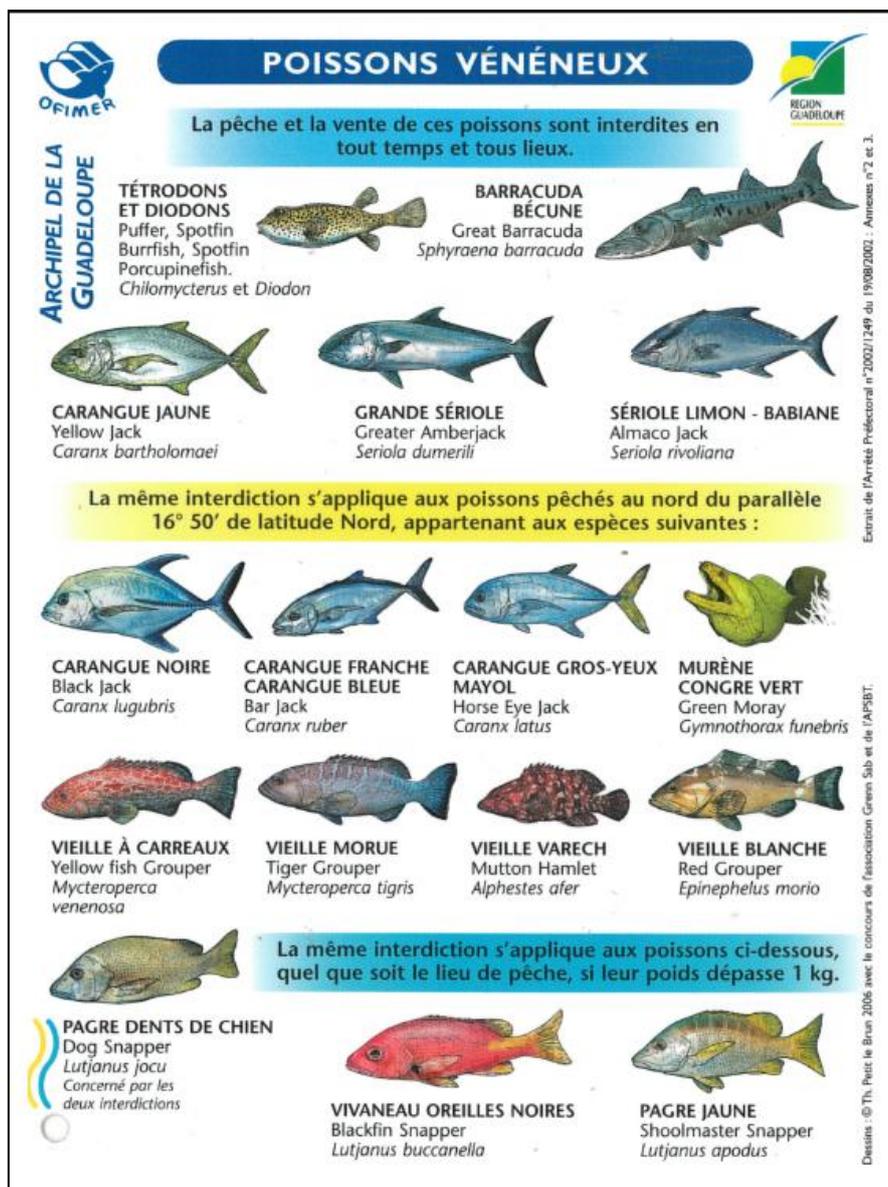


Figura 4. Anexo del decreto prefectural donde se muestran los peces prohibidos o bajo restricción en Guadeloupe (*Arrêté Préfectoral n° 2002/1249 du 19/08/2002, 2002*).

2.2. *Ostreopsis*, palitoxinas y ovatoxinas

El género *Ostreopsis* incluye varias especies de dinoflagelados tecados bentónicos. Hasta el momento nueve especies del género *Ostreopsis* han sido descritas, aunque su identificación es compleja y controvertida y se encuentra hoy en día en revisión (Penna et al., 2012, 2010, 2005; Sato et al., 2011).

Ostreopsis spp. viven asociados a corales, sobre el sedimento y macroalgas. Son comunes en aguas tropicales y subtropicales del Pacífico, Caribe e Índico, asociados muchas veces con episodios de ciguatera (Parsons et al., 2012; Rhodes, 2011), pero su

creciente expansión en aguas del Atlántico oriental y Mediterráneo la ha convertido en otro foco de atención en Europa. Esta microalga ha estado también asociada con el síndrome del clupeotoxismo, relacionado con el consumo de peces planctívoros, como sardinas, arenques y boquerones (pertenecientes a la familia clupeidae) (Halstead y Courville, 1965; Onuma et al., 1999; Riobó Agulla, 2006). Este síndrome está causado por toxinas de tipo palitoxina (PLTX), que produce el género *Ostreopsis*. Curiosamente el nombre de esta toxina proviene de un coral blando, llamado *Palythoa toxica* y que acumula PLTX, aunque no se ha esclarecido si por síntesis propia o adquirida por otros microorganismos (Carballeira et al., 1998; Piel, 2009; Seemann et al., 2009). La PLTX o sus derivados, por tanto, podrían acumularse a través de *Ostreopsis* en peces planctívoros y bivalvos cuando el fondo es resuspendido. En moluscos gasterópodos y equinodermos adquirirían la microalga depositada en las macroalgas o sedimento (Aligizaki et al., 2011). En humanos, las intoxicaciones por ingestión de PLTXs provocan síntomas como vómitos, diarreas, taquicardias, vértigos, dificultad respiratoria, parálisis muscular, convulsiones y en intoxicaciones graves la muerte. Por otra parte, la toxina puede causar afecciones a nivel cutáneo por contacto, por ejemplo con el coral o afecciones respiratorias cuando las microalgas son inhaladas en aerosoles formados por microgotas de agua de mar arrastradas por el viento (Aligizaki et al., 2008; Amzil et al., 2012; Biré et al., 2013; Ciminiello et al., 2008; EFSA, 2009c; Taniyama et al., 2003; Tubaro et al., 2011).

En el caso de *Ostreopsis* las recientes apariciones de la especie *O. siamensis* y *O. cf. ovata* en las costas orientales del Atlántico y el Mediterráneo (respectivamente) han traído estos problemas a nuestras costas (Aligizaki et al., 2008; Amzil et al., 2012; Biré et al., 2013; Casabianca et al., 2013; Ciminiello et al., 2013, 2008; Lopes et al., 2013; Penna et al., 2005; Pfannkuchen et al., 2012; Tubaro et al., 2011). Las toxinas mayoritarias en estas dos especies son las ostreocinas y las ovatoxinas, cuyo mecanismo de acción se considera similar al de las PLTXs, aunque en el caso de las ovatoxinas no había ningún estudio hasta ahora que lo confirmase. Se sabe que *Ostreopsis cf. ovata* produce ovatoxinas (OVTXs) y PLTX isobárica o *isobaric* PLTX (iPLTX) (antes llamada *putative*). Estas moléculas son largas cadenas de polialcoholes solubles en agua pero con regiones lipófilas (Ciminiello et al., 2008) (figura 5).

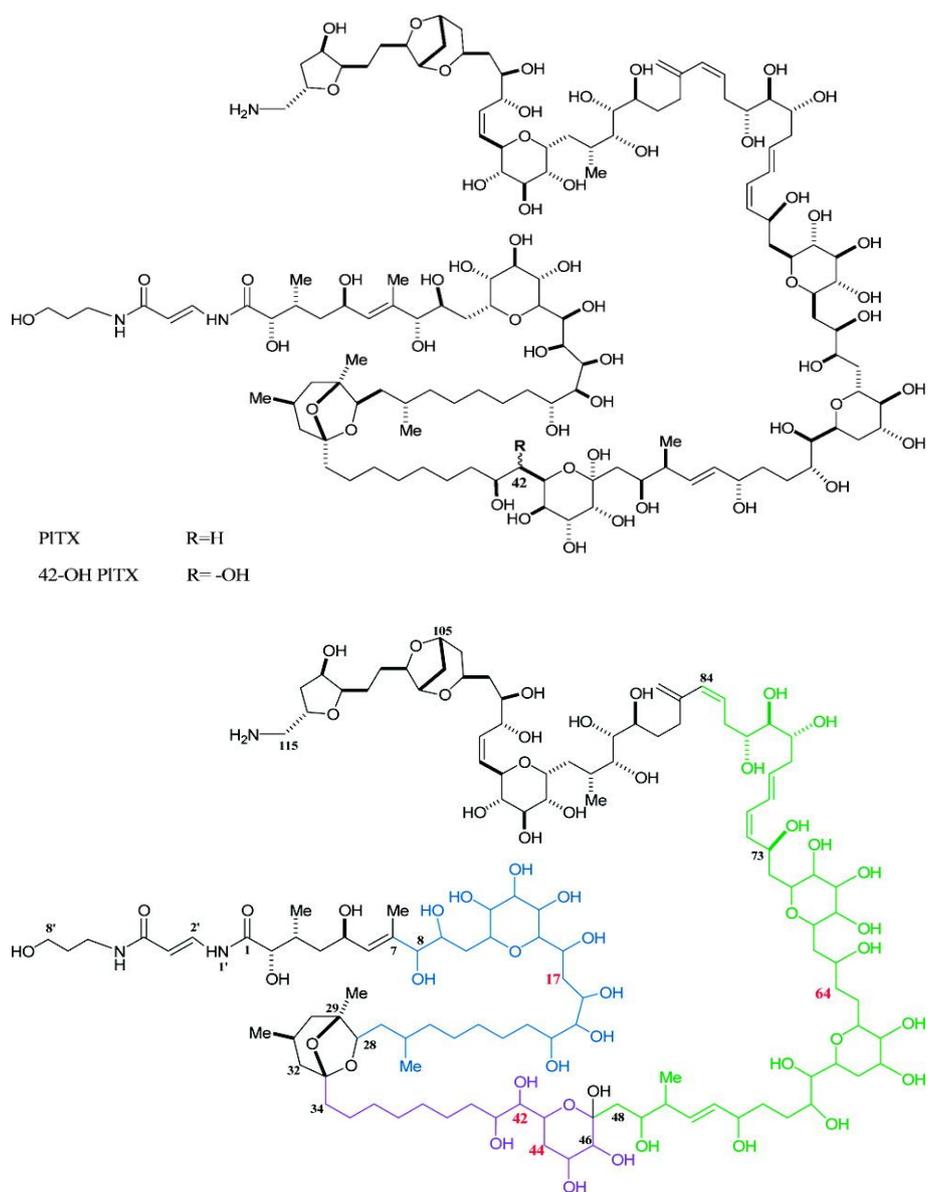


Figura 5. Estructuras de PLTX, 42-OH PLTX y OVTX-a. Figuras extraídas de (Ciminiello et al., 2012).

La mayoría de los datos disponibles sobre el mecanismo de acción de la PLTX son relativos a la PLTX extraída de *Palythoa toxica*, sin embargo, debido a la carencia de estándares, muy pocos estudios se han realizado con sus derivados (Cagide et al., 2009; Crinelli et al., 2012; Ito y Yasumoto, 2009; Ramos y Vasconcelos, 2010). En base estos estudios y otros realizados con extractos crudos de las microalgas productoras, estos derivados se consideran menos tóxicos pero con efectos similares a los de la PLTX de *Palythoa*.

Una amplia cantidad de estudios sugieren que la diana en mamíferos de la PLTX es la Na^+/K^+ -ATPasa (Bellocci et al., 2011; Frelin y Van Renterghem, 1995; Habermann, 1989; Rossini y Bigiani, 2011; Wu, 2009). Esta bomba cumple una importantísima función en la célula y es el principal mecanismo de regulación de flujos iónicos. Cuando la PLTX se une a la bomba la bloquea en su estado abierto convirtiéndola en un poro semi-selectivo (figura 6), pues se ha visto que este poro presenta mayor permeabilidad al Na^+ y K^+ pero baja al Ca^{2+} (Artigas y Gadsby, 2004, 2003a, 2003b). El fenómeno es complejo, puesto que la variabilidad de las subunidades de la bomba en diferentes tejidos puede hacer que la afinidad por la PLTX varíe (Blanco y Mercer, 1998). Incluso se ha propuesto que otras bombas o intercambiadores de este tipo podrían ser también diana de la PLTX, quizás con menor afinidad por estas (Frelin and Van Renterghem, 1995; Frelin et al., 1990; Scheiner-Bobis et al., 2002; Yoshizumi et al., 1991).

Los efectos del bloqueo de la bomba son el rápido flujo de Na^+ hacia el interior de la célula y consecuente despolarización y salida de iones K^+ hacia el exterior de la membrana. Esto produce también un rápido influjo de Ca^{2+} hacia el interior que acaba destruyendo la célula. (Habermann et al., 1989; Redondo et al., 1996; Wu, 2009). Además debido al importante papel que juega el calcio en diversas funciones celulares, concentraciones subletales de PLTX pueden afectar de forma irreversible la integridad celular, afectando al pH intracelular (Vale et al., 2006; Vale-González et al., 2007), citoesqueleto (Spira et al., 2001), procesos de apoptosis y señalización intracelular (Patergnani et al., 2011), inflamación vía activación de proteínas cinasas (Wattenberg, 2011) y daños en el DNA debido a la activación de endonucleasas (Ray et al., 1993) entre otros.

Las PLTXs también se consideran potentes factores pro-tumorales diferentes a los de tipo TPA (O-12-tetradecanoylphobol-13-acetato)(Fujiki y Sugimura, 1987; Fujiki et al., 1986). El mecanismo por el cual la PLTX actúa es a través de la estimulación de ácido araquidónico, producción de prostaglandinas y estimulación de factores de crecimiento (GF) y de proteínas cinasas (MAPK), como la c-jun N-terminal cinasa (JNK) y p38 (Wattenberg, 2011). Estos efectos parecen ser dependientes del tejido afectado

(Fujiki et al., 1986; Kuroki et al., 1997, 1996; Li y Wattenberg, 1999, 1998; Miura et al., 2006; Warmka et al., 2002; Wattenberg, 2007; Wattenberg et al., 1989, 1987).

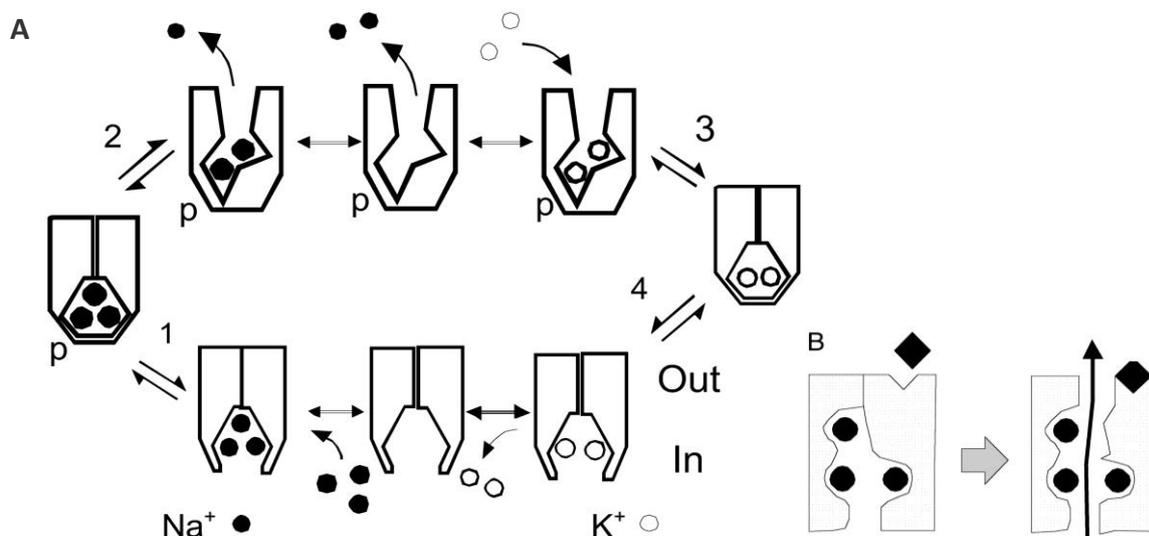


Figura 6. La figura A representa el mecanismo de transporte de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa. La figura B muestra el efecto de la PLTX cuando se une a la bomba, convirtiéndolo en un poro semi-inespecífico. Ambas figuras son extraídas de (Hilgemann, 2003).

Las inflamaciones e irritaciones de las vías respiratorias son también síntomas que se relacionan con la exposición a PLTXs y extractos de *Ostreopsis* spp. La producción de interleucinas y activación del NF- κ β , muy importantes en el control de los procesos inflamatorios también se han visto afectados por estas toxinas (Crinelli et al., 2012). Otros procesos que podrían estar afectados por la PLTX es la producción de caspasas implicadas en apoptosis o los procesos de reduplicación de ADN y ciclo celular (Valverde et al., 2008a, 2008b). En la siguiente figura (figura 7) se representan las principales vías del proceso inflamatorio en los que podría estar implicada la PLTX y sus derivados: Los factores de estrés en la célula provocan la síntesis de proteínas y factores de transducción (ILEs, TNF α , GF, MAPK) que activan la respuesta inmune (NF- κ β) y procesos de apoptosis (caspasa 3, JNK). Si los procesos inflamatorios son intensos o prolongados se producen fallos en el DNA (lo que induce a una elevada síntesis de proteínas histonas reparadoras como la γ H2ax) o irregularidades en el ciclo celular, es decir, la célula se divide indefinidamente debido a la producción del factor de proliferación celular Ki-67).

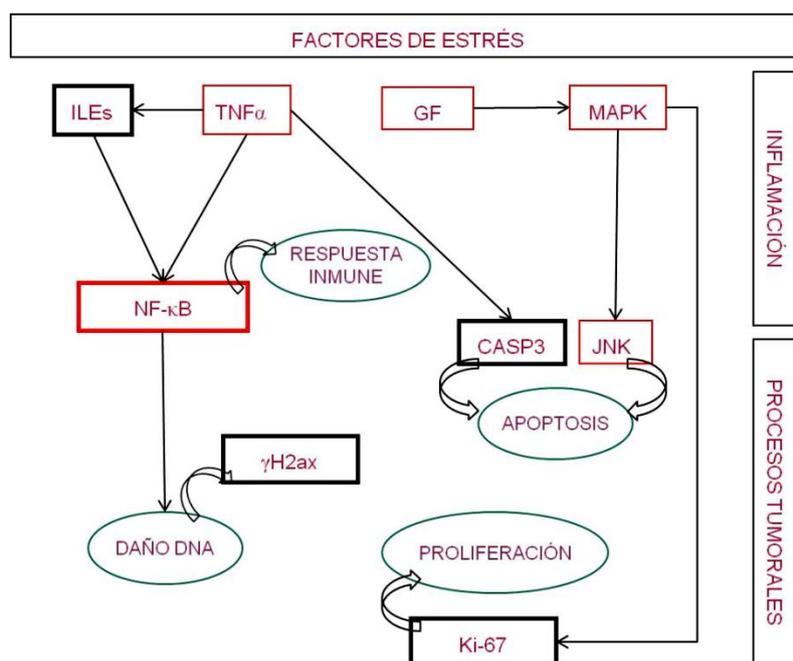


Figura 7. Principales vías del proceso inflamatorio y tumoral en las que la PLTX y derivados se sabe que están (en recuadro rojo) o podrían estar (recuadro negro) implicadas.

A pesar de que *O. cf. ovata* es la principal productora de OVTXs y la que más frecuentemente ha producido casos de toxicidad en el Mediterráneo (Aligizaki et al., 2008; Amzil et al., 2012; Biré et al., 2013; Casabianca et al., 2013; Ciminiello et al., 2008; Lopes et al., 2013; Pfannkuchen et al., 2012; Tubaro et al., 2011) no sabemos prácticamente nada de su toxicidad real, lo cual representa un problema a la hora de evaluar el riesgo real que puede suponer en áreas afectadas por *blooms* de esta microalga. Este objetivo ha sido tratado en esta tesis, gracias a la identificación de una cepa súper productora de OVTX- a y b. Este tema será tratado ampliamente en los apartados correspondientes a *resultados y discusión*.

Al igual que en el caso de las CTXs, no existen regulaciones ni métodos de referencia para el muestreo y detección de estas toxinas y como en el caso de las CTXs se han propuesto métodos cromatográficos como alternativa a los bioensayos con mamíferos. Otros posibles ensayos son los biosensores basados en técnicas inmunológicas (Bignami, 1993) o el ensayo basado en hemólisis de eritrocitos desarrollado por Riobó (Riobó Agulla, 2006), que ha probado ser útil y fiable. En los últimos años han surgido ensayos alternativos como el FPA (Fluorescence Polarization Assay) basado el marcaje del receptor y en la medida de la polarización de fluorescencia cuando se une el

ligando (Alfonso et al., 2012). Similar a éstos, se han desarrollado también biosensores ópticos donde las bombas se inmovilizan en chips SPR (Alfonso et al., 2013). Sin embargo, los intentos de desarrollar un CBA para PLTX, no han sido plenamente fructíferos. Aunque se han publicado trabajos en los que se proponían métodos basados en cultivos celulares, éstas publicaciones no se han traducido en una utilidad real o no han sido reproducibles en otros laboratorios (Bellocci et al., 2008; Cañete y Diogène, 2008; Espiña et al., 2009; Kerbrat et al., 2010; Ledreux et al., 2009; Pawlowicz et al., 2013). El desarrollo de un ensayo celular podría ser útil, como método de criba, previo a la confirmación con LC/MS. Dado que otros CBA utilizan Neuro-2a, sería conveniente el uso de un mismo cultivo para varias toxinas, lo que permitiría un ahorro en tiempo y recursos de los laboratorios de referencia.

2.3. *Dinophysis* y dinofisistoxinas

Este género está formado por especies cosmopolitas (figura 8) presentes prácticamente en todo el mundo (Gestal Otero, 2009). Son los responsables de la DSP, (diarrheic shellfish poisoning) o intoxicación diarreica por consumo de bivalvos. Sus síntomas son inflamación del tracto intestinal con diarreas, náuseas, vómitos y dolor abdominal. Los moluscos adquieren las toxinas al alimentarse de microalgas del género *Dinophysis* (Yasumoto et al., 1985). Hasta ahora se han detectado inequívocamente unas 10 especies de *Dinophysis* productoras de DSPs aunque solo 6 son las que frecuentemente producen casos de intoxicaciones alrededor del mundo (Reguera et al., 2012).

Existen otros géneros de dinoflagelados, como *Prorocentrum*, capaces de producir toxinas diarreicas (Amandine Caillaud et al., 2010; Morton et al., 1998) aunque hasta hoy no hay datos concluyentes de intoxicaciones producidas por éstos (Reguera et al., 2014).

Las toxinas producidas por estos géneros son el ácido okadaico (OA), y sus análogos las dinofisistoxinas DTX-1 y la DTX-2, sus precursores diol-ésteres DTX-4 y 5, junto con el grupo DTX-3 que son acil-derivados. El grupo de las dinofisistoxinas u okadatos son Poliéteres policíclicos y, como otras toxinas alimentarias, termoestables. La DTX-2 es

un isómero del OA y solo difieren en la posición de un grupo metil. La DTX-1 tiene un grupo metil adicional (Dominguez et al., 2010; Yasumoto et al., 1985) (figura 9).



Figura 8. Distribución geográfica de *Dinophysis*. Mapa de (Reguera et al., 2014).

La determinación de la especie causante de las intoxicaciones diarreicas fue todo un reto científico, pues el ciclo vital del género *Dinophysis* es realmente complejo; su alimentación es heterotrófica y no fue hasta el 2006 que se consiguió su cultivo reproduciendo su cadena alimentaria cryptophyta-ciliado-dinoflagelado (Park et al., 2006).

Estas toxinas actúan inhibiendo proteína fosfatasa y, dada las importantes y variadas funciones que cumplen estas proteínas en las células, la interferencia de las toxinas tiene consecuencias sobre diversos procesos fisiológicos: alteración del ciclo celular, modulación del metabolismo proteico de la célula (Bialojan y Takai, 1988; Rubiolo et al., 2011), inflamación en células intestinales (Munday, 2013; Yasumoto et al., 1985), etc. Además se ha comprobado que el okadaico y la DTX-1 son potentes promotores tumorales (Fujiki et al., 1991).

Para implantar los límites de referencia legales de toxinas en los alimentos debe establecerse la toxicidad aguda de ésta y la toxicidad relativa de sus derivados. Como normalmente todos estos derivados están presentes en microalgas o bivalvos la toxicidad relativa se mide normalmente en TEFs o factores equivalentes de toxicidad.

Este es un factor que describe la toxicidad de un compuesto concreto en función de una toxina de referencia, que en este caso es OA. Esto no quiere decir que la toxina de referencia sea la más tóxica. En algunos casos los análogos pueden presentar mayor toxicidad. En el caso de las DTXs, a pesar de los muchos estudios realizados respecto al ácido okadaico y sus derivados, los resultados respecto a la toxicidad de estos análogos resultaban en algunos casos contradictorios. Esto era debido principalmente a la inexistencia de estándares de referencia certificados de estos derivados en el momento de la realización de dichos estudios (Soliño et al., 2015a).

Los actuales factores de equivalencia, además, son basados en MBA intraperitoneal. Sin embargo no había este el momento datos claros de la relativa toxicidad de estos derivados en células. La combinación de diferentes tipos celulares puede dar información complementaria de las potencias relativas de cada toxina. Esta ampliación de la información puede darnos una visión global y más acertada de los TEFs reales, para mejor protección del consumidor.

Como en otros casos, desde el comienzo del análisis de alimentos para detección de DTXs a principios de los 80, el MBA ha sido sin duda el más utilizado y al igual que en otros casos está en vías de desaparición y será completamente reemplazado en 2015 (EC nº15/2011) (European Commission, 2011) por métodos analíticos y alternativamente, como sistema de cribado, los kits basados en inhibición de fosfatasas (OkaTest®, ZEU-Immunotec, Spain) según los reglamentos (EC) N° 2074/2005 y N° 15/2011 (European Commission, 2011, 2005). Estos test han sido probados con éxito en experiencias de interlaboratorios y son robustos y fiables (Smienk et al., 2013).

Los ensayos celulares, en este caso, pueden ser una herramienta para evaluar la toxicidad y aportar información complementaria sobre la actividad de la toxina, pues estos modelos son más representativos de un organismo vivo que los métodos analíticos o bioquímicos. También aportan información de cómo afecta la toxina a los diferentes tejidos y de qué modo. Todo ello hace que tener información acerca de los diferentes TEFs de las toxinas en diferentes tejidos sea una información útil. Durante la realización de esta tesis se llevó a término un estudio para evaluar la toxicidad relativa

de las DTX-1 y 2 y el OA en diferentes tipos celulares. Este tema se discutirá ampliamente en el apartado correspondiente a *resultados y discusión*.

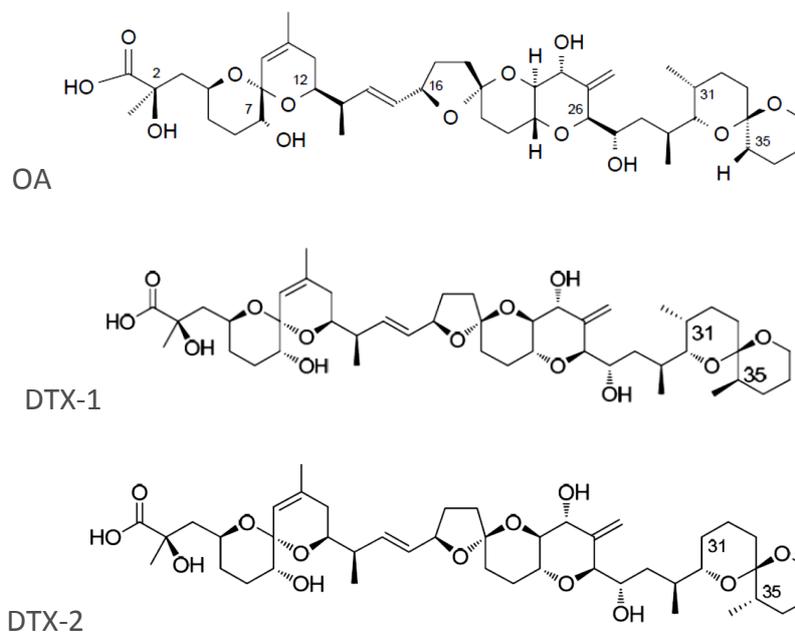


Figura 9. Estructuras de las dinofisistoxinas: OA, DTX-1 y DTX-2. Extraído de (Crain et al., 2012a, 2012b; Perez et al., 2008).

2.4. *Amphidinium* y amphidinoles

El género *Amphidinium* engloba dinoflagelados bentónicos desnudos (atecados) de la familia de los *Gymnodiniaceae* (O. Gymnodiniales). Las especies de este género están presentes en muchos lugares del mundo, también en mares templados como el Mediterráneo. La especie más común en aguas del Mediterráneo y Atlántico es *A. carterae* y ha ganado interés en los últimos años por su potencial como generador de sustancias bioactivas. Los compuestos tóxicos que produce no suelen causar problemas de salud en humanos, aunque sí se ha observado que causan mortalidades masivas en peces (Yasumoto et al., 1990). Los efectos observados por Rhodes *et al.* en extractos de *Amphidinium* sp. en el bioensayo en ratón (MBA), parecían ser síntomas de tipo neurotóxico: producían la muerte por parálisis respiratoria dos minutos después de la inyección del extracto crudo a dosis superiores de 1250 mg/ Kg. A bajas dosis (menores de 1000 mg/kg) el ratón permanecía inmóvil y su tasa respiratoria descendía pero se iba recuperando de forma gradual (Rhodes et al., 2010).

Además de ocasionar estos efectos tóxicos en animales, el género *Amphidinium* es una interesante fuente de bioactivos de tipo macrólido con propiedades antifúngicas, hemolíticas y citotóxicas como los amphidinoles, amphidinólidos, karatungioles, linghuioles y carteraoles (Kobayashi y Kubota, 2007).

De entre éstos, los más estudiados son los amphidinoles y amphidinólidos (figura 10). Se sabe que la toxicidad de los amphidinoles producidos por esta microalga viene dada por su actuación sobre las membranas celulares al aumentar su permeabilidad a cationes Na^+ y K^+ debido a la formación de un poro. Este poro se produce al unirse la toxina a fosfolípidos de membrana. Los mecanismos que implican su formación no están todavía claros, aunque sí son conocidos sus efectos sobre el equilibrio osmótico, el flujo de Ca^{2+} y la dependencia del colesterol y ergosterol en la formación de este poro (Echigoya et al., 2005; Houdai et al., 2004; Paul et al., 1997, 1995; Satake et al., 1991).

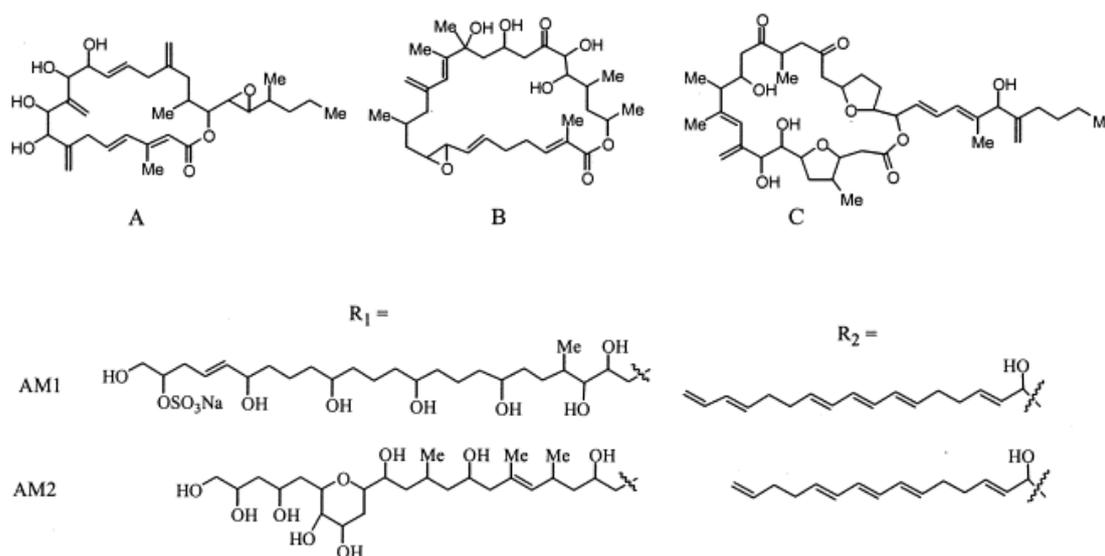


Figura 10. Estructuras de los amphidinólidos A, B y C (figuras superiores) y de los amphidinoles 1 y 2 (inferior). Extraído de (Rein y Borrone, 1999).

Los compuestos del grupo de los amphidinólidos estudiados hasta ahora incrementan la actividad de la ATP-asa actomiosina y activan el sistema contráctil del músculo esquelético (Kobayashi, 2008; Matsunaga et al., 1999; Saito et al., 2004; Usui et al., 2004).

Los ensayos biológicos han posicionado, por ejemplo, al Amphidinólido B entre los más citotóxicos de la familia de los Amphidinólidos, con valores de EC_{50} de 0,14 ng/mL en líneas celulares L1210 de leucemia murina, de 0,12 μ g/mL en células HCT 116 de cáncer de colon humano y 4,2 ng/mL en líneas celulares KB (Kobayashi et al., 1990). En trabajos con amphidinólido H se ha probado que tiene actividad anticancerígena mediante mecanismos de acción diferentes a los anticancerígenos conocidos hasta ahora (Kobayashi, 2008).

Muchos estudios señalan el potencial de estos compuestos para ser usados como antibióticos o antifúngicos y se han realizado muchos esfuerzos en lograr su síntesis en laboratorio.

Durante la realización de esta tesis se llevaron a cabo trabajos para aislar las sustancias potencialmente activas de *A. carterae* con el objeto de estudiar su efecto sobre flujos iónicos en cultivos primarios de cerebelo de rata.

2.5. *Karlodinium* y karlotoxinas

El género *Karlodinium*, al igual que el *Amphidinium* son dinoflagelados desnudos, con una amplia distribución geográfica y frecuente en aguas del Mediterráneo. Pertenece a la familia kareniaceae, familia que incluye dinoflagelados que producen toxinas, como *K.veneficum* (karlotoxinas), *Karenia brevis* (brevetoxinas), *Karenia mikimotoi* (gimnociminas), *Karenia selliformis* (gimnodimina) (Place et al., 2012). A pesar de que *K. veneficum*, no es un problema para la salud pública, no hay que dejar de tener en cuenta que algunos de sus parientes cercanos sí lo son.

El género *Karlodinium* ha sido asociado con mortalidad masiva de peces y se han visto efectos tóxicos en mejillón y juveniles de bacalao. En piscifactorías llegan a ser un grave problema por su capacidad de producir rápidamente “blooms” que causan daños y muertes en peces. Se ha comprobado que el *Karlodinium* expulsa gran parte de las karlotoxinas al agua y su modo de acción, aunque no está muy esclarecido, se cree que es similar al de los amphidinoles. Esto es mediante la formación de un poro en la membrana celular a través de su unión a fosfolípidos. El *Karlodinium* se protege a sí mismo de su propia toxina sintetizando esteroides de membrana especiales, 4- α -metil esteroides con dobles enlaces situados en posiciones diferentes de lo normal. El

colesterol y ergosterol parece que pueden “secuestrar” la karlotoxina-2 (KmTx2) y ofrecer cierta protección, evitando la auto-lisis (Mooney et al., 2009).

Las Karlotoxinas 1 y 2 son muy similares a Amphidinoles con fórmula molecular de $C_{69}H_{126}O_{24}$ (Van Wagoner et al., 2008) y $C_{67}H_{121}ClO_{24}$ (Peng et al., 2008) respectivamente (figura 11).

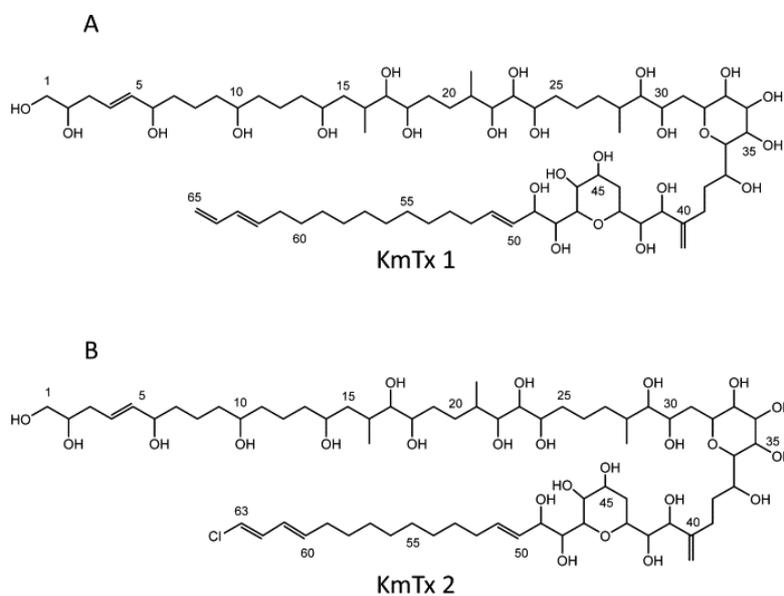


Figura 11. Estructuras de las karlotoxinas 1 y 2. Extraído de (Deeds et al., 2015).

Aunque se ha asociado siempre a *Karlodinium* como productor de Karlotoxinas, se ha observado que al realizar hidrólisis ácida en el extracto crudo y ser inyectado intraperitonealmente en ratón se producen efectos neurotóxicos similares a los de la brevetoxina. El extracto metanólico, sin embargo, no parece producir efectos nocivos agudos en ratón (Da Costa et al., 2005; Place et al., 2014). Al ser probado el mismo extracto en el ensayo hemolítico ocurría lo contrario: el extracto metanólico producía efectos y el ácido no (Da Costa et al., 2005). Estas observaciones nos permiten plantear la hipótesis de que esta especie podría producir otros compuestos de tipo más específico, como toxinas con dianas en canales iónicos. Esta hipótesis fue objeto de estudio de esta tesis, en la que se aislaron los compuestos activos de una cepa de *K. veneficum* para estudiar su efecto sobre flujos iónicos en cultivos primarios de cerebelo de rata.

2.6. *Karenia brevis* y brevetoxinas

Karenia es un género ubicuo, pudiendo encontrarse en aguas del Mediterráneo, Atlántico y Pacífico. A pesar de que muchas especies no son tóxicas y en aguas europeas no suelen causar problemas de salud pública, es frecuente en zonas de Florida y el golfo de México. Sus principales toxinas, las brevetoxinas (ver figura 12), se acumulan en bivalvos y producen el síndrome llamado NSP (neurotoxic shellfish poisoning), una intoxicación neurotóxica que afecta a humanos y otros animales como mamíferos marinos, aves y peces. En humanos, la NSP produce síntomas gastrointestinales moderados como náuseas, vómitos y diarreas y síntomas neurotóxicos graves como entumecimiento y hormigueo en los labios, boca y cara y en las extremidades, incluso parálisis de éstas o pérdida de coordinación. Puede darse también la reversión de la sensación térmica típica de la ciguatera, así como fatiga, desorientación y pérdida del habla (Friedman et al., 2008; Watkins et al., 2008).

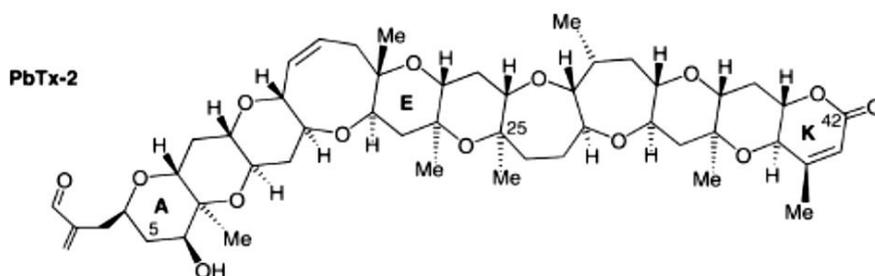


Figura 12. Estructura de la brevetoxina-2 (PbTx-2), extraído de (Daneshian et al., 2013).

Además su inhalación por aerosoles produce graves síntomas respiratorios y, como en otras toxinas, sus efectos a largo plazo a niveles subletales están todavía en estudio. En esta línea, ya se han visto afecciones en células del sistema inmunitario, inducción a la apoptosis, activación de factores implicados en la inflamación, efectos en el ciclo celular y estrés oxidativo (Fleming et al., 2011). Algunas especies de *Karenia* (*K. selliforme*) también pueden producir iminas cíclicas de tipo gimnodimina (Otero et al., 2011) e incluso otras especies no relacionadas con *Karenia* parecen poder producir brevetoxinas, como se ha visto en blooms de *Chattonella verruculosa* (Watkins et al., 2008).

En realidad estas toxinas no afectan directamente a la UE y tampoco han sido directamente estudiadas en esta tesis. No obstante, de forma lateral, influye en el hecho en que comparte mecanismo de acción con la CTX. La PbTx se une de forma específica al sitio 5 del VGSC y lo bloquea en estado abierto (LePage et al., 2003). Es por esto que puede ser una interferencia en el CBA de CTXs. Normalmente se argumenta que, en realidad, la interferencia es limitada puesto que el organismo portador es diferente (peces en ciguatera y moluscos en PbTx) pero algunos estudios han demostrado que ciertos peces planctívoros pueden acumular brevetoxinas (Woofter et al., 2005). Incluso se encontraron peces positivos para PbTx en los estómagos de delfines muertos debido a un bloom de *Karenia brevis* (Fleming et al., 2011; Naar et al., 2007). Otro de los argumentos que defiende la improbable interferencia de la PbTx en los ensayos de CTX es la rara coexistencia de ambas toxinas (Golfo de Mexico, PbTx y Caribe, CTX) pero la aparente expansión de ambas microalgas tóxicas podría cambiar también este hecho (Swinker et al., 2002). Por eso ha habido algunos intentos de discriminar PbTx de CTX mediante ensayos biológicos, como los trabajos de Dechraoui y colaboradores (Dechraoui et al., 2005), que combinaba CBA y RBA para distinguir ambas toxinas en función de su potencia relativa. La diferencia de potencial tóxico de CTX respecto a PbTx también se ha atribuido al bloqueo parcial de flujo de K^+ que produce la CTX (LePage et al., 2005).

Otro de los motivos por los que es interesante citar esta microalga es por su relación con el *Karlodinium* y la sintomatología encontrada en ratón en (Da Costa et al., 2005), donde se comentaba que eran síntomas similares a la PbTx.

3. MODELOS CÉLULARES USADOS EN ESTE ESTUDIO

El uso de cultivos *in vitro* presenta grandes ventajas cuando se trata de estudiar los efectos de un compuesto en el organismo. Respecto a los modelos *in vivo*, los modelos *in vitro* muestran menos variabilidad, el estado de las células puede ser observado bajo el microscopio (no hay que esperar hasta el final del experimento), además de la facilidad en el manejo y las insignificantes cuestiones éticas que plantean. Hoy en día se dispone de un amplio abanico de tipos celulares procedentes de tejidos que pueden ser fácilmente adquiridos comercialmente, con todas las garantías de calidad y

homogeneidad, con lo que los resultados obtenidos son más fácilmente comparables con los obtenidos en otros estudios. A la facilidad de adquisición se suma la relativa simplicidad en su mantenimiento y almacenamiento en el propio laboratorio y la posibilidad de inducir su diferenciación para obtener un modelo más representativo del tejido a estudiar.

También se dispone de un gran rango de ensayos desarrollados para modelos *in vitro* que miden y evalúan los principales parámetros implicados en la toxicidad como: citotoxicidad, genotoxicidad, inmunotoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad a nivel hepático o intestinal, estrés oxidativo, etc. A la hora de aplicar un modelo celular ya sea para detectar toxinas o para evaluar su efecto es importante seleccionar el modelo celular que mejor se ajuste a nuestro objetivo. Así, se deben considerar una serie de cuestiones como la facilidad en el manejo, la sensibilidad a la sustancia en cuestión, presencia de dianas farmacológicas de interés, si es representativo el modelo celular de lo que sucede en un organismo vivo, si se debe usar un cultivo primario o células inmortalizadas, de origen humano, animal, diferenciadas, no diferenciadas, híbridos, etc.

En la siguiente tabla se presenta un resumen de los diferentes efectos y medidas que pueden ser usados en estudios con modelos celulares (tabla 3).

Para la mayoría de los estudios realizados durante esta tesis se utilizaron células de neuroblastoma de ratón (Neuro-2a) indiferenciadas. Este tipo celular es de fácil manejo, presenta canales iónicos y ya se han desarrollado algunos CBA para estas células, con lo que disponemos de datos comparables. Son útiles para hacer un cribado rápido y detectar en qué muestras y a qué concentración se presenta la toxicidad, aunque en algunos casos para ver realmente esta toxicidad es necesaria la adición de agonistas como la ouabaina o la veratridina. Es el ejemplo de los ensayos para CTXs o brevetoxinas, en los que se crea un ambiente “artificial” para promover el efecto de la toxina que queremos detectar (LePage et al., 2005).

Estas células provienen de un tumor llamado neuroblastoma, en este caso de ratón, que afecta a neuroblastos. Los neuroblastos son células nerviosas precursoras de neuronas del sistema simpático, por lo que su principal diferencia con éstas es su

capacidad para dividirse. En cultivo se ha visto que solo un 16% de éstas desarrollan neuritas en ausencia de factores de crecimiento (LePage et al., 2005).

Tabla 3. Técnicas usadas en cultivos celulares para la medida de los diferentes efectos. Información extraída de (Stacey y Viviani, 2001).

Parámetro	Efecto	Ensayo
Viabilidad celular	Absorción del marcador en vivo	Rojo neutro
	Actividad mitocondrial	Reducción de MTT
	Liberación de enzimas citoplásmicas	Liberación de lactato deshidrogenasa
	Inicio de apoptosis	Morfología nuclear mediante propidio de iodo, determinación del DNA o fragmentos mediante ELISA
Funcionalidad celular	Síntesis de proteínas	Incorporación de H ³ -leucina
	Energía de metabolismo	Niveles de ATP por quimioluminiscencia o HPLC
	Actividad mitocondrial	Potencial de membrana mitocondrial
	Homeostasis de iones (Ca ²⁺ , Na ⁺)	Marcadores selectivos de iones y detección por fluorescencia
	Estatus oxidación-reducción	-Producción de especies reactivas de oxígeno -Niveles de glutatión
	Endocitosis de vesículas intracelulares	Liberación de neurotransmisores

Las células podrían diferenciarse mediante la adición de factores como el ácido retinoico. Las células diferenciadas desarrollan neuritas y es más representativo de un modelo neuronal, pero en nuestro caso se usaron células indiferenciadas ya que para nuestros objetivos (detección de toxinas) no era necesario. En este estado indiferenciado estas células expresan las dianas necesarias para la detección de las toxinas estudiadas.

La línea NG108-15 es otro modelo alternativo que puede actuar de forma similar a la Neuro-2a y que así se ha demostrado en otros estudios (Cañete et al., 2010). Estas células son un híbrido de neuroblastoma y glioma y contienen VGSC y receptores de

glutamato. Este modelo ya habían sido propuesto anteriormente como una alternativa para la detección de un amplio rango de toxinas marinas, tanto neurotoxinas como diarreas (Cañete y Diogène, 2010, 2008). El uso de dos o más tipos celulares también puede dar una idea de la potencia de la toxina puesto que los distintos tipos celulares responden de forma diferente. En este sentido, el uso de esta línea celular en los experimentos se limitó a la comparación de la respuesta con la ya bien establecida línea Neuro-2a y una línea epitelial como la MCF-7.

Las células MCF-7 provienen de adenocarcinoma de glándula mamaria humana (cáncer de mama), por tanto son células epiteliales. Poseen receptores de estrógeno y la capacidad de procesar estradiol, que tiene gran importancia en infinidad de procesos celulares, como la transcripción genética. Varios estudios han utilizado estas células para detección de toxinas marinas (Bellocci et al., 2008; Pierotti et al., 2003; Schirone et al., 2013) o evaluación de procesos celulares no dependientes de canales iónicos como endocitosis (Bellocci et al., 2010), apoptosis (Tripathi et al., 2012), citolisis (Prandi et al., 2011) o ciclo celular (Moon et al., 2010). El uso de estas células en nuestro estudio, como ya se ha dicho anteriormente, tenía como objetivo comparar la potencia de diferentes toxinas en diferentes tipos celulares (apartado 1.3. de *resultados y discusión*). En la siguiente figura (figura 13) se muestran las fotografías de estos tres tipos celulares extraídas de las fichas técnicas ATCC de las casas comerciales en las que fueron adquiridas (www.lgcstandards-atcc.org).

Aunque no pudo abordarse en esta tesis, otro de los interesantes posibles usos de diferentes modelos con características tan diferentes sería la aplicación de un método combinado donde en función del comportamiento diferente de una toxina a 3 modelos celulares diferentes se pudiera hacer un algoritmo que pudiera orientar la identificación de la toxina en cuestión (Sérandour et al., 2012).

En este trabajo se usaron tres tipos celulares humanas diferentes (A549, CaCo-2 y HepaRG) para el estudio sobre los efectos de las OVTXs en cuanto a su potencial inflamatorio y tumoral. Se sabe que las PLTXs y extractos de *Ostreopsis* causan irritación en las vías respiratorias, por eso decidimos usar la línea celular A-549

proveniente de un adenocarcinoma de tejido alveolar (cáncer de pulmón). Son células epiteliales, escamosas y que forman monocapas en cultivo, adheridas al sustrato.

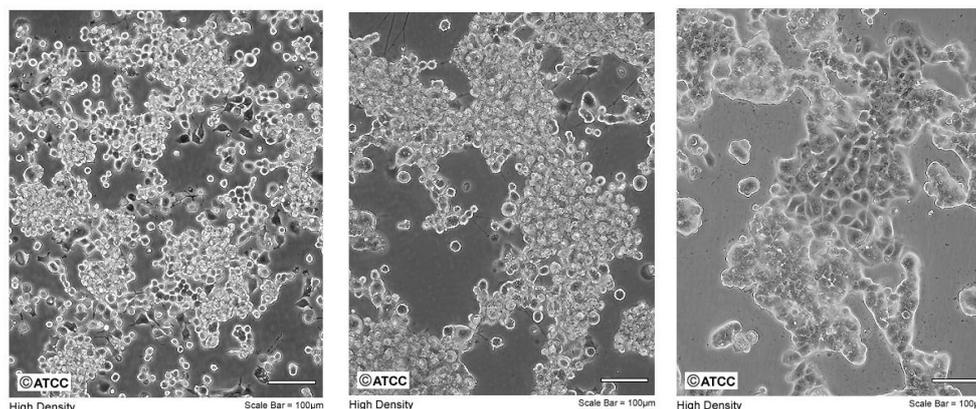


Figura 13. Fotografías de los modelos celulares Neuro-2a, NG108-15 y MCF-7 (de izquierda a derecha). La barra de escala representa 100 µm.

Además, las PLTXs y extractos de *Ostreopsis* muestran efectos negativos al ser consumidos a través de alimentos marinos, por lo que también se usaron las células de adenocarcinoma de colon humano CaCo-2. Estas células exhiben, por su origen tumoral, una mezcla de características de intestino normal adulto, colon normal adulto y de colon fetal (Harris, 1992). A pesar de estas limitaciones han demostrado ser el mejor modelo para estudiar la absorción intestinal de xenobióticos y su metabolismo pre sistémico.

En ambos casos anteriores se usaron células indiferenciadas, por una cuestión práctica, puesto que, en base a la experiencia previa con estas células, se consideró que la respuesta celular que buscábamos no presenta diferencias entre células diferenciadas y no diferenciadas.

Por último, usamos células de tejido hepático ya que estos tejidos tienen gran poder de detoxificación y metabolización de importantes proteínas del plasma, por lo tanto la posibilidad de reproducir la respuesta hepática es de vital importancia en toxicología. En este caso se usaron células diferenciadas de HepaRG. Este tejido fue inmortalizado a partir de células de hepatoma y retiene prácticamente todas las características y funciones del tejido hepático. Estas células cuando se siembran a baja densidad en presencia de DMSO se diferencian en dos tipos celulares, similares a los de los hepatocitos primarios adultos y células epiteliales biliares, incluidos los canales biliares

(Parent et al, 2004). La capacidad de estas células de sintetizar enzimas del citocromo P450, receptores nucleares y principales transportadores de membrana de las células hepáticas, enzimas de fase II y antioxidantes la han convertido en un modelo idóneo para estudios de toxicología (Marion 2011).

La figura 14 muestra las fotografías de estos tres tipos celulares extraídas de las fichas técnicas ATCC de las casas comerciales en las que fueron adquiridas (www.lgcstandards-atcc.org y www.heparg.com).

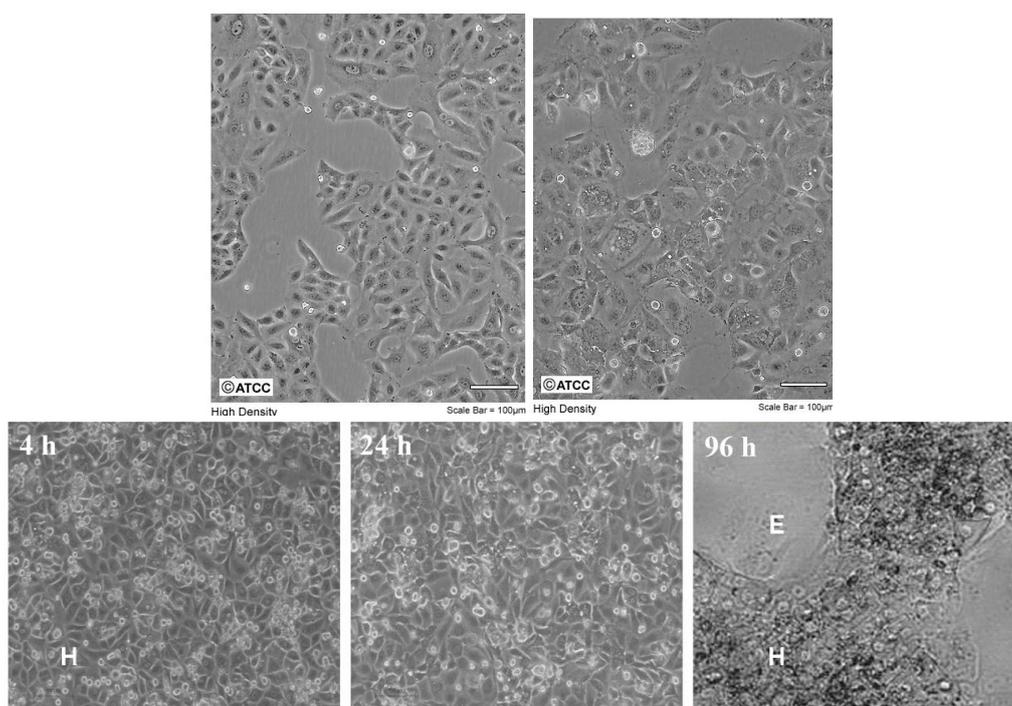


Figura 14. Células A540, CaCo2 (de izquierda a derecha, superior) y HepaRG en diferentes estados de diferenciación (inferior). La barra de escala representa 100 μm .

Los cultivos de células primarias son aisladas de un tejido animal, cultivado sin pasajes y finitas. Este tipo de cultivo posee características mucho más parecidas al tejido animal del que proviene que las células inmortalizadas, aunque esto conlleva una mayor variabilidad, mayores dificultades en el manejo y mayores costes (son necesarias instalaciones para albergar los animales). Los cultivos primarios fueron aislados de cerebelo de ratas. Las células granulares de cerebelo (CGC) son, a menudo, usadas como un modelo para el estudio del desarrollo neuronal, función y patología, incluyendo procesos de supervivencia o apoptosis y mecanismos de neuroprotección. Las CGC son generadas en el momento post natal y constituyen la mayor población

homogénea neuronal del cerebro de mamíferos. Su cultivo *in vitro* desarrolla características de CGC maduras *in vivo* como una extensa red neural, expresión de receptores de aminoácidos y producción y liberación de L-glutamato. Además han sido ampliamente estudiadas y bien caracterizadas por lo que la comparación entre estudios es aplicable. Esto hace de estos cultivos un sistema adecuado para el estudio de compuestos *in vitro* (Kramer, D Minichiello L, 2010). La figura 15 muestra una imagen de un cultivo de CGC (100 x).

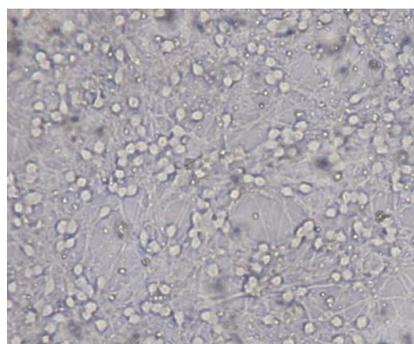


Figura 15. Fotografía de un cultivo de CGC en uno de los pozos de la placa de 24 pocillos.

En general los cultivos de células nerviosas pueden ser utilizadas siguiendo dos líneas estratégicas diferentes: primero, a través de modelos celulares simples para revelar los efectos “brutos” del compuesto (como las Neuro-2a) y, subsecuentemente ensayos más complejos y sutiles para elucidar el modo de acción de este compuesto (CGC) (Stacey y Viviani, 2001).

Para el estudio de compuestos bioactivos en microalgas se usó esta estrategia y los cultivos primarios de CGC fueron instrumentos para conocer los efectos sobre canales iónicos de las sustancias aisladas. Cuando el tóxico en cuestión es un alterador de flujos de cationes como sodio y potasio pueden utilizarse diferentes técnicas de medición de la concentración, tanto directas como indirectas, a través de la medición de los flujos de otros cationes abundantes en la célula, como el aumento de la concentración del Ca^{2+} intracelular. El uso de Neuro-2a para cribar los compuestos cito o neurotóxicos y de las CGC para observar los efectos sobre canales iónicos ha sido usado ampliamente pero se debe ser cauteloso a la hora de extrapolar resultados. Se ha visto por ejemplo que las CGC expresan unas 20 veces más VGSC que las Neuro-2a y además estas últimas no presentan receptores de glutamato, por tanto, algunas

toxinas como las CTXs, por ejemplo, no presentan una subida de Ca^{2+} en las Neuro-2a pero sí en CGC (LePage,2005).

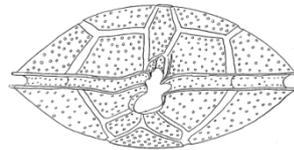
En la siguiente tabla (tabla 4) se muestra un resumen de las principales características de los tipos celulares descritos.

Tabla 4. Principales características de las células utilizadas en nuestros estudios. La información ha sido extraída de las fichas técnicas ATTC de las casas comerciales en las que fueron adquiridas («www.biopredict.com», s. f., «www.heparg.com», s. f., «www.lgstandards-atcc.org», s. f.) y de (Stacey y Viviani, 2001).

TIPO CELULAR	TIPO DE CULTIVO	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS	APLICACIONES
Neuro-2a	Neuroblastos (cerebro)	Tumor neuroblastoma desarrollado en cerebro de <i>Mus musculus</i>	Morfología ameboide, células adherentes. Produce grandes cantidades de proteína tubular	-Como célula huésped de transfección -Estudios de proteínas microtubulares -Estudios en desarrollo y migración neuronal -Toxicología y <i>screening</i> de nuevos fármacos -Diagnóstico rutinario de la enfermedad de la rabia
MCF-7	Glándula mamaria	Adenocarcinoma de glándula mamaria <i>Homo sapiens</i> raza caucásica	Adherentes, epiteliales. Poseen receptores de estrógeno y la capacidad de procesar estradiol	-Transcripción genética - Toxicología -Evaluación de procesos celulares no dependientes de canales iónicos.
NG108-15	Híbrido de neuroblastoma y glioma	<i>Mus musculus</i> (neuroblastoma) y <i>Rattus norvegicus</i> (glioma)	Adherentes, planas, redondeadas (10-100 µm de diámetro)	-Como célula huésped de transfección -Estudios en desarrollo y migración neuronal -Adhesión y crecimiento de neuritas -Toxicología y <i>screening</i> de nuevos fármacos
A549	Células alveolares de pulmón	Carcinoma pulmonar de <i>Homo sapiens</i> raza caucásica	Epiteliales, adherentes, escamosas y queratinizadas. Células hipotriploides. Sintetizan lecitina y poseen alta cantidad de ácidos grasos insaturados	-Como célula huésped de transfección -Estudios en cáncer de pulmón -Toxicología
CaCo-2	Células intestinales (colon)	Carcinoma colorectal de <i>Homo sapiens</i> raza caucásica	Morfología epitelial, adherentes. Expresa receptores de enterotoxinas y de factor de crecimiento epidérmico. Produce queratina y proteínas ligando de ácido retinoico.	-Como célula huésped de transfección -Estudios de función y diferenciación de enterocitos -Estudios en cáncer de colon -Efectos de virus y enterotoxinas -Toxicología

TIPO CELULAR	TIPO DE CULTIVO	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS	APLICACIONES
HepaRG	Hepatocitos y células biliares (en estado diferenciado)	Cáncer de hígado de <i>Homo sapiens</i> raza caucásica	Morfología y funciones de hepatocitos incluyendo la expresión de importantes enzimas metabólicas, receptores nucleares y transportadores de membrana. Posee alta actividad P450	<ul style="list-style-type: none"> -Estudios de metabolismo, detoxificación y transporte de xenobióticos -Estudios en cáncer -Estudios en enfermedades hepáticas (hepatitis) -Toxicología y cribado de nuevos fármacos -Eficacia de fármacos
CGC	Células granulares cerebelares	Cerebelo sano de rata de 7 días	Características propias de neuronas. A los 7 días las células diferenciadas desarrollan neuritas. Presentan gran excitabilidad, expresan receptores iónicos, de aminoácidos y de glutamato. Producción y liberación de L-glutamato	<ul style="list-style-type: none"> -Estudios de neurotoxicidad, degeneración neuronal y aprendizaje -Estudios en diferenciación, migración y plasticidad neuronal -Estudios de la función neural, potencial de acción y canales iónicos -Estudios de endocitosis y barrera hematoencefálica -Efectos de nuevos fármacos neuroactivos

OBJETIVOS

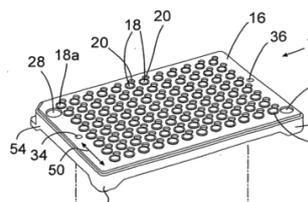
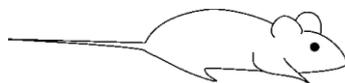


OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis era el aplicar los modelos basados en células que ya se usan en otros muchos campos de la toxicología al campo de las toxinas marinas, tanto para su detección como para caracterizar su mecanismo de acción. Estos estudios tienen como finalidad evaluar e identificar el riesgo que supone la presencia de estas toxinas en alimentos marinos para el consumidor final. Para ello se desarrollaron diferentes trabajos en el marco de esta tesis y de los cuales podemos destacar los siguientes objetivos secundarios:

- La aplicación de CBAs para la detección de CTXs en diferentes muestras de pescado.
- La determinación del riesgo de intoxicación por CTXs en el consumo de una nueva especie de pescado introducida en la gastronomía local (el pez león) en un área geográfica de las Antillas Francesas.
- La caracterización del riesgo del consumo de pescado contaminado por CTX en un área geográfica de las Antillas Francesas.
- La determinación de los factores de equivalencia de toxicidad (TEFs) en diferentes tipos celulares para toxinas de tipo DTX.
- La caracterización del mecanismo de acción sobre canales iónicos de compuestos sintetizados por *Amphidinium* y *Karlodinium*.
- La caracterización del efecto de las OVTXs sobre canales iónicos y sobre la respuesta inflamatoria y tumoral en células de diferentes tejidos.

MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVO DE MICROALGAS Y CAPTACIÓN DE TOXINAS DEL MEDIO

Los cultivos de microalgas realizados durante la tesis se iniciaron a partir de cepas aisladas previamente de muestras tomadas en las bahías del Delta del Ebro (Cataluña, España) o inmediaciones. El método de cultivo se ajustó a las necesidades de cada especie de microalga. Éstas eran cultivadas en el medio enriquecido con vitaminas, fosfatos, nitratos y metales a temperatura y salinidad adecuada para su crecimiento (Guillard, 1975; Provasoli, 1968). Los recipientes utilizados en cada caso variaron también en función del volumen y necesidades de cultivo (ver tabla 5). En todos los casos el fotoperiodo fue de 12:12 horas luz: oscuridad con iluminación luz día y una tasa de flujo de fotones de $80 \mu\text{Einstein m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

En las tablas 6 y 7, al final de este apartado, se presenta la relación de reactivos e instrumentos usados, así como su origen y casa comercial, necesarios para la ejecución de los protocolos descritos.

Tabla 5. Características de los cultivos de microalgas realizados en estos estudios.

Cepa	Origen	Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Salinidad (psu)	Recipiente
<i>A. carterae</i> cepa B14	Muestras aisladas de bentos en la bahía de Alfacs (Delta del Ebro) Año 2004	ES (<i>enriched seawater</i>) (Provasoli, 1968) (4mL/L)	24	36	Erlenmeyer, fermbatch y Botellones 8 L
<i>K. veneficum</i>	Bahía Alfacs punto central (40° 34' 54,4309" N; 0° 37' 37,474" E) Año 2007	ES (Provasoli, 1968) (4mL/L)	18	36	Frascos para cultivo celular de 250 y 500 mL y Botellones 8 L
<i>O. cf. ovata</i> cepa IRTA-SMM-11-09 (OSTR21)	Muestra aislada de <i>Jania Rubens</i> recogida en el Sur del Delta del Ebro (40° 33' 15,7176" N; 0° 31' 58,242" E) Año 2013	Guillard (sin silicatos) (4mL/L)	24	36	Frascos para cultivo celular de 250 y 500 mL

La estimación de la densidad de cultivo se hizo mediante cámaras de cultivo diferentes en función de la densidad de cultivo y tipo de microalga. Principalmente se usaron las cámaras Palmer-Maloney para conteo de *Amphidinium* y *Karlodinium* y cámaras Utermöhl para *Ostreopsis*. En la fotografía pueden verse algunos de los recipientes y cámaras de conteo usadas para los cultivos (figura 16).



Figura 16. De izquierda a derecha y de arriba abajo figuran los fermbatch, botellones 8 L, frascos de cultivo celular y algunas de las cámaras usadas para los recuentos: dos cámaras Utermöhl (centro derecha), una cámara Palmer-Maloney y una cámara Newbauer, esta última utilizada principalmente para los recuentos de los cultivos celulares.

Después de homogenizar bien el cultivo se tomaba una alícuota de 10 mL y se añadían unas gotas de lugol. En función de la densidad se contaban varios campos, varios transectos o el total de la superficie. Al menos tres alícuotas eran contadas por cada cepa, normalmente al inicio, durante la fase exponencial y al final de ésta. Cuando los cultivos alcanzaban este punto se procedía a su cosechado. Para ello se realizaba un primer filtrado para concentrar el cultivo y reducir el volumen de agua. Este concentrado se volvía a contar para comprobar que no hubiera habido pérdidas de microalgas. En el caso del *Amphidinium*, por ejemplo este pre-cosechado se realizó mediante un sistema de filtración inversa. En caso del *Karlodinium* no se realizó mientras que los *Ostreopsis* fueron pasados a través de una malla de plancton. Después de este paso se realizaba la filtración a través de filtros de fibra de vidrio GF en vacío. Los filtros

con las microalgas adheridas a éste eran guardadas en metanol 100% en una relación de 10 mL por cada 10^7 microalgas y conservados a -20°C hasta el momento de la extracción.

Cuando era necesaria la recogida del medio de cultivo para observar la cantidad de toxinas liberadas al medio, ésta se hacía al mismo tiempo que el cosechado. Después de la primera filtración de microalgas, el agua de cultivo era transferida a una botella limpia donde se le añadían las resinas de adsorción SPATT. Para ello, estas resinas eran previamente activadas en MeOH (10 mL/g) durante 24 horas con agitación suave. A continuación se filtraban y sumergían en agua miliQ (10 mL/g) donde se mantenían hidratadas a 4°C . Las resinas activadas se añadían al medio recolectado en una cantidad de (10 g de resina/L de medio de cultivo). Se dejaban durante un máximo de 5 días agitando regularmente y finalmente se recogían las resinas mediante un filtro. Éstas eran guardadas en MeOH a -20°C hasta el momento de la desadsorción de las resinas. Para desadsorber las resinas y extraer los compuestos atrapados en ellas, la resina era una vez más embebida en metanol (8 mL/g resina). Entonces, se dejaba en agitación suave durante 2 horas, después de las cuales se filtraban y se volvía a repetir la extracción. Llegado este punto se descartaba la resina, se mezclaban los extractos y se evaporaba el MeOH de forma que pudiera ser guardado a -20°C hasta el momento de su utilización. En las tablas 6 y 7 se presenta la relación de reactivos e instrumentos usados, así como su origen y casa comercial, necesarios para la ejecución de los protocolos descritos.

Tabla 6. Relación de instrumentos y aparatos usados para el cultivo de microalgas y captación de toxinas del medio.

Equipo	Casa comercial	Ciudad (País)
Stainless Steel Palmer Counting Cell	Wildco	Yulee (USA)
Cámara Utermöhl	Bioweb	Atlanta (USA)
Plankton counting chamber (0,5mL)	Hydro-Bios	Kiel-Holtenau (Alemania)
Microscopio	Leica DM-IL	Solms (Alemania)
Bomba de vacío	Millipore	Billerica (USA)
Iluminación QSL-2100 Radiometer	Biospherical instruments	San Diego (USA)
Filtros GF/F	Whatman	Springfield Mill (UK)
Frascos para cultivo celular estériles no tratados (25 y 150 cm^2) Nunc	Thermoscientific	Walthman, MA (USA)
Resinas SPATT HP20 DIAON®	Mitsubishi Chemical Co.	Tokyo (Japón)
Agitador stuart	Biocote	Coventry (UK)
Manga de plancton	Wildco	Yulee (USA)

Tabla 7. Relación de medios y reactivos usados para el cultivo de microalgas y captación de toxinas en el medio de cultivo.

Medio/reactivo	Casa comercial	Ciudad (País)
Guillard's f/2	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
NaNO ₃	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
HNa ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Cl ₃ Fe6H ₂ O	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
H ₃ BO ₃	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Co.Cl ₂ .6H ₂ O	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
MnCl ₂ .4H ₂ O	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
ZnCl ₂	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Tiamina.HCl	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Biotina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Vitamina B12	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Metanol absoluto (grado HPLC)	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)

2. EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO

En las tablas 13 y 14 al final de este apartado se recoge la información referente a los instrumentos y aparatos, así como medios y reactivos, usados para llevar a cabo las extracciones y fraccionamientos descritos a continuación.

2.1. Microalgas

Una vez cosechados los cultivos se procedía a la extracción de los bioactivos. La extracción variaba ligeramente en torno al tipo de microalga, aunque los pasos básicos de la extracción eran los mismos. Para la extracción es necesario en primer lugar romper las células mediante una sonda de ultrasonidos. Esto se llevaba a cabo entre 20 y 30 minutos en pulsos (5 pulsos/segundo) dependiendo de la dureza de la microalga.

En el caso de los *Amphidinium* y *Karlodinium* la sonicación se realizaba con microaguja, en modo pulso y a amplitud 30. Al ser dinoflagelados desnudos dos ciclos de 20 minutos eran suficientes. En el caso de los *Ostreopsis* fue necesario utilizar una aguja macro, a amplitud 70 con pulsos y 3 ciclos de 30 minutos como mínimo. La efectividad de este proceso se comprobaba tomando una gota del extracto y observando la rotura de las microalgas bajo el microscopio. Una vez realizada la extracción, el proceso era el mismo en todos los casos: se

tomaba el homogenizado de filtros con microalgas en metanol y se centrifugaba 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se filtraba a través de un filtro de nylon de 0,45 μ M con ayuda de una jeringa y se repetía el ciclo de sonicación, centrifugado y filtración. Al final del proceso los sobrenadantes se mezclaban y el extracto podía ser usado directamente o almacenado a -20°C hasta que fuera necesario.

Cuando era necesario depurar o identificar los bioactivos en el extracto se realizaban fraccionamientos basados en las propiedades químicas de los compuestos de interés. Dependiendo del objetivo de cada estudio, del número de fracciones necesarias y cantidad de compuesto que se necesitara se realizaban los fraccionamientos de forma diferente: Para una depuración previa o si el número de fracciones no era muy elevado se realizaban mediante un colector de fracciones para extracción en fase sólida al vacío (Vac-Elut SPE). El cartucho era, en primer lugar, lavado con MeOH puro y acondicionado con 20 mL de la primera dilución. Entonces se cargaba 1 mL del extracto y cada fracción era recogida consecutivamente por elución al añadir cada solvente, normalmente con polaridades en incremento.

Este mismo proceso puede realizarse de forma automatizada con cartucho SPE con un fraccionador automático, (Fraccionador Rapid trace SPE Workstation C18), o con un cromatógrafo (Waters 996 Photodiode Array Detector) al que se le ajusta una columna de tamaño suficiente para recoger un buen volumen de muestra y al que se acoplaba un tambor para recoger hasta 100 fracciones. Por último, también se realizó la recolección de una fracción determinada mediante un cromatógrafo acoplado a un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo al que se le programaba para “rechazar” la fracción conocida de interés. Por ejemplo, el sistema que finalmente fue utilizado para recoger un volumen importante de OVTX-a fue recoger el eluyente entre 8,4 y 9,2 minutos, sabiendo que la OVTX-a eluye a 8,6 min. Para esto se utilizó la válvula de desvío con 2 posiciones (Applied Biosystems, Foster City, CA) y se programaron 100 inyecciones de 10 μ L. El volumen final (16 mL) se evaporó en nitrógeno y se resuspendió en 1 mL de MeOH.

Para llegar a la obtención de los compuestos de interés se usaron todos estos sistemas, aplicando diferentes rangos de solventes y tiempos de retención, aunque finalmente no todos ellos fueron validados. En las siguientes tablas (tablas 8-12) se reflejan los protocolos usados para cada microalga.

Amphidinium carterae (extracto crudo)

Tabla 8. Protocolo de fraccionamiento aplicado al extracto crudo de *A.carterae* mediante un colector de fracciones para extracción en fase sólida al vacío (Vac-Elut SPE). Cartucho C18 de 1000 mg (6mL).

Rango de solventes		Fracciones	Flujo
A (metanol)	B (agua)		
20	80	F1	2,5 mL/min
30	70	F2	
40	60	F3	
45	55	F4	
50	50	F5	
60	40	F6	
65	35	F7	
70	30	F8	
75	25	F9	
80	20	F10	
85	15	F11	
90	10	F12	
95	5	F13	
100	0	F14	
100	0	F15	

Amphidinium carterae (fracción 9)

Tabla 9. Protocolo de fraccionamiento aplicado a la fracción 9 de *A.carterae* mediante un colector de fracciones para extracción en fase sólida al vacío (Vac-Elut SPE). Cartucho C18 de 1000 mg (6mL).

Rango de solventes		Fracciones	Flujo
A (metanol)	B (agua)		
60	40	F1-17	2,5 mL/min
80	20	F18-24	
100	0	F25	

Karlodinium veneficum

Tabla 10. Protocolo de fraccionamiento aplicado al extracto crudo de *K. veneficum* mediante un fraccionador Rapid trace SPE Workstation. Cartucho C18 de 500 mg (3mL).

Rango de solventes		Fracciones	Flujo
A (metanol)	B (agua)		
20	80	F1	1 mL/min
30	70	F2	
40	60	F3	
45	55	F4	
50	50	F5	
60	40	F6	
65	35	F7	
70	30	F8	
75	25	F9	
80	20	F10	
85	15	F11	
90	10	F12	
95	5	F13	
100	0	F14	
100	0	F15	

Ostreopsis cf. ovata

Tabla 11. Protocolo de fraccionamiento aplicado al extracto crudo de *Ostreopsis cf. ovata* mediante un cromatógrafo Waters 996 Photodiode Array Detector + Waters System Controlar 600-MS (Millipore)+ fraction collector Frac-100 Pharmacia Biotech Amersham Biosciences Uppsala Suecia. Columna Luna 10 µm C18 250x21,2 mm. Temperatura ambiente.

Rango de solventes		Fracciones o tiempo retención (minutos)	Flujo
A (H ₂ O+30mM ácido acético)	B (95%Acetonitrilo+5%H ₂ O 30mM ácido acético)		
95	5	0	10 mL/min
95	5	10	
70	30	30	
20	80	40	
2	98	51	
2	98	56	
95	5	61	

Tabla 12. Protocolo de fraccionamiento aplicado al extracto crudo de *O. cf. ovata* mediante un cromatógrafo Triple cuadrupolo Agilent 1200 LC System, columna Acquity UPLC C18 1,7 μm 50 x 2,1 mm, a temperatura 30 $^{\circ}\text{C}$.

Rango de solventes		Tiempo de retención (min)	Flujo
A (H ₂ O 30mM ácido acético)	B (95%Acetonitrilo+5%H ₂ O 30mM ácido acético)		
75	25	0	0,2 mL/min
70	30	8,2	
0	100	8,8	
0	100	12,0	
75	25	12,5	
75	25	17	

2.2. Muestras de pescado

La extracción de los pescados para la determinación de CTXs mediante CBA se realizó de acuerdo con el protocolo de Lewis, 2003 (Lewis, 2003). Brevemente, 10 gramos de pescado, previamente homogenizados, eran cocinados a 70 $^{\circ}\text{C}$, 10 minutos y extraídos en 30 mL de acetona mediante un ultraturrax. El homogenizado se centrifugaba (3000 g, 10 minutos) y, acto seguido, el sobrenadante se reservaba. El precipitado era extraído con acetona una vez más, tras lo cual ambos sobrenadantes se mezclaban y filtraban con filtros de Nylon de 0,45 μm . Para la extracción de lípidos se realizaba una doble partición con solventes orgánicos. Para ello el extracto en acetona era evaporado y al extracto seco se le añadía iguales volúmenes (5 mL) de una disolución acuosa de metanol (9:1 metanol: agua, v:v) y n-hexano. Después de 24 horas la fracción de hexano se descartaba y la partición se repetía. Después de ésta, las fracciones metanólicas se mezclaban y evaporaban. El residuo seco era otra vez sometido a una partición líquido: líquido con 5 mL de etanol: agua (1:3, v:v) y dietiléter, procediendo de manera similar a la anterior. En este caso, las fracciones éter eran reservadas, mezcladas y evaporadas. El residuo seco de las fracciones éter era entonces resuspendido en metanol 100% y guardado a -20 $^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Para las extracciones y fraccionamientos todas las soluciones fueron previamente filtradas por 0,2 μm (incluido el agua miliQ) y aquellas empleadas en los HPLC, previamente desgasificadas en baño de ultrasonido.

En la siguiente figura (figura 17) se observan algunos de los sistemas utilizados en los protocolos descritos en este apartado.



Figura 17. De izquierda a derecha y de arriba abajo: proceso de extracción de pescado con ultraturrax, sonda de ultrasonidos empleada para la extracción de microalgas, cromatógrafo utilizado para los fraccionamientos, carro de fracciones y rotavapores utilizados para la evaporación de estas fracciones y extractos.

En las siguientes tablas se recoge la relación de aparatos e instrumentos (tabla 13) y medios y reactivos usados (tabla 14) para llevar a cabo las extracciones y fraccionamientos descritos anteriormente.

Tabla 13. Relación de equipos y dispositivos usados en las extracciones y fraccionamientos.

Equipo	Casa comercial	Ciudad (País)
Sonda	Sonics Vibracell	Newtown (USA)
Balanza	Sartorius	Madrid (España)
Baño ultrasonidos	Biogen	Madrid (España)
Batidora de mano	Russell Hobbs	Madrid (España)
Ultraturrax	IKA®-WERKE	Staufen (Alemania)
Vórtex	VWR-España	Barcelona (España)
Centrífuga	Joan MR23i	Saint Herblain (Francia)

Equipo	Casa comercial	Ciudad (País)
Evaporador Büchi R-200,	Büchi	Flawil (Suiza)
Evaporador nitrógeno	TurboVap, Caliper	Hopkinton (USA)
Baño Multi-Blok® Heater	Lab-Line Instruments Inc.	Maharashtra (India)
Baño	Memmert	Munich (Alemania)
Filtros	Thermoscientific	Waltham, MA (USA)
Soporte fracción	Colector Vac-Elut SPE Varian	Harbor City, CA (USA)
Fraccionador Rapid trace SPE Workstation	Biotage	Uppsala (Suecia)
Cromatógrafo Waters 996 Photodiode Array Detector	Waters	Massachussets (USA)
Fraction collector Frac-100	Biotage	Uppsala (Sweden)
Triple cuadrupolo Agilen 1200 LC System	Applied Biosystems	Foster City, CA (USA)
CartuchoSPE C18 de 500 mg	Florisil	BakerBond (USA)
Columna Luna 10 µm C18 250x21,2 mm	Waters	Massachussets (USA)
Columna Acquity UPLC C18 1,7 µm 50 x 2,1 mm	Waters	Massachussets (USA)

Tabla 14. Relación de medios y reactivos usados para las extracciones y fraccionamientos.

Medio/reactivo	Casa comercial	Ciudad (País)
Acetonitrilo Grado HPLC	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
Ácido acético Grado HPLC	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
NaOH	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
HCl	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
Metanol Grado HPLC	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
Acetona Grado HPLC	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
Dietil éter Grado HPLC	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Etanol Grado HPLC	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)

3. DETECCIÓN CROMATOGRÁFICA

La detección cromatográfica mediante LC-MS fue llevada a cabo por personal técnico especializado del IRTA, personal de la USA Food and Drug Administration (FDA) y del Departamento de Química de las Sustancias Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Nápoles Federico II junto con personal IRTA, durante una estancia de investigación.

La detección cromatográfica de *Amphidinium* se llevó a cabo en un cromatógrafo Agilent 1200 LC con un triple cuadrupolo 3200 QTRAP® equipado con una fuente de electrospray TurboV, operando en modo positivo. Se utilizó una columna X-Bridge™ C8, con una temperatura del horno de 30° C y un flujo de 0,5 mL/min. Las fases móviles alcalinas se prepararon según (Gerssen et al., 2009); fase móvil A: 6,7 mM de amonio en agua Mili-Q; fase móvil B: 6,7 mM de amonio en 90/10 v/v acetonitrilo:agua Mili-Q y filtradas con un filtro de membrana de nylon (0,2 µm). El programa de gradiente utilizado fue optimizado previamente (Houdai et al., 2008). Se realizó un scan MS y un scan MS2 de iones producto sobre el ión precursor 1361 m/z (el ión más abundante en el scan MS) a energías de colisión 10, 80, 130 V.

La detección de C-CTX fue confirmada por el FDA en extractos de peces usando un LC-MS/MS basándose en los estudios previos (Abraham et al., 2012; R., 2008; Robertson et al., 2014) con modificaciones. El sistema consistió en un aparato de cromatografía líquida Agilent 1260 series acoplado a un espectrofotómetro de masas QTRAP 4000 triple cuádruplo con trampa de iones. La separación cromatográfica fue llevada a cabo con una columna Kinetex C8 (75 x 2,1 mm 2,6 µm talla de partícula) equipada con un filtro en línea Phenomenex KrudKatcher Ultra HPLC in-line filter (0,5 µm profundidad x 0,004 en ID) ambos mantenidos a 40 °C. El flujo era fijado a 0,3 mL/min y el volumen inyectado de 10 µL. La fase móvil consistía en agua (A) y 95% de acetonitrilo acuoso, ambos con 5 mM de formato de amonio. El programa de elución empezaba con un gradiente lineal de 10%B a 90% sobre 1,5 minutos, mantenido durante 4,5 minutos y volviendo a 10% de B en 0,5 minutos para eluir la C-CTX. La columna era equilibrada con 10% B durante 5 minutos previamente al siguiente análisis. El espectrofotómetro de masas con ionización *turbo ion-spray ionization* era operado en modo ion positivo usando MRM (*multiple reaction monitoring*). Los parámetros fueron los siguientes: la fuente de temperatura fue de 400°C, voltaje *ion-spray* 5 kV, cortina de gas 20 psi, fuente de ion gas 1 y 2 ambos establecidos a 50 psi y gas de colisión programado a nivel medio.

Otros parámetros específicos fueron: potencial de *declustering*, potencial de entrada y potenciales de célula de salida 120 V, 10 V y 15 V, respectivamente; La energía de colisión fue ajustada a 35 eV, y el tiempo de residencia *dwel time* fue 175 ms, pues fue aplicada a todos los iones de transición. Los datos fueron adquiridos con el *Analyst software*, versión 1.6.1. La confirmación de C-CTX fue basada en la comparación del tiempo de retención de un estándar de referencia de C-CTX y la presencia de múltiples iones de transición desde la forma más

estable de C-CTX [M+H-H₂O]⁺. Las transiciones monitorizadas fueron las siguientes: *m/z* 1123,6 > 1105,6; 1123,6 > 1087,6; 1123,6 > 1069,6. El estándar de C-CTX usado para la confirmación del análisis fue obtenido de USA FDA, Gulf Coast Seafood Laboratory, Dauphin Island AL, USA.

La detección de PLTXs y OVTXs se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

El extracto semipurificado de OVTX se analizó mediante un sistema híbrido de espectrómetro de masas Orbitrap y trampa iónica linear LTQ (*LC-HRMSⁿ hybrid linear ion trap LTQ Orbitrap XL Fourier transform mass spectrometer (FTMS)*), de acuerdo al protocolo de (Ciminiello et al., 2010). La cepa OOAN0601 proveniente del Mar Adriático (Ciminiello et al., 2012) se usó como referencia para comprobar los tiempos de retención y comportamiento de ionización para las OVTXs.

Los experimentos de espectrometría de masas de alta resolución (ionización positiva) fueron realizados en el rango de *m/z* 700-1600 con un poder de resolución de 60.000 (FWHM a 400 *m/z*). La fórmula molecular era asignada al pico mono-isotópico del diagnóstico de iones de doble carga y triple carga (Ciminiello et al., 2010) y el patrón de cada clúster de iones fue tomado en consideración para la identificación. Las tentativas de cuantificación se realizaron mediante doble inyección con un estándar de PLTX de 1000 ng/mL en metanol: agua (1:1, v:v).

En las siguientes tablas (tablas 15 y 16) se presenta la relación de reactivos y aparatos usados.

Tabla 15. Relación de aparatos usados para la detección cromatográfica.

Equipo	Casa comercial	Ciudad (país)
Cromatógrafo Agilent 1200 LC con un triple cuadrupolo 3200 QTRAP®	Agilent Technologies	Palo Alto, CA (USA)
HPLC Agilent 1260 series	Agilent Technologies	Palo Alto, CA (USA)
Espectrofotómetro de masas QTRAP 4000 triple cuadrupolo con trampa de iones	Applied Biosystems, Inc.	Foster City, CA (USA)
Columna Kinetex C8 (75 x 2,1 mm, 2,6 µm talla de partícula)	Phenomenex	Torrance, CA (USA)
Phenomenex KrudKatcher Ultra HPLC in-line filter	Phenomenex	Torrance, CA (USA)
LC-HRMS ⁿ on a hybrid linear ion trap LTQ Orbitrap XL Fourier transform mass spectrometer (FTMS)	ThermoScientific	Waltham, MA (USA)

Tabla 16. Relación de medios y reactivos usados para la detección cromatográfica.

Medio/reactivo	Casa comercial	Ciudad (país)
Acetonitrilo Grado HPLC	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
Acido acético Grado HPLC	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
Metanol Grado HPLC	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
Formato de amonio	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)

4. MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

Para la conservación a largo plazo de las células, éstas se mantenían congeladas en viales de criopreservación en *dewers* en nitrógeno líquido (-170°C). Los protocolos de congelación/descongelación se realizaban como se describe a continuación.

Para la congelación de las células, aproximadamente 2-3 millones de células eran introducidas en viales de criopreservación (previamente rotulados para su identificación) en 1 mL de volumen. El medio de congelación consistía en medio de cultivo al 20% de FBS y un 10% de DMSO. Una vez dispensadas las células, eran sometidas a temperaturas decrecientes, de forma que se mantenían una hora a -20°C, 1 hora a -80°C y por último, introducidas en nitrógeno líquido.

Para la descongelación de los viales criopreservados, cada vial era recuperado del *dewer* de nitrógeno líquido y se introducía en el baño a 37°C un minuto, aproximadamente. Cuando el medio comenzaba a licuarse, el total del volumen era pasado a un tubo de centrifuga con unos 10 mL de medio de cultivo a temperatura ambiente. Éste se centrifugaba (1500 rpm, 5 min.), se eliminaba el sobrenadante y las células se resuspendían en medio de cultivo (10% FBS) previamente atemperado a 37°C. Finalmente, el homogenizado se introducía en un frasco de cultivo celular de superficie 25 cm² y se mantenía en el incubador a 37°C en ambiente húmedo y un 5% de CO₂ para proceder a su cultivo.

Todos los pasos se realizaban bajo condiciones de esterilidad.

El mantenimiento de las diferentes líneas celulares estables, independientemente de la línea utilizada, se llevó a cabo de forma similar. Las células eran mantenidas en ambiente estéril a temperatura 37°C y ambiente húmedo con 5% de CO₂ en un frasco de cultivo celular de superficie 75 cm². Dos veces por semana se reducía su densidad con ayuda de tripsina, si era

necesario, y resembraban en un nuevo frasco. Una vez por semana se realizaba un cambio de medio. Los medios variaban en función del tipo celular aunque en todos los casos este era enriquecido con 10% de FBS. Los complementos usados para cada medio variaban ligeramente. En la siguiente tabla (tabla 17) se muestran las especificaciones de los cultivos usados:

Tabla 17. Características y especificaciones del mantenimiento del cultivo de las líneas celulares usadas.

Cultivo y referencia	Densidad de resiembra (células totales)	[Tripsina] y tiempo de exposición	Medio de cultivo	Complementos medio (concentración final)
Neuro-2a ATCC: CCL-131	250.000-2.5x10 ⁶	0,5 g/L 30 segundos	RPMI	Penicilina/estreptomicina (25 unidades/mL +25 µg/mL) L-glutamina (2 mM) Piruvato de Sodio (1 nM)
MCF-7 ECACC: 86012803	500.000-5x10 ⁶	0,5 g/L 5 minutos	DMEM	Penicilina/estreptomicina (25 unidades/mL +25 µg/mL) L-glutamina (2 mM) Piruvato de Sodio (1 nM)
NG108-15 ATCC: HB-12317	300.000-3x10 ⁶	No	DMEM	Penicilina/estreptomicina (25 unidades/mL +25 µg/mL) L-glutamina (4 mM) Piruvato de Sodio (1 nM) Piridoxina-HCl (0,004 g/L) Solución HAT: Hipoxantina (0,1mM)+Aminopterina (400nM)+ Timidina (0,016mM)
CaCo2 ATCC: HTB-37	100.000-10 ⁶	Tripsina (0,00025 g/L) EDTA4Na (0,0001 g/L) 15 minutos	MEM	Penicilina/estreptomicina (50unidades/mL +50 µg/mL) Aminoácidos no esenciales (1%, 100x)
A549 ATCC: CCL-185	200.000-2x10 ⁶	Tripsina (0,00025 g/L) EDTA4Na (0,0001 g/L) 10 minutos	DMEM	Penicilina/estreptomicina (50unidades/mL +50 µg/mL)
HepaRG [®] LMV/TOX//PT C/04	100.000-10 ⁶	Tripsina (0,00025 g/L) EDTA4Na (0,0001 g/L) 10 minutos	William's E sin L-glutamina	Penicilina/estreptomicina (50unidades/mL +50 µg/mL) L-glutamina (2 mM) Insulina (0,005 mg/mL) Hidrocortisona (0,0025mg/mL)

En el caso de las células HepaRG[®] se realizó su diferenciación. Para ello, el mantenimiento durante la diferenciación de las células se realizó como se describe a continuación. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 250.000 células/cm² en medio completo con 10% de FBS. Durante 14 días las células se mantenían cambiando el medio cada 2 días con medio completo 10% FBS y a partir del día 14 se añadía al medio completo cantidades en incremento de DMSO. El día 14 se añadía medio completo con 1% de DMSO, el día 16 con 1,5% de DMSO y el día 18 con un 2% de DMSO. Llegados a este punto las células se a diferencian, pudiendo distinguirse los hepatocitos de las células biliares bajo el microscopio. Los cambios de medio completo con 2%DMSO se seguía realizando cada 2 días hasta el día 28. A partir de este momento las células están listas para ser utilizadas aunque se pueden mantener en este estado durante unos 20 días más.

En las siguientes tablas (tablas 18 y 19) se presenta la relación de reactivos y aparatos usados.

Tabla 18. Relación de aparatos y material fungible usados para el mantenimiento de las líneas celulares estables.

Equipo y Material	Casa comercial	Ciudad (país)
Incubador	Binder	Tuttlingen (Alemania)
Baño	Memmert	Munich (Alemania)
Cabina de flujo laminar	Telstar AV100	Terrasa (España)
Cabina de bioseguridad	Telstar Bio II	Terrasa (España)
Frascos Roux de cultivo celular Nunc, estériles, tratados	Nunc-Thermoscientific	Walthman, MA (USA)

Tabla 19. Relación de medios y reactivos usados para el mantenimiento de las líneas celulares estables.

Medio/reactivo	Casa comercial	Ciudad (país)
RPMI	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
DMEM	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
MEM	Gibco-Life Technologies	Walthman (USA)
William's E sin L-glutamina	Gibco-Life Technologies	Walthman (USA)
FBS	Lonza	New Jersey (USA)
Penicilina/estreptomicina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
L-glutamina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Piruvato de Sodio	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Piridoxina-HCl	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Solución HAT	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)

Medio/reactivo	Casa comercial	Ciudad (país)
Aminoácidos no esenciales	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Insulina	Gibco-Life Technologies	Waltham (USA)
Hidrocortisona	Gibco-Life Technologies	Waltham (USA)
Tripsina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
PBS 1x	Gibco-Life Technologies	Waltham (USA)
NaCl	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)

5. ENSAYOS CELULARES (CBA)

Los ensayos celulares y parámetros finales medidos (*end-points*), así como el tipo de lectura utilizada variaban en función de la línea celular y del objetivo, en cada caso. En la tabla siguiente (tabla 20) se muestran los detalles de los diferentes ensayos celulares realizados en esta tesis.

Tabla 20. Protocolos de siembra y ensayo celular utilizados en esta tesis.

Ensayo	Tipo celular	Densidad siembra (nº células/pocillo) /tipo de placa (tiempo)	Antagonista /agonista	Tiempo exposición	End-point
Detección CTX	N2a	35.000/96p (24h)	Ouabaína/ Veratridina	24h	Viabilidad (MTT)
Detección OA,DTXs	N2a	35.000/96p (24h)	no	24h	Viabilidad (MTT)
	MCF-7	35.000/96p (24h)			
	NG-10815	35.000/96p (24h)			
	MCF-7	35.000/96p (24h)			
Identificación de bioactivos	N2a	35.000/96p (24h)	No	24h	Viabilidad (MTT)
	CGC	500.000/24p (7 días)	En función del estudio	En función del estudio	[Ca ²⁺] _i (Fura2) y Viabilidad (MTT)
Detección de proteínas de estrés ante PLTX o OVTXs	CaCo2	15.000/96p (24h)	No	24h	Marcaje con Ac (HCS)
	A-549	60.000/96p (24h)			
	HepaRG	10.000/96p (18 días)			

A continuación se detallan los protocolos utilizados.

5.1. Ensayos

5.1.1. Líneas celulares estables

El ensayo celular para detección de toxinas marinas fue descrito por Kogure y colaboradores (Kogure et al., 1988). El protocolo utilizado en esta tesis consta de los siguientes pasos:

- Siembra en placa de 24 pocillos durante 24 horas en medio completo con 5%FBS o sin FBS y a densidad adecuada para obtener un tapiz celular el día del ensayo (confluencia de más del 80%).
- Exposición a tóxicos en diluciones seriadas con o sin la adición de antagonistas/agonistas durante el tiempo necesario para la reducción de la viabilidad (24 horas, si no se especifica de otra manera).

En el caso de las fracciones no se realizaron diluciones seriadas, si no que cada fracción era añadida por triplicado en los pozos a la concentración estimada en cada caso para causar mortalidad celular.

5.1.2. Cultivos primarios

Los cultivos primarios de CGC de rata se utilizaron principalmente para determinar la presencia de bioactivos que afectaran a canales iónicos, comprometiendo la regulación de la concentración de Ca^{2+} por parte de la célula. En este caso, las células eran obtenidas a partir de ratas Sprague-Dawley® de 7 días de vida. Los animales eran criados en jaulas de Makrolon en el estabulario de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili, bajo condiciones estándar de temperatura ($22\pm 2^{\circ}C$), humedad relativa ($50\pm 10\%$) y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas diarias (luz 8:00-20:00).

La experimentación animal se realizó bajo las normas aprobadas por la Generalitat de Catalunya para la manipulación de animales de experimentación y aprobada por el Comité Ético de la Universidad Rovira i Virgili (Decreto 214/1997 de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para la experimentación y otras finalidades científicas) (Generalitat de Catalunya, 1997).

El protocolo utilizado fue el descrito por Verdaguer y colaboradores (Verdaguer et al., 2002). Todo el procedimiento se realizaba bajo campana de extracción en ambiente estéril. Brevemente, el protocolo consistía en seccionar las cabezas de los animales para la extracción de los cerebelos. Una vez extraídos, se separaban y desechaban las meninges y se trituraban los cerebelos mediante una cuchilla. Las células granulares eran disociadas mediante pasos sucesivos de resuspensión y sedimentación con inhibidores de tripsina y DNA-asa, pasando por diferentes soluciones previamente preparadas como se muestran en la tabla siguiente (tabla 21).

Tabla 21. Soluciones necesarias para la disociación de CGC (cantidades estimadas para 3 ratas).

SOLUCIÓN	COMPONENTES
Tampón Buffer Krebs	3,53 g NaCl 180 mg KCl 83 mg KH ₂ PO ₄ 1,285 mg glucosa 1,07 g NaHCO ₃ 5 mg rojo fenol Enrasar hasta 50 mL con H ₂ O-mQ
A (V=50 mL)	150 mg BSA 5mL Krebs buffer 0,4 mL MgSO ₄ (3,82%) Enrasar hasta 50 mL H ₂ O-mQ
B	3,12 mg tripsina 12,5 mL solución A
C	1,25 mg de DNA-asa 3,9 mg SBTI 75 µL MgSO ₄ (3,82%) 7,5 mL solución A
D	2 mL solución C 10,5 mL solución A
E	6,25 mL solución A 50 µL MgSO ₄ (3,82%) 50 µL CaCl ₂ (0,18%)
Solución GGK	2,5 mg gentamicina 14,6 mg glutamina 82,5 mg KCl 10 mL medio BME

Previa a su utilización todas las soluciones eran filtradas por un filtro de 0,22 μm para garantizar su esterilidad. Para la disociación y siembra de las células se procedía del siguiente modo:

- Los cerebelos troceados se pasaban al tubo con la solución A y se centrifugaban a 1000 rpm durante un minuto.
- Se eliminaba el sobrenadante, se añadía la solución B y se incubaba en el baño a 37 °C durante 15 min.
- Las células se introducían en la solución C y se centrifugaban durante 3 minutos a 1000 rpm.
- Se decantaba el sobrenadante y se añadía la solución C para resuspender el pellet unas 40 veces con pipeta pasteur, después de lo cual se dejaban decantar durante 10 minutos.
- El sobrenadante se pasaba al tubo con solución E, se volvía a resuspender (10 veces) y se dejaba reposar unos 10 minutos más. Este sobrenadante se centrifugaba 7 minutos a 1000 rpm.
- Después de la centrifugación el sobrenadante era eliminado y las CGC en el fondo del tubo resuspendidas en medio completo con 10%FBS y solución GGK (20%).
- Las células se sembraban a una densidad de 500.000 células/pocillo en placas de 16 pocillos. A cada pozo se había añadido previamente un cubreobjetos circular de vidrio estéril en el fondo, previamente poli-lisinizados (0,1mg/ml de poli-l-lisina).
- Tras el emplacado, las células se mantenían a 37°C. Entre las 16 y 18 horas posteriores se añadían 10 μl de hidrocloreuro de citosín arabinósido (Ara-C ocitarabina) para inhibir la proliferación de los astrocitos (5-7% del total de células).
- Las neuronas, ya diferenciadas se utilizaban para los ensayos entre los 6-8 días *in vitro* (DIV).

En las siguientes tablas se muestran los instrumentos (tabla 22) y medios o fármacos (tabla 23) utilizados para realizar estos ensayos.

Tabla 22. Relación de material y equipos usados (no se incluyen los ya indicados en la tabla 18).

Equipo	Casa comercial	Ciudad (país)
Placas 96 /24 pocillos fondo plano estériles NUNC	Thermoscientific	Walthman, MA (USA)

Tabla 23. Relación de reactivos y medios usados (no se incluyen los ya indicados en la tabla 19).

Medio/reactivo	Casa comercial	Ciudad (país)
Ouabaína	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Veratridina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
KB-R7943	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Nifedipin	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
STX	NRC	Ottawa (Canadá)
Poli-L-Lisina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Tripsina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
EDTA	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
BME	Gibco-Life Technologies	Waltham (USA)
FBS	Lonza	New Jersey (USA)
Inhibidor de tripsina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
DN-asa	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Glutamina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
KCl	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Gentamicina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
BSA	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
NaCl	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
KCl	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Glucosa	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Rojo fenol	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
MgSO ₄	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Citosin-arabinòsido	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)

5.2. Lecturas

5.2.1. MTT

La medida de la viabilidad por MTT se realizaba 24 horas después del cultivo con los agonistas/antagonistas o sustancias bioactivas (si no es especificado menos tiempo), basándonos en el protocolo descrito inicialmente por Manger (Manger et al., 1995). Pasado este tiempo se comprobaba la reducción de viabilidad bajo el microscopio. Posteriormente se procedía a la eliminación del medio de cultivo y adición de MTT a una concentración de 500 µg/mL. Después de 20 minutos se eliminaba el MTT y se disolvían los cristales de formazán con DMSO. La lectura se realizaba a 570 nm (590 nm en el caso de las CGC) en un

espectrofotómetro de placa. En la imagen (figura 18) se muestran dos placas preparadas para la lectura, después de la adición del DMSO.



Figura 18. Dos placas después de la adición del MTT y disolución de los cristales de formazán. El color rosa indica la viabilidad de las células mientras que la disminución de intensidad indica disminución de la viabilidad. En este caso ambas placas presentaban toxicidad para la CTX.

5.2.2. Medida de calcio intracelular

Para la determinación del calcio intracelular las células se incubaban con el fluorocromo Fura-2 a una concentración final de 6 μM durante 30-45 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se montaba el cubreobjetos en un soporte específico para la lectura de fluorescencia y se introducía en una cubeta de cuarzo con 1,3 mL de tampón Locke-Hepes 0,1% BSA. Las lecturas se realizaban en un espectrofluorímetro, equipado con agitación magnética y un accesorio “Fast Filter” que permite la lectura de la fluorescencia a 510 Nm con excitación alternada entre 340 Nm y 380 Nm. Después de comprobar que los compuestos no presentaban autofluorescencia y una vez estabilizada la señal, se realizaban adiciones sucesivas de glicina 1 mM y glutamato 10 mM para comprobar la adecuada respuesta de las células. Si las células presentaban una buena respuesta ante estos reactivos se procedía a la evaluación de los compuestos a estudiar tomando una nueva muestra en el cubreobjetos circular del cultivo de CGC.

En la figura 19 se observan los pasos sucesivos para el marcaje de las CGC y la lectura en el espectrofluorímetro.

En la tabla 24, se especifican los agonistas y antagonistas utilizados con el fin de observar los efectos que ejercían sobre los canales iónicos en presencia del extracto que deseábamos investigar:

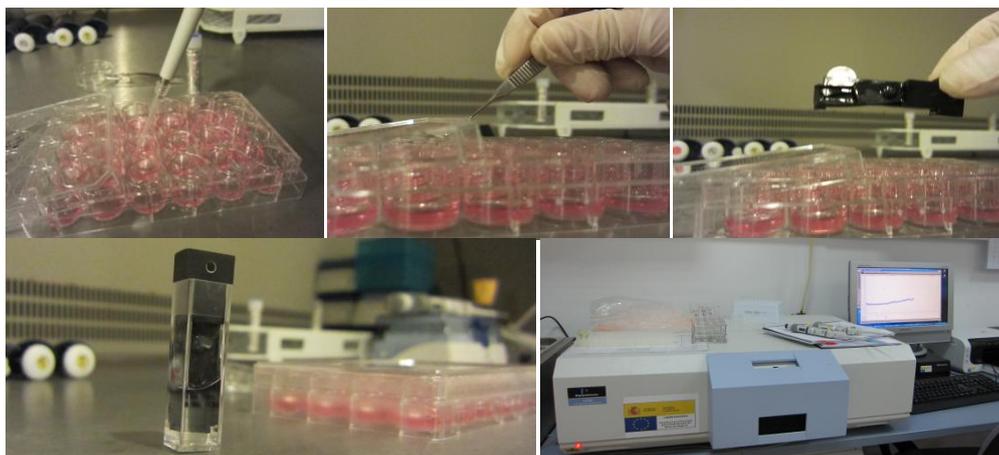


Figura 19. De izquierda a derecha, arriba se observan los pasos de adición del fura-2, extracción del cubreobjetos circular con las pinzas y colocación en el soporte. Abajo el soporte introducido en la cubeta de cuarzo que a su vez se introduce en el espectrofluorímetro, que nos indica la concentración del Ca^{2+} intracelular.

Tabla 24. Fármacos utilizados para determinar los efectos sobre el calcio intracelular y el efecto que ejercen ellos mismos sobre los diferentes canales celulares.

Fármaco	Actividad	Concentración final
Saxitoxina	Bloqueo canales de Na^+ Voltaje-dependientes	50 nM
Nifedipino	Antagoniza canales de Ca^{2+} L-type voltaje-dependiente	25 μM
Ouabaína	Apertura y bloqueo de la bomba Na^+/K^+ -ATP-asa	1 mM
Ciguatoxina	Apertura y bloqueo de canales Na^+ Voltaje-dependiente	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
KB-R7943	Inhibe el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Impide que salga el calcio al exterior	10 μM
Cloruro de Lantano (LaCl_3)	Bloquea el transportador de Ca^{2+} dependiente de energía (impide que salga el Ca^{2+})	75 μM
Ácido ciclopiazónico (CPA)	Inhibe la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (impide que salga Ca^{2+} al citoplasma)	10 μM
CGP-37157	Inhibe el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de las mitocondrias. Impide que salga el calcio al citoplasma	10 μM

5.2.3. Marcaje con anticuerpos y lectura HCS

Esta técnica se aplicó a los tipos celulares HepaRG y A549 en el experimento para determinar proteínas de estrés causados por toxinas derivadas de la PLTX.

Para ello, después de la exposición a las toxinas como se explicó en el apartado 5.1.1., se procedía de dos posibles maneras dependiendo del objetivo. Para el marcaje de IL-8 se

realizaba un test ELISA: Se recogía el medio con una pipeta multicanal y se pasaba a una placa limpia donde se congelaba a -80°C hasta el día del ensayo. El test de ELISA constaba de las siguientes fases:

- Recubrimiento o “coating”: Las placas se recubrían con una dilución de $1\ \mu\text{L}/\text{mL}$ de anticuerpo primario I^RILE8 en buffer (“coating buffer”) y se guardaban a 4°C hasta el día siguiente.

- Detención de la reacción: Las placas se lavaban 3 veces con PBS/Tween (0.05%) con una máquina lavadora de placas y entonces se saturaban con “stopper solution” o SBB y se dejaba actuar a temperatura ambiente durante una hora.

- ELISA: La placa se vaciaba y se añadían diluciones 1:2 del anticuerpo secundario recombinante IL-8 (desde $7,9\ \text{pg}/\text{mL}$ hasta $500\ \text{pg}/\text{mL}$) por triplicado. Esta serie sería la usada como control para obtener la relación dosis-respuesta. Seguidamente se añadía el medio recogido anteriormente de los ensayos celulares. Además se añadía una dilución de $10\ \text{ng}/\text{mL}$ de TNF- α por triplicado como control positivo. Las placas eran mantenidas en agitación durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se lavaban otra vez con PBS/Tween (0,05%) tres veces.

- Marcaje y lectura: Las placas se llenaban una vez más con $100\ \mu\text{L}/\text{pocillo}$ de una dilución de anticuerpo biotinilado ($0,2\ \mu\text{L}$ de anticuerpo secundario / mL de PBS-BSA 1%) y se mantenían en agitación durante una hora. Después de 3 lavados más con PBS/Tween 0,05% se añadía streptavidin peroxidasa en PBS/Tween ($1\ \text{mL}/\text{mL}$) y se mantenía 45 minutos en agitación. Entonces, se lavaba 3 veces más y se añadían $100\ \mu\text{L}/\text{pocillo}$ de solución TMB hasta que estos adquirían una coloración azul. En cuanto se observaba este color se detenía la reacción con $\text{H}_2\text{SO}_4\ 1\text{M}$ e inmediatamente se leía en un lector de placas a $450\ \text{Nm}$.

Para la detección de las proteínas caspasa3, Ki67, NF- $\kappa\beta$ y γH2ax las células, después de la exposición a toxinas, eran fijadas con formol 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS 1x pueden ser guardados a 4°C durante unos 15 días. Para la realización de los marcajes se procedía de la siguiente manera:

- Permeabilización: Las placas eran permeabilizadas con PBS/Tritón 0,2% ($100\ \mu\text{L}/\text{pocillo}$, 10 min. a temperatura ambiente)

- Marcaje con anticuerpo primario: Después de dos lavados con PBS/Tween 0,05% la placa se saturaba durante 30 min con PBS/Tween 0,05%-1%BSA (previamente filtrado y preparado fresco cada día). Los anticuerpos usados fueron:

- anticuerpos policlonales p65 anti caspasa (activa) y anti- NF- κ β , ambos de conejo y en una concentración de 1 μ g/mL.
- anticuerpo monoclonal anti- γ H2ax de ratón en una concentración final de 0,66 μ g/mL.
- anticuerpo monoclonal anti-Ki67 de conejo en una concentración de 1 μ g/mL.

Los anticuerpos anti-caspasa3 y γ H2ax eran añadidos en la misma placa y NF- κ β y Ki67 cada una en una placa diferente (50 μ L/pocillo). Una vez añadidos se dejaban incubar toda la noche.

-Lectura: Al día siguiente las placas se lavaban 3 veces con PBS/Tween 0,05% y se añadía el anticuerpo secundario de la siguiente manera: anti-mouse (IgG H+L, Dylight 488, Thermo) para la determinación de γ H2ax y anti-rabbit (IgG H+L, AlexaFluor 488, Invitrogen) para el total de las placas, ambos anticuerpos obtenidos de cabra. Las células se incubaban con el anticuerpo secundario durante 45 minutos y se lavaban 3 veces (PBS/tween 0,05%). Entonces se añadía una dilución de DAPI a una concentración de 1 μ g/mL preparado en PBS/Tween 0,05%. Las placas se lavaban dos veces más y se les añadía PBS 1x filtrado para la lectura en el High Content Screening (HCS). En la figura 20 se puede ver la fotografía del HCS durante la lectura de una de las placas. En las tablas 25 y 26 se muestran los aparatos e instrumentos y los medios o reactivos utilizados para las lecturas de los ensayos celulares.

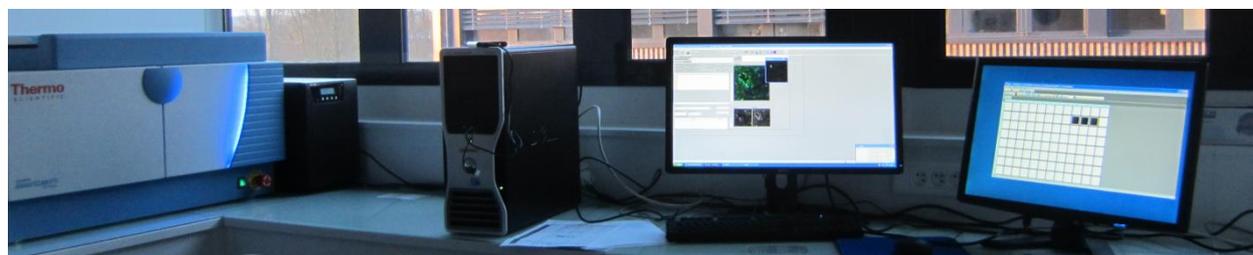


Figura 20. A la izquierda figura el HCS de thermo, en donde se introduce la placa para su lectura. En las pantallas se pueden ver la imagen que está tomando de cada pozo y el *screening* de la placa completa.

Tabla 25. Relación de material y equipos usados.

Equipo	Casa comercial	Ciudad (país)
Espectrofotómetro	Biotek, Synergy HT,	Winooski, VT (USA)
Espectrofluorímetro (PerkinElmer LS50B)	PerkinElmer	Walthman (USA)
Soporte para cubre (coverslip holder)	PerkinElmer	Walthman (USA)
Cubetas de cuarzo de 3 mL para espectrofluorímetro	Hellma	Müllheim (Alemania)
Lavador de placas	Hydrospeed™ TECAN	Männedorf (Suiza)
High Content Screening	Cellomix-Thermoscientific	Walthman, MA (USA)
Lector de placas	Multidetector Infinite 1000Pro TECAN	Männedorf (Suiza)

Tabla 26. Relación de reactivos usados.

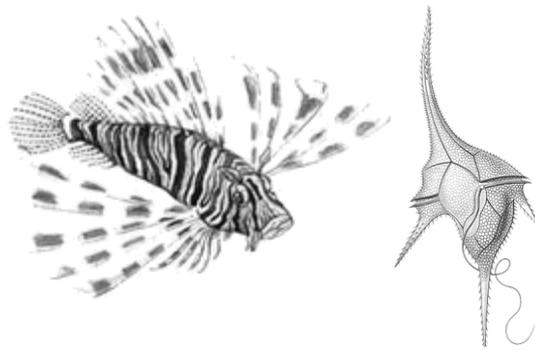
Medio/reactivo	Casa comercial	Ciudad (país)
MTT	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
DMSO	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Ouabaína	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Veratridina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
KB-R7943	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Nifedipino	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
STX	NRC	Ottawa (Canadá)
Cloruro de Lantano (LaCl ₃)	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Ácido Ciclopiazónico	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
CGP-37157	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Verapamina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Fura-2 AM	Invitrogen	Walthman (USA)
Glutamato monosodio	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Glycina	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
Ionomycina	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
HEPES	Fluka Analytical	Buchs (Suiza)
Anticuerpo primario I ^R IL8	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
PBS/Tween	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Stopper solution" o SBB	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Anticuerpo secundario recombinante IL8	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
TNF- α	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Anticuerpo biotinilado	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Streptavidin peroxidasa	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Solución TMB	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)

Medio/reactivo	Casa comercial	Ciudad (país)
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Formol	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Triton	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
BSA	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)
Anti caspasa	Abcam	Cambridge (UK)
Anti-NF- κ β	Abcam	Cambridge (UK)
Anti- γ H2ax	Thermo	Walthman, MA (USA)
Anti-ki67	Interchim	Montluçon (Francia)
Anti-mouse	Thermo	Walthman, MA (USA)
Anti-rabbit	Invitrogen	Walthman, MA (USA)
DAPI	Sigma-Aldrich	St. Louis MO (USA)

6. TRATAMIENTO DE DATOS

Los valores del cociente F340/F380 (R) se determinaron mediante el software *FLWinLab 2.0* (PerkinElmer). Los valores obtenidos en los ensayos celulares se ajustaron a un modelo de regresión no lineal (curva sigmoidea de pendiente variable) con el programa *GraphPad Prism 5.0*, (*Graph Pad Inc.*), para obtener la IC₅₀. De forma general, los gráficos, correlaciones y análisis estadísticos presentados en esta tesis fueron realizadas con este mismo programa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. DETECCIÓN DE TOXINAS

En los siguientes apartados se describen los experimentos realizados que tienen relación directa con la detección de toxinas en muestras de alimentos mediante CBAs.

1.1. Riesgo asociado a la ciguatera por consumo de peces en Guadeloupe

La siguiente investigación ha dado lugar a la publicación: *A contribution to the risk characterization of ciguatoxins: estimation of a LOAEL from eight ciguatera fish poisoning events in 2010-2012 in Guadeloupe (French West Indies)*. V. Hossen, L. Soliño, P. Leroy, E David, P. Velge, S. Dragacci, S. Krys, H. Flores Quintana, J. Diogène. Environmental Research. Aceptado con revisiones.

Las C-CTXs producen síntomas graves a niveles muy bajos de consumo. Dado que existen muy pocos datos para establecer un LOAEL (lowest observable adverse effects) y ArfD (Acute Reference Dose) o cantidad de sustancia que puede ser ingerida en un periodo de 24 h o menos sin apreciable riesgo para la salud, los actuales niveles de referencia deben ser revisados y actualizados. El objetivo de este estudio era aportar nuevos datos sobre el ArfD en humanos, mediante la recopilación de datos epidemiológicos y el uso de tres métodos analíticos: el MBA, el CBA y la LC/MS.

Todos los datos epidemiológicos fueron recogidos y analizados por el ANSES y las autoridades sanitarias de Guadeloupe entre 2010 y 2012. El IRTA se encargó del análisis cuantitativo de las toxinas mediante CBA-Neuro-2a. A partir de estos resultados se pudo calcular la cantidad de toxina consumida por individuo y por peso de individuo y relacionarlo con los síntomas que presentaron. De este modo, pudo deducirse la cantidad mínima de toxina que produce síntomas adversos. En la figura 21 pueden observarse los resultados de un análisis por CBA de la curva patrón con el estándar de P-CTX, los correspondientes al análisis de un pez negativo usado como control y de un pez positivo, implicado en la intoxicación 10.

En la tabla 27 se recogen los datos de los niveles de toxina detectados mediante CBA y el *toxin intake*, o toxina consumida. Además se aportan los datos de los síntomas y sexo y edad de las personas intoxicadas.

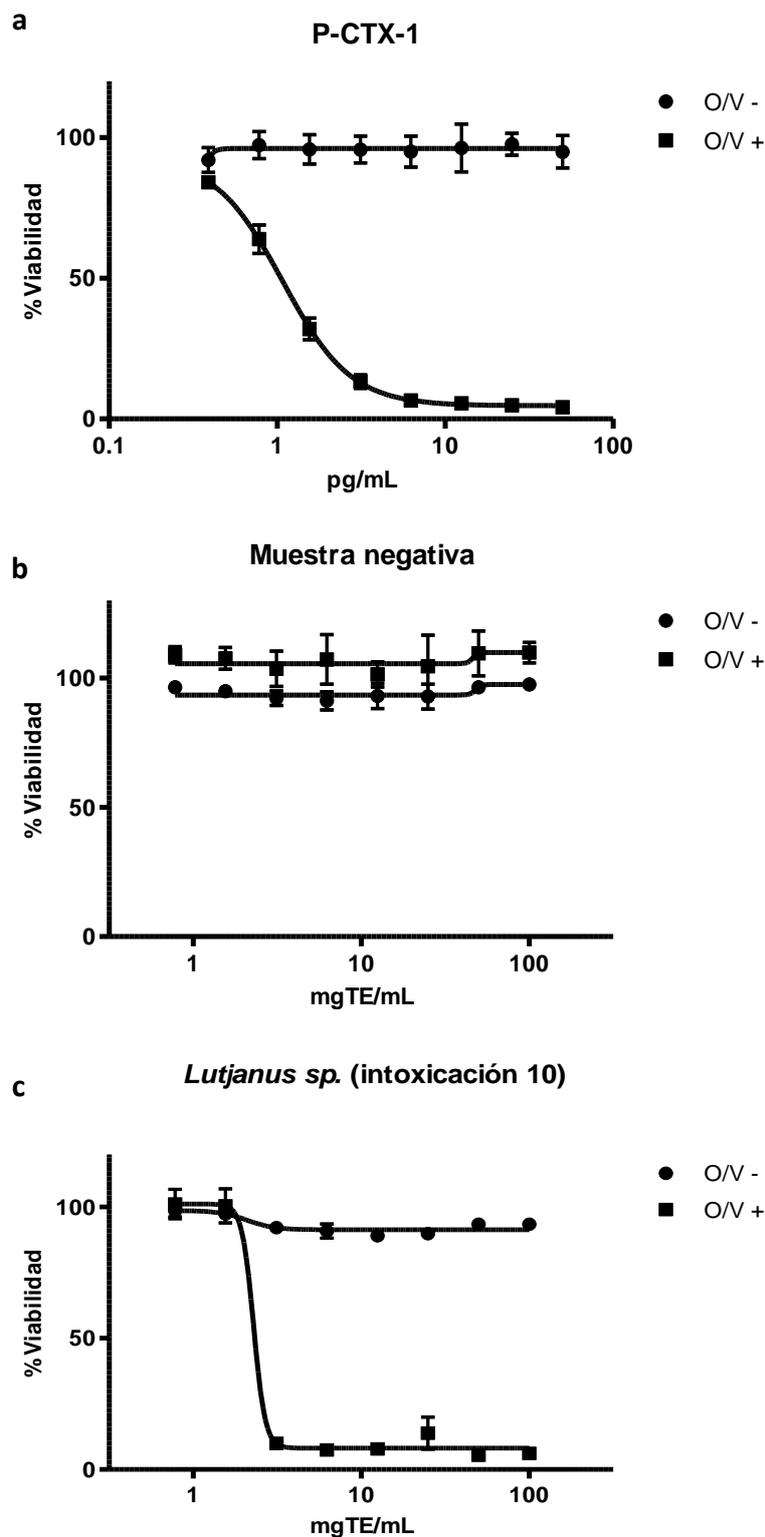


Figura 21. Evaluación del efecto citotóxico del estándar de P-CTX-1 y de los extractos de peces: a) Curva dosis-respuesta del estándar de P-CTX-1; b) Control negativo de *Caranx sp.* No se observa toxicidad en ausencia/presencia de O/V; c) Muestra positiva de extracto de *Lutjanus sp.* procedente de la intoxicación 10. La concentración de los extractos de peces se refiere a mg de tejido equivalente/mL.

Tabla 27. Estimación de la ingesta de toxinas (*toxin intakes*) para 21 individuos implicados en las intoxicaciones 1, 3, parte de la 5, 6-7, 9 y 11 para los cuales estaban disponibles los datos más relevantes para el cálculo del LOAEL, marcado en la tabla en fondo negro. El contenido de CTXs fue estimado mediante CBA; el consumo de toxina (*toxin intake*) se expresa por individuo y por kg de peso corporal (*body weight*=BW); las muestras analizadas por MBA se consideraban en el límite de aptitud para el consumo (L.A.C.) cuando al menos un ratón sufría una pérdida de peso mayor o igual al 5% de su peso total en las 24 horas siguientes a la inyección de la muestra y no apto para el consumo (N.A.C) en el caso de que se produjera la muerte de al menos 1 ratón.

N° Intoxicación	Especies implicadas	Sexo	Edad del individuo (años)	Peso de los individuos (kg)	Peso del pez ingerido (g)	Contenido de CTXs ($\mu\text{g Eq. de P-CTX-1.kg}^{-1}$ de pescado)	Ingesta de toxina (Toxin intake)		Síntomas	Inicio de los síntomas (horas)	Resultado MBA
							ng eq. de P-CTX/individuo	pg eq. de P-CTX/kg BW			
1	<i>Caranx latus</i>	H	71	94	250	0,0220	5,5	58,5	CA, D, N, DIS, PRU	9,5	POSITIVO (L.A.C)
		M	67	52	400		8,8	169,2	CA, N, DIS, PRU	9,5	
2	<i>Lutjanus griseus</i>					0,0424					POSITIVO (L.A.C)
3	<i>Lutjanus jocu</i>	H	45	80	200	0,0759	15,2	189,8	CA, D	6	POSITIVO (L.A.C)
		M	40	45	100		7,6	168,7	CA, Di	6	
4	<i>Lutjanus jocu</i>					0,1108					POSITIVO (N.A.C.)
5	<i>Mycteroperca venenosa</i>	M	62	128	150	0,1714	25,7	200,9	Di, V, DIS, PAR, TP	2	POSITIVO (L.A.C)
		M	39	70	150		25,7	367,3	Di, V, DIS, PAR, TP	2	
		H	67	85	150		25,7	302,5	Di, V, DIS, PAR, TP	2	
		H	42	101	150		25,7	254,6	Di, V, DIS, PAR, TP	2	
		H	36	75	150		25,7	342,8	Di, V, DIS, PAR, TP	2	
6	<i>Lutjanus</i>	H	63	64	150		15,9	248,0	Di, V, DIS, PAR	7	POSITIVO

N° Intoxicación	Especies implicadas	Sexo	Edad del individuo (años)	Peso de los individuos (kg)	Peso del pez ingerido (g)	Contenido de CTXs ($\mu\text{g Eq. de P-CTX-1.kg}^{-1}$ de pescado)	Ingesta de toxina (Toxin intake)		Síntomas	Inicio de los síntomas (horas)	Resultado MBA
							ng eq. de P-CTX/individuo	pg eq. de P-CTX/kg BW			
	<i>buccanella</i>	H	36	54	150	0,1058	15,9	293,9	Di, V, DIS, PAR	7	(N.A.C.)
		M	40	72	150		15,9	220,4	Di, V, DIS, PAR	7	
7	<i>Lutjanus sp</i>	H	28	89	350	0,1092	38,2	429,4	CA, Di, PAR, TP, DG	3,5	POSITIVO (N.A.C.)
		M	47	85	50		5,5	64,2	CA, Di, PAR, TP, DG	3,5	
9	<i>Lutjanus sp</i>	M	58	57	200	0,0421	8,4	147,7	N, V, PAR, DG	D	POSITIVO (N.A.C.)
		H	52	87	100		4,2	48,4 LOAEL	N, V, PAR, DG	D	
10	<i>Lutjanus sp</i>	D	> 50	D	150	0,4708	70,6		CA, Di, N, DIS, PAR, PRU, DG	3	POSITIVO (N.A.C.)
		D	> 50	D	150		70,6		CA, Di, N, DIS, PAR, PRU, DG	3	
		D	> 50	D	150		70,6		CA, Di, N, DIS, PAR, PRU, DG	3	
		D	> 50	D	150		70,6		CA, Di, N, DIS, PAR, PRU, DG	3	
11	<i>Caranx sp</i>	M	67	67	300	0,0548	16,4	245,4	CA, PRU	4,5	POSITIVO (N.A.C.)

H=hombre; M=mujer; D=desconocido.

Descripción de los síntomas: CA (calambres abdominales), Di (diarrea), DIS (disestesia), DG (debilidad general), N (náuseas), PAR (parestias), PRU (prurito), TP (trastornos de la piel), V (vómitos).

El ensayo por CBA resultó ser útil para la determinación de equivalentes de P-CTX en las muestras de peces. Además, gracias al MBA y CBA se identificó una nueva especie responsable de la CFP, *Lutjanus griseus*. Esta especie, a pesar de no figurar entre las especies prohibidas a causa de la CFP pertenece a uno de los géneros que frecuentemente presentan estas toxinas. Todos los peces positivos para el CBA lo fueron también respecto al MBA llevado a cabo en el ANSES, aunque no había correlación en las muestras clasificadas como “en el límite de aptitud para el consumo” o “no aptas para el consumo” según el MBA con la cantidad de toxina calculada mediante CBA. Por ejemplo, algunos de los análisis que resultaron por MBA en el límite de de aptitud para el consumo no coincidían con una menor carga de toxina cuantificada por CBA.

El análisis cromatográfico de la muestra 10 llevado a cabo en el FDA demostró además que la toxina causante de la intoxicación era C-CTX o ciguatoxina del Caribe. Esta toxina es considerada un grado de magnitud menos tóxica que la toxina del Pacífico en base al bioensayo en ratón (EFSA, 2010). En todo caso las equivalencias con P-CTX muestran altos niveles de toxina a pesar de ser expresados en equivalentes de P-CTX.

Respecto a los síntomas exhibidos, en este estudio los pacientes no describieron unos síntomas como más intensos que otros aunque la inversión de temperatura, típica de la CFP, era la que más se prolongaba en el tiempo. Se ha descrito que la ciguatera caribeña exhibe en una primera fase principalmente síntomas digestivos dejando paso a continuación a los síntomas neurológicos, lo que coincide con la descripción de los síntomas de estos pacientes (Dickey y Plakas, 2010). No se observó relación entre la severidad de los síntomas y la cantidad de toxina consumida, lo que indica que la variabilidad de cada individuo pueden afectar de forma importante al desarrollo del síndrome (Bagnis et al., 1979; Dickey y Plakas, 2010; Lehane y Lewis, 2000).

Según este estudio la menor cantidad de toxina que produce síntomas adversos es $0,022 \mu\text{g eq.P-CTX-1.kg}^{-1}$ lo que está de acuerdo con las recomendaciones de la EFSA. Estas recomendaciones indican que la mínima cantidad de toxina para la cual no se espera que presente síntomas en individuos sensibles es $0,01 \mu\text{g eq.P-CTX-1.kg}^{-1}$ (EFSA, 2010).

En términos generales, este estudio mostró resultados coherentes entre resultado (positivo/negativo) del MBA, el resultado del CBA, las especies implicadas en el estudio y los

síntomas sufridos por los pacientes, a pesar de que en algunos casos la correlación entre unos factores y otros no estaba clara. Por ejemplo, la gravedad de los síntomas, en muchos casos, no coincidía con aquellas personas que habían ingerido mayor cantidad de pescado. Todo ello refleja la complejidad de la determinación de los límites legales de CTX y la necesidad de recopilar el mayor número de casos posibles con la mayor información posible de datos.

En esta área la incidencia de CFP es común, sin embargo, cada año aparecen intoxicaciones debidas a la ingesta de pescado contaminado. Cabe destacar también que todos los peces implicados en estas intoxicaciones están prohibidos por las regulaciones locales (*Arrêté Préfectoral n° 2002/1249 du 19/08/2002*, 2002; Hossen et al., 2013). A pesar de la buena coordinación de las autoridades sanitarias y el centro de control de toxinas marinas de Guadeloupe, es muy difícil la obtención de datos respecto a la ración consumida y en la mayoría de casos no es posible la recogida de restos de pescado para su análisis. Debido a esto y a la variabilidad individual observada en éste y otros estudios serían necesarios más datos para establecer estos límites legales de forma fiable y específica para las diferentes CTXs.

Conclusión

El CBA junto con la determinación cromatográfica permite mejorar la información disponible en cuanto a límites recomendables de ingesta de CTX y proporcionar una gran cantidad de información útil para la determinación de los riesgos en el consumo de pescado.

1.2. Presencia de ciguatoxinas del Caribe en el pez invasor *Pterois sp.* (pez león) en Guadeloupe

La siguiente investigación ha dado lugar a la publicación: *Prevalence of ciguatoxins in lionfish (Pterois spp.) from Guadeloupe, Saint Martin, and Saint Barthélemy Islands*. Lucía Soliño, Saha Widiy, Anthony Pautonnier, Jean Turquet, Christopher R. Loeffler, Harold Flores Quintana, Jorge Diogène. *Toxicon*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.05.015>.

El muestreo de peces se realizó en varias localizaciones de las Antillas Francesas en el Caribe, alrededor del archipiélago de Guadeloupe, la Isla de San Martin y la Isla de Saint Barthelemy. La mayoría de los peces león (figura 22) fueron pescados por pescadores profesionales con trampas (nasas). Aquellos peces capturados en las localidades de Vieux Habitants, Bouillante, Pointe Noire y Capesterre fueron cazados con harpones por los agentes del Parque Nacional de Guadeloupe o por trabajadores del DEAL- Guadeloupe (Direction de l'environnement et de l'Amenagement et du Logement).

Las 120 muestras obtenidas del músculo de estos peces fueron enviadas por el CRPMEM (Comité Régional des Pêches Maritimes et des Élevages Marins) al IRTA congelados para su análisis por CBA-Neuro-2a. Para la extracción de las toxinas se procedió como en el apartado 2.1 (*extracción de pescado*) de *material y métodos*. El ensayo cromatográfico de dos de las muestras de pescado se realizó en la FDA acorde con el apartado 3 (*detección cromatográfica*) de *material y métodos*.

En este estudio fueron obtenidos 60 peces de Guadeloupe (30 en el sur y 30 en el norte del archipiélago), 55 peces en Saint Barthelemy y solo 5 en San Martin (figura 23). El promedio de la longitud estándar y el peso total fue de 21,74 ±3,53 cm y 374,79 ±186,24 g. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a talla y peso entre las distintas áreas de muestreo ($p>0,05$).

Los resultados de la respuesta tipo CTX en células N2a están representados en la tabla 28. Los límites de cuantificación (QL) dependiendo del stock de células usado fueron 0,0039 ppb (muestras 1-6), 0,0096 ppb (muestras 7-96) y 0,0043 ppb (muestras 97-138). Las respuestas típicas de de las curvas P-CTX-1 están representadas en la figura 24.



Figura 22. Imagen de un pez león en un ecosistema de arrecife. Fotografía de Wolcott Henry (extraída de www.nationalgeographic.es).

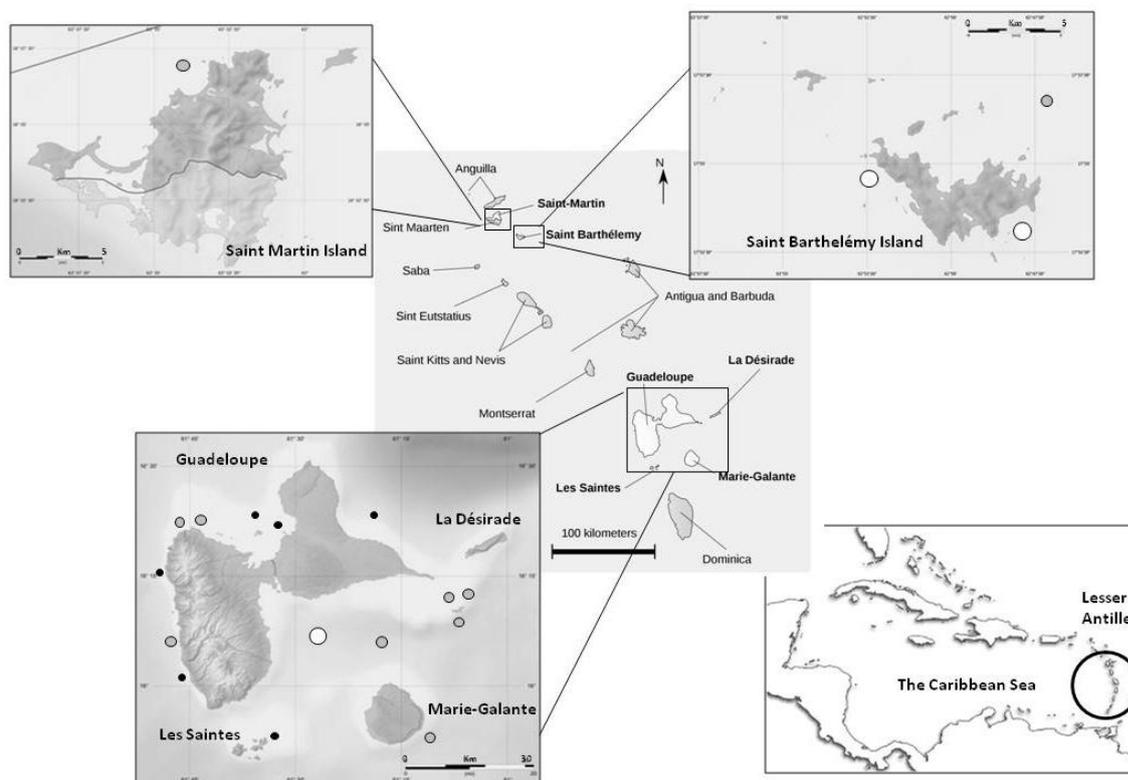


Figura 23. Los mapas a la derecha-inferior y central muestran la situación de las islas en la región de las Antillas. En los demás mapas se representa la localización de los puntos de captura en cada isla. Los círculos indican el número de muestras capturadas: círculos grandes blancos: >8 peces; círculos medianos grises: entre 5-8 peces y círculos pequeños negros: <5 peces.

Todos los peces que presentaron actividad de tipo CTX por medio del CBA-Neuro-2a (n=27) fueron encontrados en la isla de Sant Barthelemy. Por tanto, un 49% de los peces capturados

en esta isla contenían este tipo de toxinas, de los cuales el 40% superaba el límite de 0,01 ppb de P-CTX-1 equivalentes recomendado por la EFSA. También se examinó la correlación entre los pesos y las tallas de los peces con el contenido de toxina. A pesar de existir una ligera tendencia a contener niveles mayores de toxina en los peces de mayor tamaño y peso, la correlación era muy pobre ($R^2 = 0,04$) (figura 25).

Las cuatro muestras que presentaban mayores cantidades de toxina fueron enviadas a la FDA para su confirmación analítica. Estos análisis revelaron que todas estas muestras presentaban C-CTX, por comparación del tiempo de retención y la relativa transición de iones en comparación a un estándar de referencia de C-CTX-1 (figura 26). El método usado para realizar estos análisis está descrito en el apartado 3 de *material y métodos*.

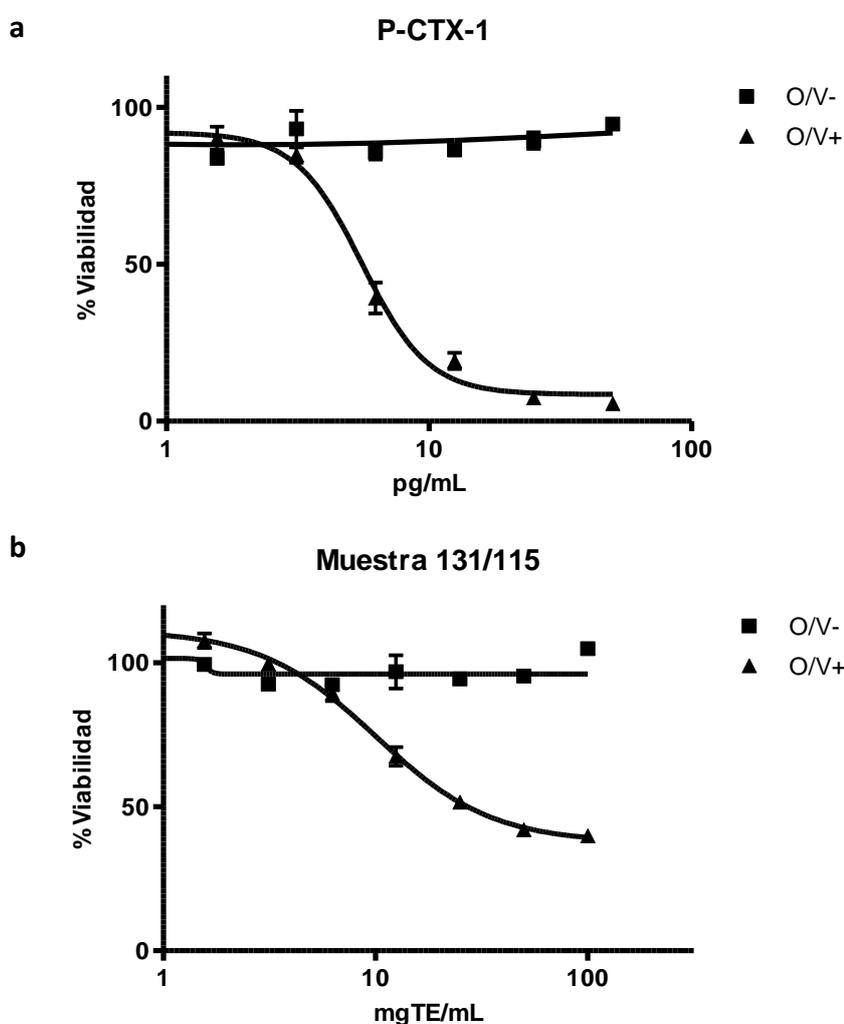


Figura 24. Representación de las curvas dosis-respuesta para a) Estándar de P-CTX-1 y b) Extracto de la muestra 131/115.

Tabla 28. Toxicidad de los peces caracterizada por CBA-Neuro-2a y descripción de los peces con contenidos de CTXs por encima del QL estimado (3 réplicas). Los resultados se expresan en μg de P-CTX-1 equivalentes por kg de pescado (ppb).

Código muestra	P-CTX-1 equiv (ppb)	Zona de captura en Saint Barthelémy	Profundidad (m)	Peso total (g)	Longitud estándar* (cm)
86/70	0,070	Suroeste	45	358,5	22
88/72	0,016	Suroeste	45	224,4	19,4
103/87	0,110	Suroeste	45	611,4	26,4
105/89	0,145	Suroeste	45	527,7	24,4
106/90	0,081	Suroeste	45	352,4	22,1
107/91	0,056	Suroeste	45	335	22,4
109/93	0,070	Suroeste	45	314	21,8
110/94	0,095	Suroeste	45	357,3	22,1
111/95	0,054	Suroeste	45	240,8	20,8
115/99	0,174	Suroeste	45	697	26
121/105	0,109	Suroeste	45	388,6	21,4
122/106	0,005	Suroeste	45	512,4	25,3
123/107	0,006	Suroeste	45	343,5	21,8
133/117	0,0228	Suroeste	45	386	22,1
134/118	0,0061	Suroeste	45	169,3	17,9
136/120	0,052	Suroeste	45	634	25,8
137/121	0,0477	Suroeste	45	231	20,8
97/81	0,157	Noreste	45	359,4	21,4
99/83	0,116	Oeste	50	375	22
100/84	0,088	Oeste	50	673,1	26
102/86	0,062	Sur	30	495	25
126/110	0,006	Sur	50	227	19,2
127/111	0,009	Sur	50	372	22,1
129/113	0,016	Sur	50	443,5	28,8
130/114	0,333	Sur	50	268,6	20,2
131/115	0,204	Sur	50	411,2	21,6
132/116	0,0098	Sur	50	247,5	19,8

*Longitud estándar = desde la punta del hocico hasta el límite posterior de la última vértebra (inicio de la aleta caudal).

Con este estudio queda demostrado que el pez león es un vector potencial de CFP. Estos resultados están de acuerdo con los estudios realizados por Robertson et al. (2014), publicados durante la realización del presente estudio y donde encontraron también C-CTX-1 en esta

especie en las Islas Virginias (US). Sus resultados reflejan porcentajes similares a los encontrados en nuestro estudio, presentando un 40% de los peces toxina C-CTX, pero por debajo de los niveles recomendados por la US FDA. El estudio de Robertson tampoco encontró relación entre la talla y el contenido de CTXs en peces. Recientes estudios corroboran también la inexistencia de relación entre el peso de los peces y el contenido en CTXs, siendo esta relación solo positiva en determinadas especies (Bienfang P, DeFelice S, Laws E, Wallsgrove N, 2012; Gaboriau et al., 2014; Lewis y Holmes, 1993; Yogi et al., 2011).

Nuestro lugar de muestreo está próximo a las zonas muestreadas en el estudio de Robertson, formando parte de la cadena de islas de las Bajas Antillas. Además, el lugar donde se encontraron los peces contaminados con CTXs es precisamente el punto de muestreo de nuestro estudio más próximo al de Robertson, 2014. Si observamos el momento en que fueron realizados estos muestreos también podemos ver que en el estudio de Robertson et al, 2014 se realizaron durante los años 2010 y 2011 mientras que los nuestros lo fueron entre 2011 y 2013. Esto podría significar que esta población de peces león ha estado al menos cuatro años alimentándose en estas aguas, donde es frecuente el organismo productor de CTXs. El comportamiento alimentario de los peces es un factor muy importante para determinar el riesgo de CFP en la salud humana. Por ejemplo, el nivel trófico de la especie en cuestión puede determinar su exposición a CTXs. El comportamiento alimentario de *P. volitans* estudiado por Morris y sus colaboradores demuestra la voracidad de estos animales. En estos estudios se encontró que esta especie podía alimentarse de más de 26 familias diferentes de animales marinos, incluyendo invertebrados y más frecuentemente otras especies de teleósteos (Morris Jr y Akins, 2009). Además, la proporción de teleósteos/invertebrados en la dieta era mayor en pez león adultos, mientras que en estómagos de juveniles se encontraban restos de moluscos y crustáceos en mayores proporciones (Morris Jr y Whitfield, 2009). Entre estos peces consumidos por el pez león muchos son especies que pueden contener CTXs y/o sus precursores, como especies de las familias Serranidae, Lutjanidae, Labridae y Mullidae. Otro factor importante a tener en cuenta es el comportamiento del pez en cuanto al territorio que habita. El pez león muestra alta fidelidad territorial durante largos períodos de tiempo (Jud y Layman, 2012). En estudios realizados en Honduras se encontró que los peces adultos y juveniles no compartían territorio sino que los peces sexualmente maduros ocupaban zonas de arrecife coralino mientras que los juveniles frecuentaban las praderas de angiospermas marinas

(Biggs y Olden, 2011). El mismo patrón fue observado en zonas de manglar, donde los juveniles en lugar de ocupar los arrecifes, usaban el manglar como criadero o *nursery* (Barbour et al., 2009). Sin embargo, otros estudios realizados sobre este aspecto no encontraron diferencias en el espacio ocupado por juveniles y adultos (Jud y Layman, 2012; Pimiento et al., 2013). En todo caso, dado el rápido crecimiento de este pez y la rapidez con la que alcanza la madurez sexual (sobre los 100 mm de longitud total) es muy probable que establezca su territorio pronto y permanezca en éste por largo tiempo. Este hecho incrementaría el riesgo de acumular CTXs si el territorio pertenece a áreas endémicas para CFP. Por otro lado, este comportamiento territorial puede ser, en parte, beneficioso porque permitiría localizar el riesgo y eso llevaría a un mejor control de las pesquerías. Este control permitiría asimismo la comercialización de este pescado con todas las garantías de seguridad alimentaria para los consumidores.

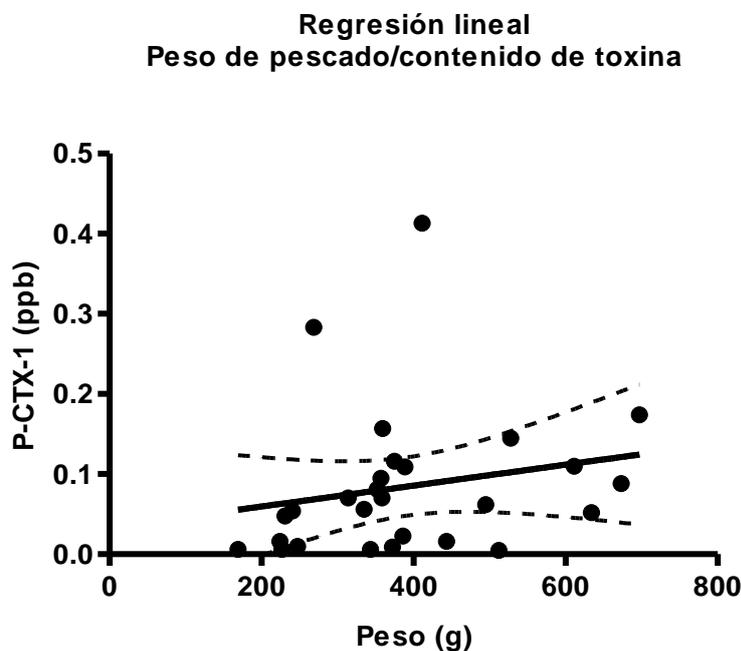


Figura 25. Relación entre la cantidad de toxinas tipo CTXs estimadas por CBA- N2a y el peso total del pez ($R^2=0,04$).

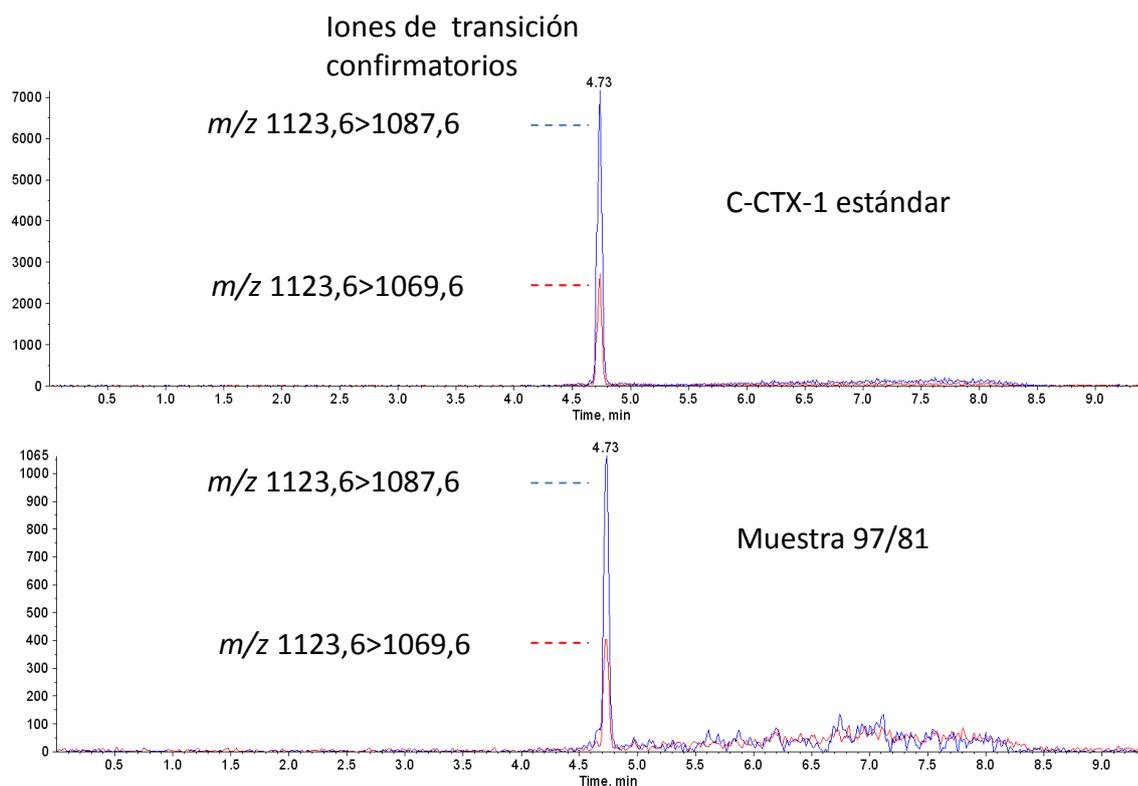


Figura 26. Cromatograma del estándar de C-CTX-1 (arriba) y muestra de pez león (abajo).

En cuanto a la profundidad, el pez león puede vivir en un amplio rango de profundidades, desde aguas poco profundas hasta más de 300 m (Albins y Hixon, 2013). Este rango de profundidades se solapa con las profundidades en las que el dinoflagelado *Gambierdiscus* puede habitar. La máxima profundidad teórica a la que podríamos encontrar *Gambierdiscus* serían unos 100 m según el estudio de Kibler et al (2010) (Kibler et al., 2010). Además, *Gambierdiscus* sp. tiene ciertas preferencias en cuanto al sustrato. Entre ellas están los corales muertos (Bagnis, 1995; de Sylva, 1994; Grzebyk et al., 1994; Rongo y van Woesik, 2013), macroalgas (Cruz-Rivera y Villareal, 2006; Parsons y Preskitt, 2007), y estructuras artificiales (Villareal et al., 2007). Todos ellos son potenciales hábitats para las presas del pez león. En nuestro estudio los corales eran el hábitat muestreado con mayor importancia. Saint Barthelémy, donde se encontraron los peces tóxicos, está rodeada por arrecifes coralinos de tipo periférico (cercanos a las costas y a una profundidad máxima de 30 m), en este caso profundos. Es interesante resaltar que la zona sur, sur-este presenta una barrera más delgada que en el resto de los lugares muestreados. La mayoría de los corales que rodean Saint Barthelémy están considerados en alto riesgo de desaparición según www.reefbase.org. Esto implicaría mayores superficies donde *Gambierdiscus* podría establecerse. El estado de los

arrecifes coralinos ha sido considerado como un buen indicador de la presencia y concentración de *Gambierdiscus*, pues los corales muertos ofrecen nuevos sustratos para la colonización de los dinoflagelados (Bagnis, 1995). Sin embargo, hay muchos otros factores que influyen en las densidades tanto de peces como de microalgas y éstos son complejos y no solo relacionados con el sustrato o el hábitat sino también con el dinamismo oceánico, fenómenos meteorológicos, parámetros físicos, concentración de nutrientes, esfuerzo pesquero, etc. (Bagnis, 1995; Rongo y van Woosik, 2013; Skinner et al., 2013). Todo esto hace que sea muy complejo predecir el riesgo de ciguatera en áreas y períodos de tiempo concretos.

Este estudio, junto con el de Robertson et al. (2014) muestra evidencias de que el pez león es un potencial vector para CFP. A pesar de esto, la opinión pública confunde en ocasiones el veneno de naturaleza proteica que contienen las espinas del pez para su propia defensa (pterotoxinas) con la intoxicación alimentaria causada por las CTXs. Estudios como el de Willcox y Hixon (Willcox y Hixon, 2014) no han ayudado a clarificar esta cuestión. Dichos autores son muy críticos con los ensayos realizados en pez león para detectar CTXs y han postulado que las pterotoxinas podrían interferir en los resultados. Además, estos investigadores defienden que, dado que las pterotoxinas se desnaturalizan con el calor, el riesgo alimentario desaparecería con el cocinado. En nuestros estudios (el presente y el del grupo de Robertson) no hay lugar a confusión con las pterotoxinas puesto que, como ya se ha mencionado, estas se degradan con la cocción, lo que sucedería con nuestro protocolo de extracción. Asimismo, el peso molecular de la proteína y la C-CTX son muy diferentes con lo que los análisis cromatográficos resultarían inequívocamente distintos.

De todos modos esto hace que sea absolutamente necesario realizar más estudios en estas áreas que confirmen de forma definitiva la implicación del pez león como vector de CTXs para una mejor protección de la salud pública.

Conclusión

El CBA ha resultado un método útil para la identificación de CTXs en una nueva especie de pescado, contribuyendo así a caracterizar los riesgos asociados al consumo de peces ligados a ecosistemas coralinos. Dado que no existe todavía un método de referencia en la Unión Europea para el control de CTXs, uno de los métodos que ha demostrado ser de gran utilidad es

el uso del CBA-N2a como método de cribado, combinado con la confirmación analítica con LC-MS/MS para la detección de CTXs en laboratorios de referencia.

1.3. Estimación de los factores de equivalencia (TEFs) para ácido okadaico (OA) y las dinofisistoxinas -1 y -2 (DTX-1, DTX-2) en tres líneas celulares (Neuro-2a, NG108-15 y MCF-7)

El siguiente estudio ha dado lugar a la publicación científica: *Evaluation of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 toxicity on Neuro-2a, NG108-15 and MCF-7 cell lines*.

Lucia Soliño, Francesc X. Sureda, Jorge Diogène. *Toxicology in vitro* 29 (2015) 59-62.

El uso de ensayos celulares aporta información complementaria y útil a los actuales TEF (factores de equivalencia de toxicidad), especialmente con el uso de estándares certificados. El objetivo de este estudio era realizar la comparación del efecto tóxico relativo de estos estándares certificados sobre diferentes líneas celulares. Se usaron tres líneas celulares, NG-108-15, Neuro-2a y MCF-7 y tres toxinas de referencia, OA, DTX-1 y DTX-2. Las tres toxinas eran testadas en cada una de las líneas celulares por triplicado. Al menos tres ensayos fueron realizados en diferentes días para cada una de las condiciones.

Para todas las toxinas se encontraron diferencias significativas entre Neuro-2a y MCF-7 y también entre NG108-15 y MCF-7. No se encontraron diferencias significativas entre Neuro-2a y NG108-15. La línea MCF-7 era la menos sensible a todas las toxinas (tabla 29).

Tabla 29. Media de los EC₅₀ y desviación estándar (SD) obtenidos a partir de tres réplicas del CBA. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre toxinas y las almohadillas (#) indican diferencias significativas entre líneas celulares dependiendo de la toxina ($p > 0,05$).

Línea celular	Toxina	Media EC ₅₀ (nM)	SD
Neuro-2a	OA	11,20*	0,48
	DTX-1	5,46*	0,55
	DTX-2	21,44*	1,05
NG 108-15	OA	13,34*	4,52
	DTX-1	5,66*	0,31
	DTX-2	25,78*	1,75
MCF-7*	OA	46,95*#	2,80
	DTX-1	12,27*#	0,72
	DTX-2	64,71*#	1,50

Estos resultados sugieren que las líneas Neuro-2a y NG108-15 pueden ser comparables y usadas indistintamente para detectar toxinas lipofílicas. La línea MCF-7 además de mostrar menos sensibilidad, producía una respuesta “todo o nada” cuando era expuesta a OA y DTX-2 a concentraciones mayores de 25 nM (figura 27). Este efecto debe tenerse en cuenta si se usa este modelo con las toxinas citadas.

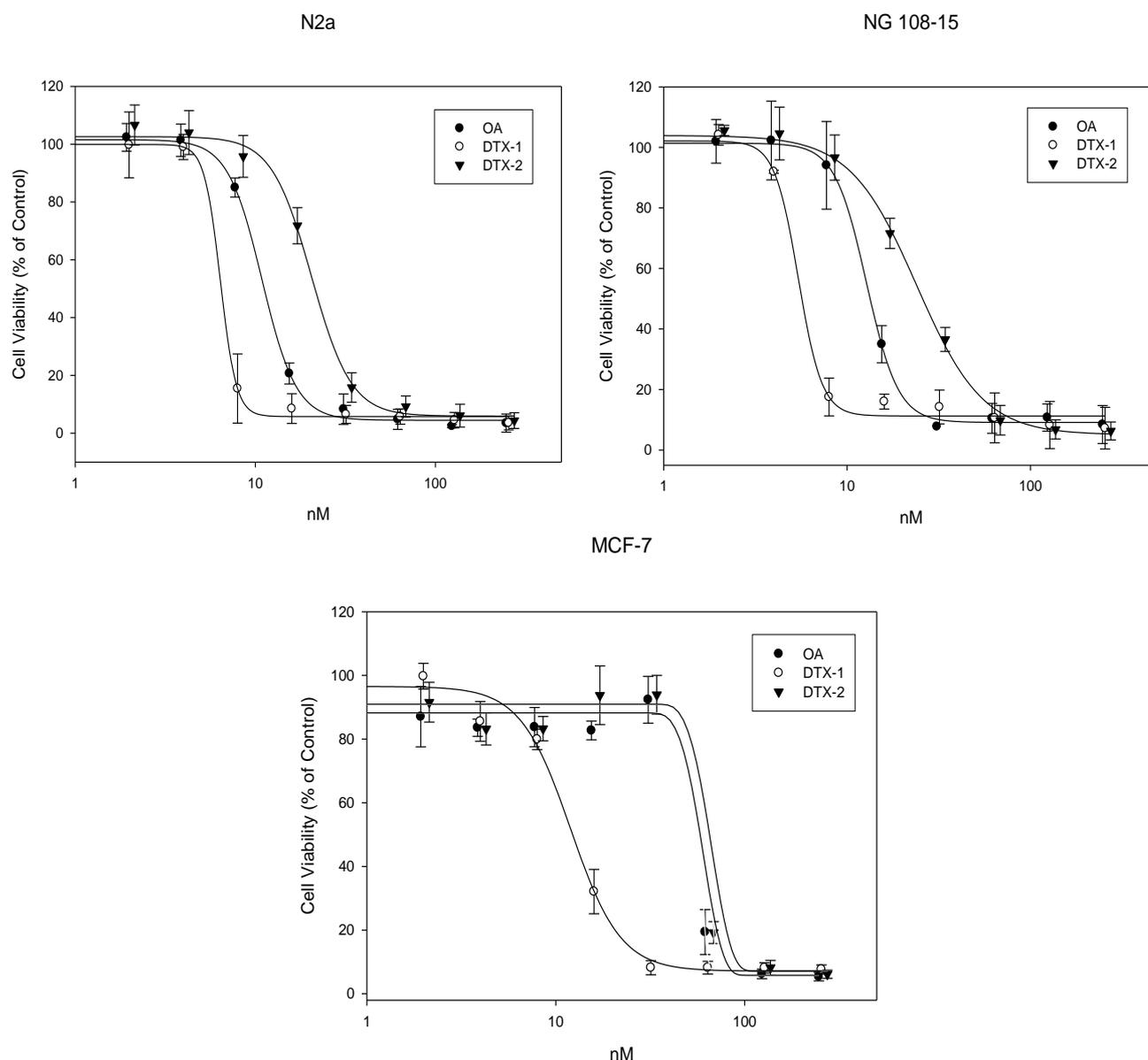


Figura 27. Efecto de las toxinas sobre la viabilidad de tres tipos de células tumorales. Cada figura representa la media de tres curvas realizadas para cada una de las tres toxinas (por triplicado): OA (●), DTX-1 (○), DTX-2 (▼).

Si comparamos las diferentes toxinas se observa que la DTX-1 presentó una mayor toxicidad, con una media de EC₅₀ de 5,46 nM en Neuro-2a, 5,66 nM en NG 108-15 y 12,27 nM en MCF-7.

La toxina que producía un menor efecto era la DTX-2, siendo la media de EC_{50} aproximadamente la mitad del efecto del OA (tabla 29).

Estos resultados divergen de otros estudios en los que la DTX-1 muestra similar efecto tóxico que el OA. Por ejemplo en ensayos realizados con ratón (MBA) se encontró similar efecto (Aune et al., 2007; Tubaro et al., 2003) o incluso un poco mayor (Van Egmond et al., 1993; Yasumoto y Murata, 1990) para DTX-1 en comparación con OA. Sin embargo, se debe ser cauto al interpretar estos resultados en ratón ya que la toxicidad depende de la vía de administración (Ito et al., 2002; Le Hégarat et al., 2006; Ogino et al., 1997; Tubaro et al., 2003) y el “end point” examinado, por ejemplo, toxicidad aguda o daño en órganos internos (Ito y Terao, 1994; Terao et al., 1993).

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por inhibición de fosfatasa (PP2A) algunos estudios encontraron valores similares de EC_{50} para DTX-1 y OA. Mountfort (2001) encontró valores de EC_{50} de 1,6 y 1,0 nM respectivamente para DTX-1 y OA con el ensayo PP2A (Mountfort et al., 2001), mientras otros autores describieron un efecto similar entre las dos toxinas usando este mismo análisis (Garibo et al., 2013; Ikehara et al., 2010; Rivas et al., 2000; Takai et al., 1992).

Estas diferencias podrían ser causadas por diferencias en los estándares usados o la fuente de proteína fosfatasa. Además, los resultados procedentes de diferentes análisis (CBA y PP2A) no siempre pueden ser directamente comparables. La inhibición de la serina/treonina fosfatasa produce interferencias en varios procesos fisiológicos, incluidos la regulación del ciclo celular y la modulación del metabolismo de proteínas (Doucet et al., 2007; Fujiki y Suganuma, 1993; Haystead et al., 1989). Las toxinas que actúan como modificadores de moléculas señal pueden interferir con rutas metabólicas clave en la regulación del crecimiento celular y diferenciación. Así, los efectos secundarios después de la adición de la toxina en un cultivo celular pueden mostrar efectos mucho más complejos que la mera inhibición de las proteínas fosfatasas. Esto explicaría las diferencias de nuestros resultados respecto a otros estudios que comparaban diferencias entre líneas celulares. En realidad, las diferencias entre líneas celulares y los diferentes “end points” nos proporcionan datos cualitativos e información de los mecanismos sobre los que actúan las DTXs, como por ejemplo la genotoxicidad (Aonuma et al., 1991; Fessard et al., 1996; Huynh-Delerme y Puisseux-Dao, 1997), alteraciones morfológicas (Van Apeldoorn y Van Egmond, 1998) o inhibición del ciclo celular (Rubiolo et al., 2011). Además de

estos datos cualitativos, la viabilidad celular es el método más directo para medir cuantitativamente la toxicidad y comparar el efecto de diferentes toxinas. Los estudios de Cañete y Diogène mostraron valores de EC_{50} de 8,9 y 11,25 nM para OA y DTX-1 en NG108-15 y valores de 21,9 y 20,6 para estas toxinas en Neuro-2a (Cañete y Diogène, 2008) con las mismas condiciones experimentales que las nuestras. Un estudio posterior de estos mismos autores mostraba valores de EC_{50} de 15,6 nM para OA y 11,3 nM para DTX-1 en NG108-15 (Cañete y Diogène, 2010) en las mismas condiciones que las presentadas en nuestro estudio. La mayor toxicidad encontrada para DTX-1 podría estar relacionada con el diferente origen de la solución estándar o diferencias en el estadio del ciclo celular. Otro grupo de investigación (Pérez-Gómez et al., 2004) investigó el efecto de la DTX-2 aislada de mejillones irlandeses contaminados en cultivos primarios de neuronas cerebelares. Los ensayos con las neuronas expuestas a DTX-2 y OA durante 24 horas permitieron determinar valores de EC_{50} de 8 nM y 2 nM respectivamente. Sin embargo, las células gliales expuestas a DTX-2 durante 24 horas daban lugar a un EC_{50} de 30 nM, lo que difiere considerablemente del resultado encontrado en neuronas. Estos resultados están de acuerdo con la toxicidad presentada en este estudio para DTX-2 después de 24 horas, siendo las células neuronales más sensibles que nuestras líneas celulares. Como se mencionó anteriormente, el uso de diferentes tipos celulares mejora la capacidad de detectar una mayor variedad de compuestos citotóxicos.

Serandour et al. (2012) y Ledreux et al. (2012) también publicaron estudios donde se intentaba estandarizar el uso del CBA para detectar varias toxinas lipofílicas (Ledreux et al., 2012; Sérandour et al., 2012) mediante la realización de ejercicios intra e interlaboratorios. Como en nuestro estudio la sensibilidad difería dependiendo de la línea celular y toxina estudiada.

Finalmente, los últimos estudios publicados durante y después de la edición del presente trabajo confirman también la mayor toxicidad de la DTX-1 en células CaCo-2 (Fernández et al., 2013; Ferron et al., 2014).

Conclusión

Este estudio indica que la DTX-1 presenta mayor toxicidad en cultivos *in vitro* que el ácido okadaico y la DTX-2. Además se ha podido concluir que la línea celular MCF-7 sería la menos indicada para detección de toxinas lipofílicas, por ser la que presenta menor sensibilidad a estas. Las líneas Neuro-2a y NG108-15 son las más indicadas y además comparables. Es muy

importante también tener en cuenta el origen de los estándares. En este estudio se usaron estándares de referencia certificados por el NRC, lo que asegura la reproducibilidad de los experimentos y la comparación de datos entre laboratorios.

2. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

2.1. Identificación y evaluación de bioactivos en las microalgas piscicidas *A. carterae* y *K. veneficum*

Las microalgas *A. carterae* y *K. veneficum* son productoras de compuestos bioactivos que actúan sobre membranas celulares. Además, en anteriores estudios con *Karlodinium* se observó que los hidrolizados del extracto producían una toxicidad en ratón similar a la de las brevetoxinas (Da Costa et al., 2005). El objetivo de este estudio era la identificación de estos compuestos y la evaluación de su actividad sobre canales iónicos en CGC.

El cultivo de las microalgas se realizó según lo descrito en el apartado 1 (*cultivo de microalgas y captación de toxinas del medio*) de *material y métodos*. Solo en el caso del estudio con *Karlodinium* se recogió el medio de cultivo, que fue expuesto a resinas SPATT® como se explica en dicho apartado. Una vez cosechados los cultivos, se procedió a la extracción de toxinas. Estos extractos y el procedente de la adsorción a las resinas fueron fraccionados posteriormente. La identificación de las fracciones bioactivas/tóxicas se realizó mediante un CBA con Neuro-2a. Estas fracciones fueron entonces evaluadas para comprobar su actividad sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata. Además, se realizó una aproximación al mecanismo de acción de las sustancias bioactivas presentes en las fracciones.

2.1.1. *Amphidinium*

2.1.1.1. Toxicidad de extractos crudos de cultivos y muestras naturales

Los ensayos de toxicidad en células Neuro-2a para la cepa objeto de estudio resultó en valores de EC_{50} de 35.500 microalgas Eq/mL (figura 28).

Posteriormente, se evaluó la capacidad del extracto crudo para incrementar la concentración intracelular (citosólica) de calcio $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en CGC, mediante la técnica de fluorimetría con Fura-2 (Verdaguer et al., 2002). La adición de concentraciones crecientes del extracto provocó un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tal y como puede observarse en la figura 29. El análisis no lineal de la curva dosis-respuesta para este extracto reveló valores de EC_{50} de 3.430 microalgas Eq/mL (figura 29).

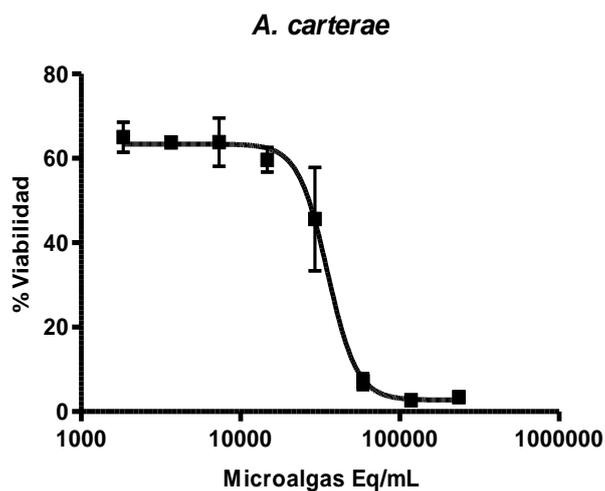


Figura 28. Curva dosis-respuesta del extracto crudo de *A. carterae* en células Neuro-2a.

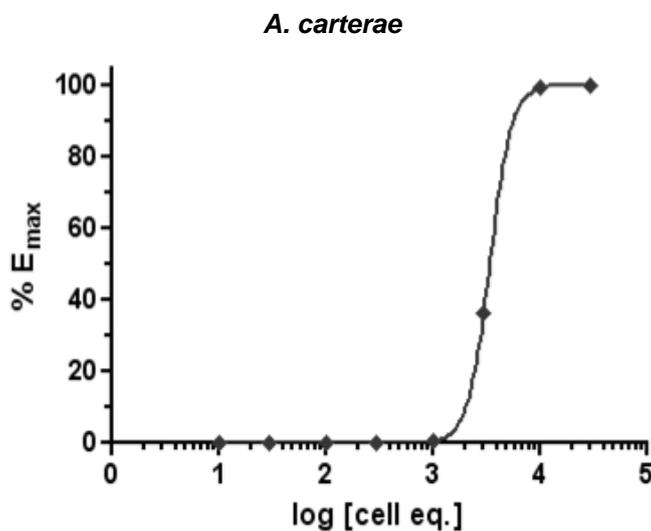


Figura 29. Curva dosis-respuesta del efecto del extracto crudo de *A. carterae* sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ en CGC.

2.1.1.2. Identificación de compuestos bioactivos y evaluación de su efecto sobre canales iónicos

Al estudiar la toxicidad en las 15 fracciones del extracto a una concentración teórica de 5×10^6 microalgas Eq/mL (suponiendo que cada fracción exhibe una toxicidad igual a la del extracto crudo) se observó un pequeño descenso de la viabilidad en Neuro-2a causada por las fracciones 6 y 12 mientras que la fracción número 9 producía una gran mortalidad (figura 30).

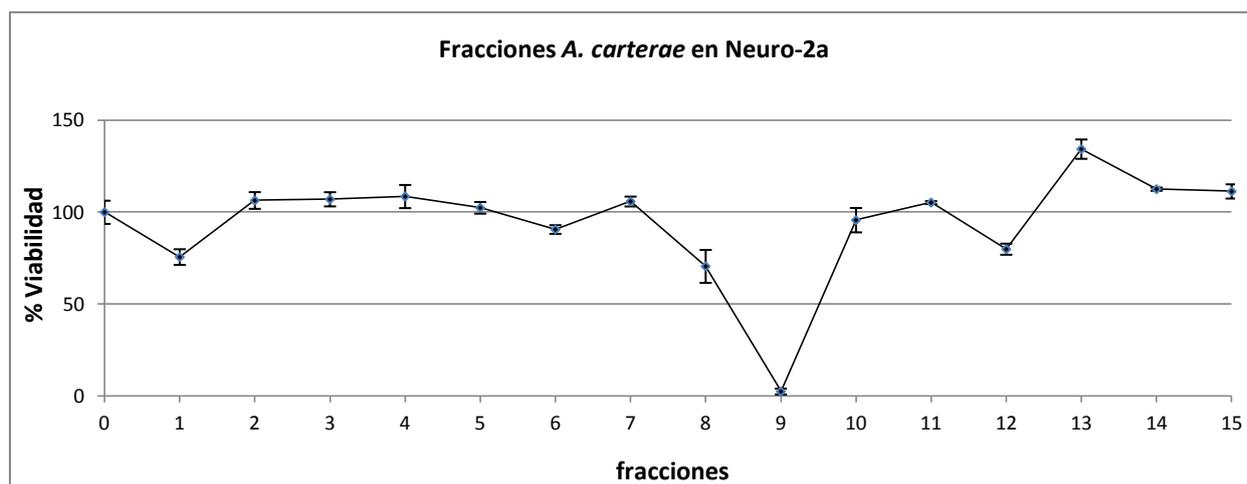


Figura 30. Toxicidad exhibida por las fracciones del extracto de *A. carterae* sobre células Neuro-2a.

La toxicidad de las fracciones testadas en CGC era mucho menor que en el extracto crudo, debido quizás al efecto sumatorio de toxicidades no detectadas en las demás fracciones o efectos matriz presentes en el extracto crudo y no en las fracciones. La EC_{50} de la fracción 9 sobre el incremento de Ca_i^{2+} en CGC, en este caso, fue de 237.112 microalgas Eq/mL (figura 31).

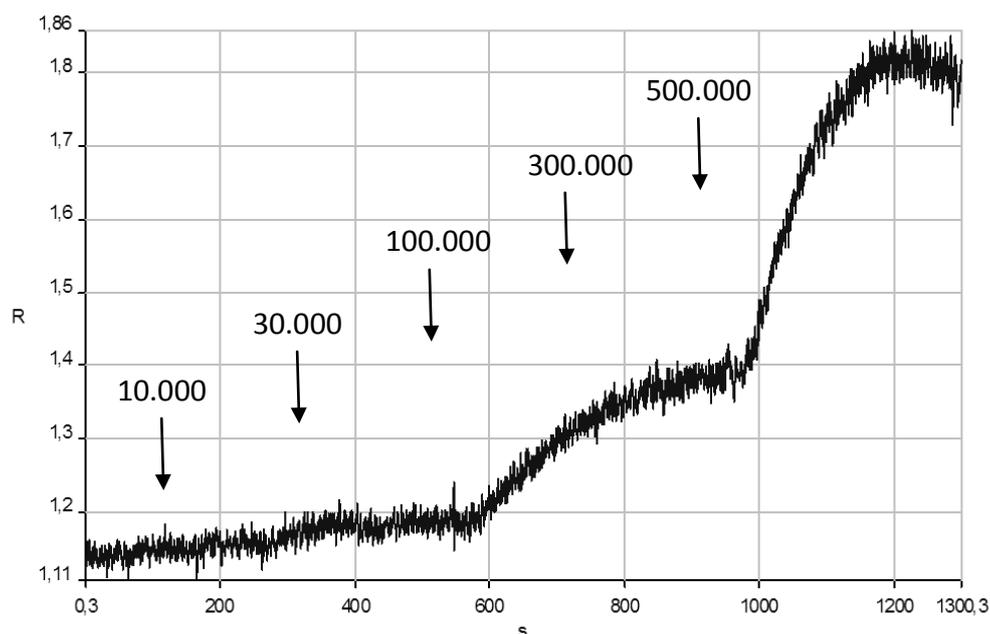


Figura 31. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de F9 sobre la concentración intracelular de calcio en CGC. En el gráfico se observa el incremento de fluorescencia (R) que indica el incremento del $[Ca^{2+}]_i$ a lo largo del tiempo cuando se añaden concentraciones de F9 en incremento desde 10.000 a 500.000 microalgas Eq/mL.

Ninguna de las restantes fracciones produjo variaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ a concentraciones de 500.000 microalgas Eq/ml.

La F9, sin embargo, parecía presentar dos efectos, un incremento muy rápido del Ca^{2+} y otro lento y más paulatino que se producía después de la aparente estabilización del Ca^{2+} , a partir de 300 segundos, aproximadamente (figura 32).

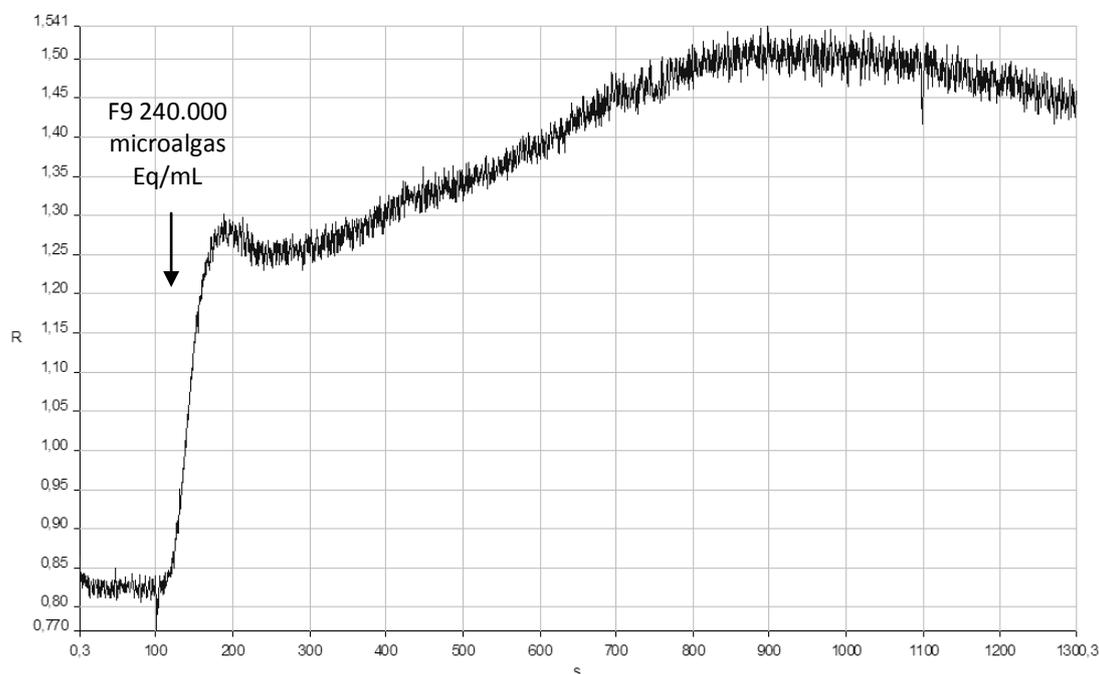


Figura 32. Evolución temporal de la concentración intracelular de Ca^{2+} a lo largo del tiempo cuando se añade F9. En el gráfico se observa el incremento de fluorescencia (R) que indica el incremento del $[Ca^{2+}]_c$ donde se observa la fase rápida y lenta provocada por la adición de F9.

Se procedió, entonces, a la adición de diferentes fármacos manteniendo una concentración submaximal de la F9 de 240.000 microalgas Eq/mL.

El nifedipino, un antagonista de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes de tipo L presentes en la membrana plasmática, no produjo efectos sobre las concentraciones de Ca_c^{2+} (figura 33). Tampoco se observaron efectos diferentes al provocado por la F9 en presencia de saxitoxina (datos no presentados).

La realización de experimentos en ausencia de Ca^{2+} extracelular no permitió establecer completamente si el incremento del $[Ca^{2+}]_c$ se producía a través de la entrada de calcio extracelular o desde almacenes intracelulares. Sí se pudo observar que la restitución de Ca^{2+} a

niveles fisiológicos producía un mayor incremento de la señal, por lo que se pudo deducir que la F9 contiene toxinas que, al menos en parte, actúan sobre la membrana celular (figura 34).

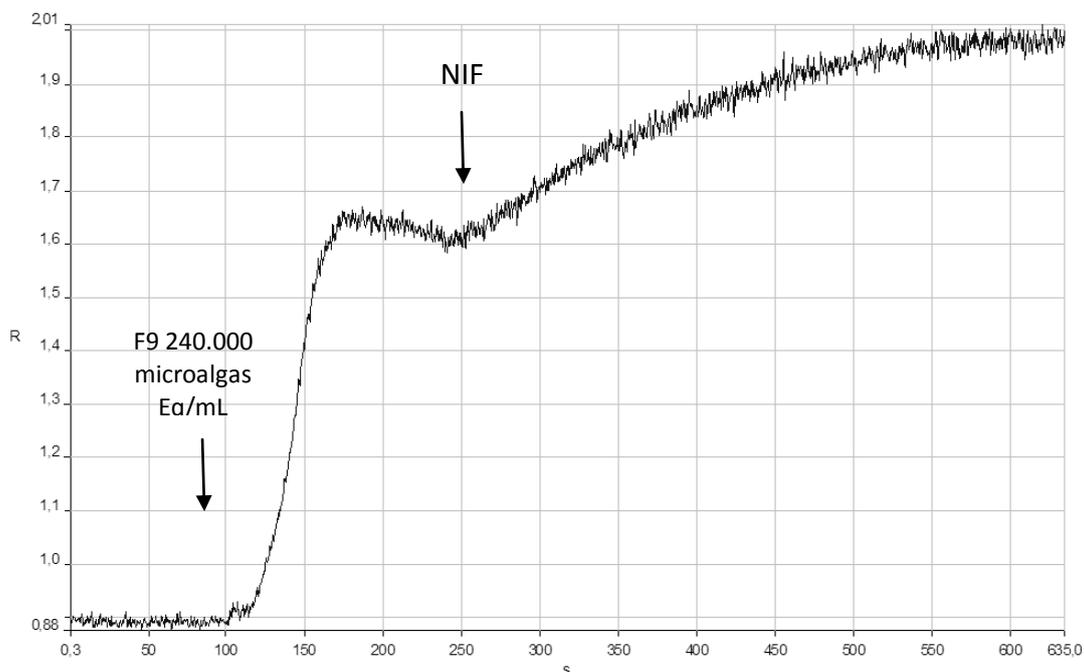


Figura 33. Efecto de nifedipino sobre la respuesta a lo largo del tiempo después de la adición de F9.

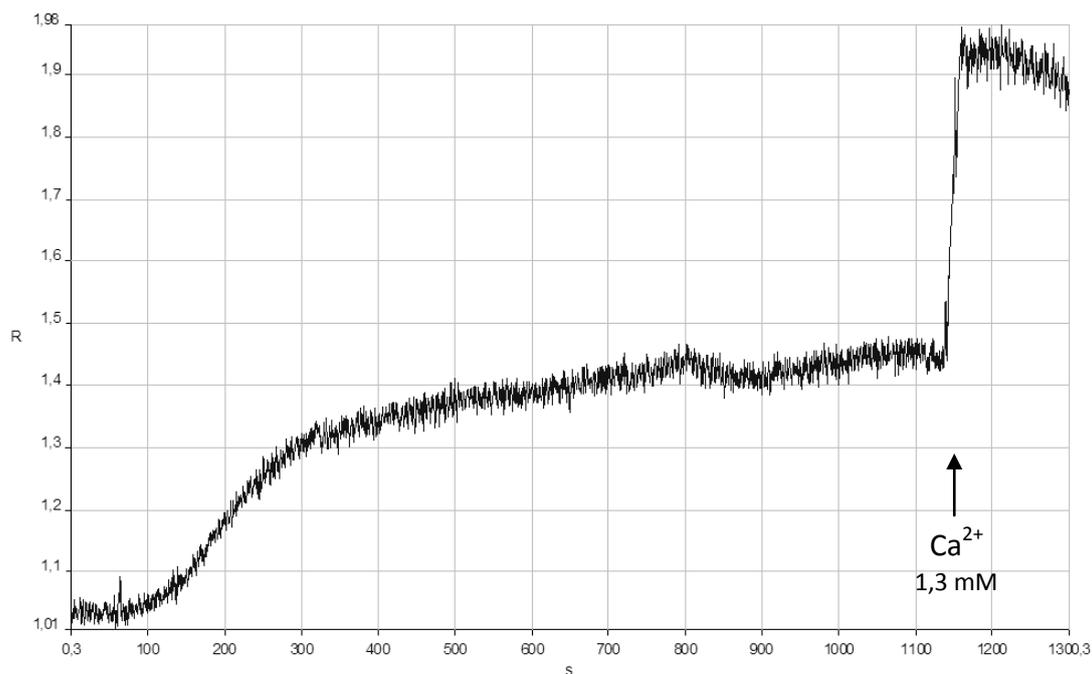


Figura 34. Tracing del incremento de $[Ca^{2+}]_c$ en CGC donde se representa efecto de la eliminación de Ca^{2+} extracelular y posterior reposición.

En los experimentos que se llevaron a cabo en ausencia de sodio extracelular (el Na^+ era sustituido por Li^+ en el tampón), se observó que el incremento de la señal se produjo

igualmente, pero en este caso ésta se retardaba ligeramente y desaparecía la fase diferida provocada por la F9 (figura 35).

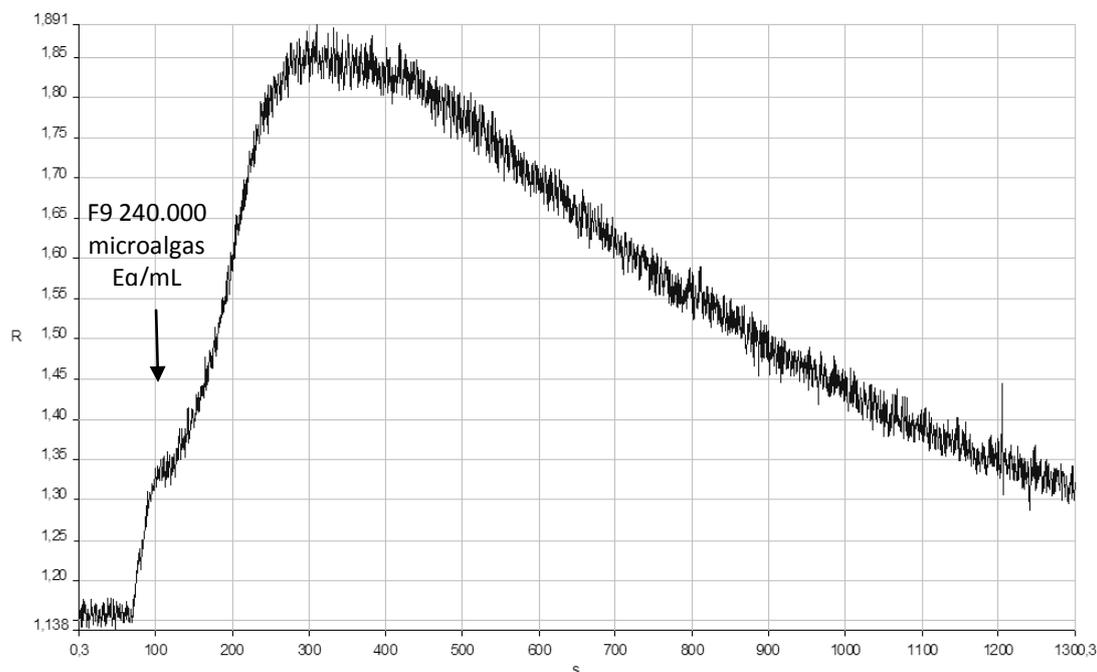


Figura 35. Evolución temporal de la señal en ausencia de sodio extracelular.

Con el fin de evaluar de forma más detallada posibles dianas de las toxinas presentes en la F9, se llevaron a cabo experimentos con diferentes moduladores de la homeostasis del calcio. Se probó el efecto de KB-R7943, un antagonista del intercambiador NCX de la membrana. No hubo alteración en los efectos de la F9, con lo que se descartó una interacción de sustancias presentes en la F9 con este transportador. Tampoco produjo ningún efecto el lantano (LaCl_3), un antagonista de la bomba de Ca^{2+} ATP-dependiente y de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de la membrana plasmática.

El siguiente paso fue evaluar si la fase diferida producida por la F9 podía deberse a movilización de Ca^{2+} desde reservorios internos. Ni el CPA, un inhibidor selectivo de la bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplasmático ni el CGP 37157, un inhibidor del intercambiador NCX mitocondrial tuvieron efecto alguno sobre el incremento de la concentración intracelular de calcio inducido por la F9.

Para comprobar si en la F9 el efecto rápido y el diferido podían ser debidos a una o más sustancias, se volvió a fraccionar la fracción 9. En este caso el fraccionamiento pretendía separar compuestos que deberían tener comportamientos lipofílicos similares. Por eso se

usaron solo tres disolventes con alto contenido de MeOH (60 MeOH: 40 H₂O, 80 MeOH: 20 H₂O y 100% de MeOH) y se realizaron hasta 25 fracciones. Con este protocolo de fraccionamiento se obtenían dos picos de toxicidad muy próximos, en las fracciones 16 y 18, justo cuando se producía el cambio de disolvente, revelando la posibilidad de la existencia de dos compuestos con diferente polaridad (figura 36).

Dada la reducida cantidad de fracciones obtenidas por medio del fraccionamiento se procedió al análisis de ésta por medio de LC-MS/MS. En las sub-fracciones 16 y 18 de la F9 se encontró un pico al minuto 4,89 que se correspondía con un compuesto de masa 1361 m/z bastante abundante. Este compuesto estaba en el rango m/z de los amphidinoles. Según la bibliografía existente podría tratarse del amphidinol 7 (AM07) (Morsy et al., 2006) pero el scan de iones producto no proveía información suficiente para confirmarlo. Los tres fragmentos mayoritarios en el MS² scan fueron 1085 m/z, 687 m/z y 1143 m/z (CE 110 V).

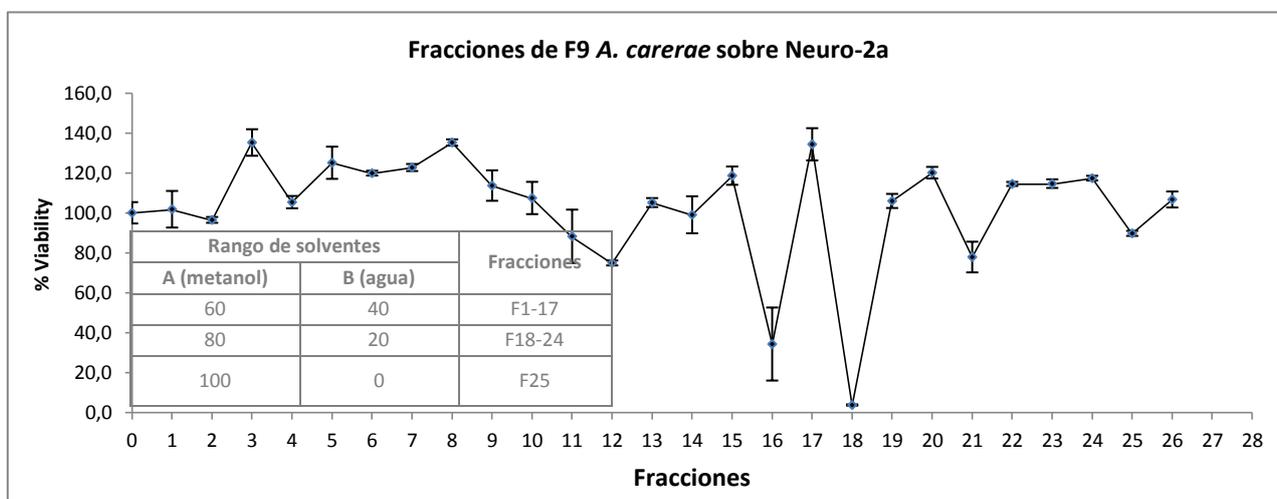


Figura 36. Fraccionamiento de la fracción 9 según el protocolo que aparece en la tabla adjunta a la figura.

2.1.2. *Karlodinium*

2.1.2.1. Toxicidad de extractos crudos de cultivos y muestras naturales

En experimentos realizados en el laboratorio en abril de 2012 se analizaron por CBA diferentes extractos metanólicos de *Karlodinium*. Se utilizaron extractos de *Karlodinium sp.* procedentes de un *bloom* presente en ese momento en la Bahía de Alfacs (2012) y de un cultivo de *Karlodinium veneficum* procedente de cepas aisladas en 2007 durante un *bloom* anterior.

Las muestras de *bloom* natural fueron recogidas en diferentes puntos:

Punto Bahía central (40° 34' 54,4309" N; 0° 37' 37,474" E) a 6 metros de profundidad.

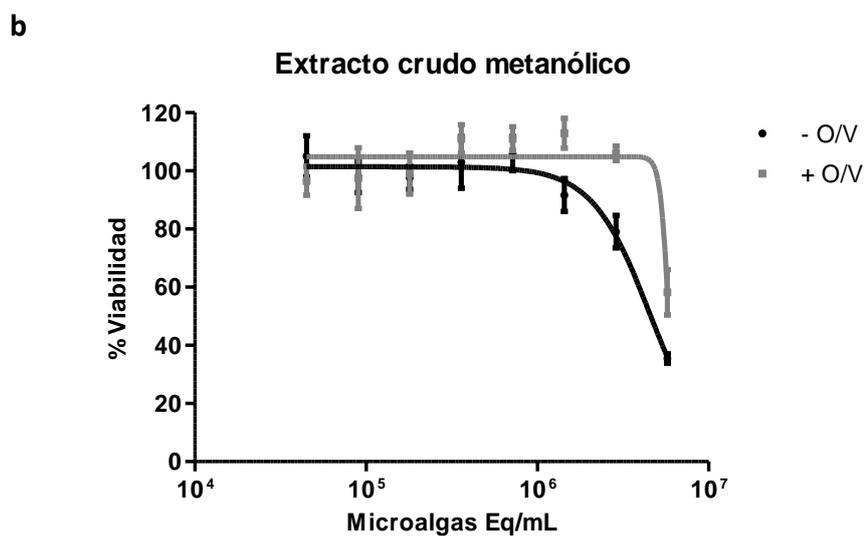
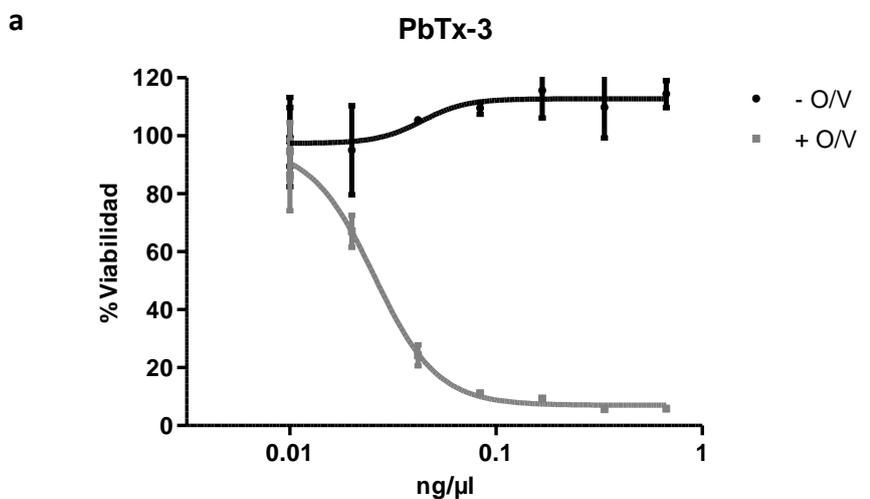
- Tanque de peces *Sparus aurata* en las instalaciones del IRTA (agua cruda, no filtrada).
- Balsa de sedimentación al final del circuito de la planta de acuicultura en el IRTA, donde se sedimenta el agua que sale de los tanques de peces, antes de ser devuelta otra vez al mar.

Las muestras tomadas presentaron toxicidad tanto en células Neuro-2a como en MCF-7, siendo las más tóxicas las tomadas en el mar a 6 metros de profundidad ($EC_{50} = 4.630$ y 4.284 microalgas Eq/mL en células Neuro-2a y MCF-7 respectivamente). Las tomadas en el tanque de peces arrojaron valores de 30.481 y 24.376 microalgas Eq/mL en células Neuro-2a y MCF-7, respectivamente, y finalmente aquellas recogidas en la balsa de sedimentación presentaron una toxicidad muy débil (92.5925 y 86.206 microalgas Eq/mL en células Neuro-2a y MCF-7).

Los cultivos de *K. veneficum* realizados a partir de la cepa aislada en 2007 fueron cosechados y el medio de cultivo se sometió durante 72 horas a resinas SPATT[®] para captar la toxina en el agua. Para evaluar los posibles efectos matriz de ésta se realizó paralelamente un blanco solo con resina y un control con PbTx-3.

Parte de estos extractos fueron sometidos a hidrólisis ácida como se describe en da Costa et al., 2005 (Da Costa et al., 2005) ($250 \mu\text{l}$ de HCl 4N, 100°C , 15 min). Los ensayos de toxicidad se realizaron en presencia/ausencia de O/V para detectar posibles efectos similares a los de la PbTx-3. El patrón de PbTx-3 mostraba una EC_{50} de $0,025 \text{ ng}/\mu\text{L}$ en presencia de O/V mientras que en ausencia de éstas no se observaba toxicidad alguna. El extracto crudo metanólico presentó una EC_{50} de $4,54 \times 10^6$ microalgas Eq/mL en ausencia de OV y de $5,82 \times 10^6$ en presencia de éstas, por tanto, no mostraba un patrón similar al de las PbTx-3. Los extractos hidrolizados, tampoco produjeron un patrón de tipo PbTx y además mostraban menor toxicidad sobre las células Neuro-2a, siendo la EC_{50} de éstas $1,26 \times 10^7$ y $1,23 \times 10^7$ microalgas Eq/mL en ausencia y presencia de O/V respectivamente. El extracto procedente de las resinas de captación del medio, a pesar de no presentar un efecto de tipo PbTx sí mostró toxicidad para Neuro-2a a concentraciones para las cuales el blanco había sido inocuo para éstas. Las EC_{50} obtenida en estos ensayos con Neuro-2a fueron $0,16$ y $0,15$ g de resina extraída/mL para O/V- y O/V+ (figura 37). El número total de microalgas en el cultivo en el momento de la cosecha y

del inicio de la captación de toxinas en el medio fue de 240×10^6 microalgas (en 4 L de medio). La cantidad de resina usada fue de 63 g para los 4 litros de medio. Por tanto la toxicidad captada por la resina corresponde a $3,8 \times 10^6$ microalgas Eq/ gramo de resina y los EC_{50} equivaldrían a $6,1 \times 10^5$ microalgas Eq/mL y $5,7 \times 10^5$ microalgas Eq/mL para O/V- y O/V+.



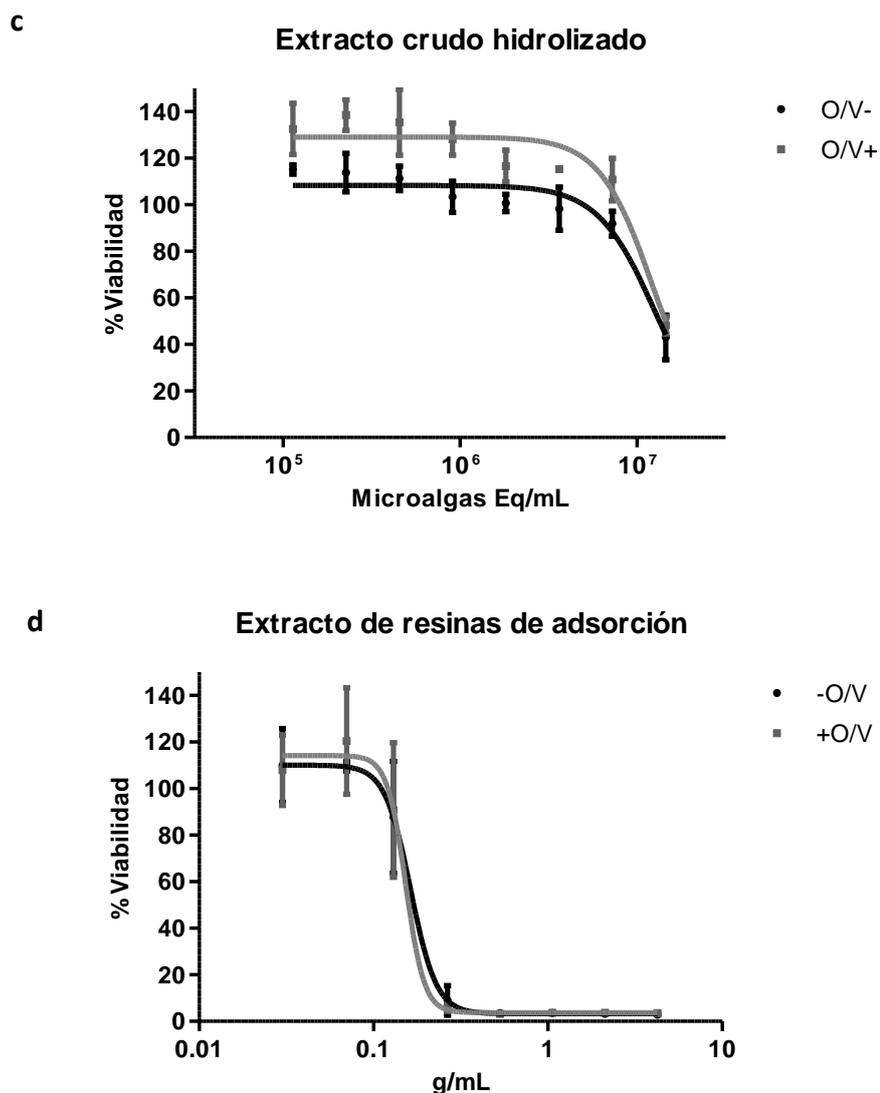


Figura 37. Curvas dosis-respuesta en presencia/ausencia de ouabaina y veratridina de: a) estándar de PbTx; b) el extracto crudo metanólico y c) hidrolizado y d) el extracto de las resinas de adsorción del medio, procedente de un cultivo de *K. veneficum*. Los ensayos fueron realizados al menos 3 veces en diferentes días. Las barras indican la desviación estándar.

2.1.2.2. Identificación de compuestos bioactivos y evaluación de su efecto sobre canales iónicos

Los fraccionamientos de los extractos de *K. veneficum* se realizaron con el extracto metanólico del cultivo y con el extracto de las resinas de captación de toxinas. El resultado de estos fraccionamientos se puede ver en la figura 38.

Las concentraciones teóricas de cada fracción fueron $7,26 \times 10^6$ microalgas Eq/mL en caso del extracto metanólico y 0,79 g/mL de resina ($3,01 \times 10^6$ microalgas Eq/mL).

Las fracciones fueron evaluadas mediante los mismos experimentos que en el caso del *A. carterae* para elucidar sus efectos sobre canales iónicos en CGC. Las fracciones que no presentaron toxicidad para Neuro-2a tampoco produjeron incrementos de $[Ca^{2+}]_c$ en las CGC. Las fracciones seleccionadas para el estudio fueron las fracciones K1, K10 y K11 del fraccionamiento del extracto de microalgas y la fracción Kr1 del fraccionamiento del extracto de resinas.

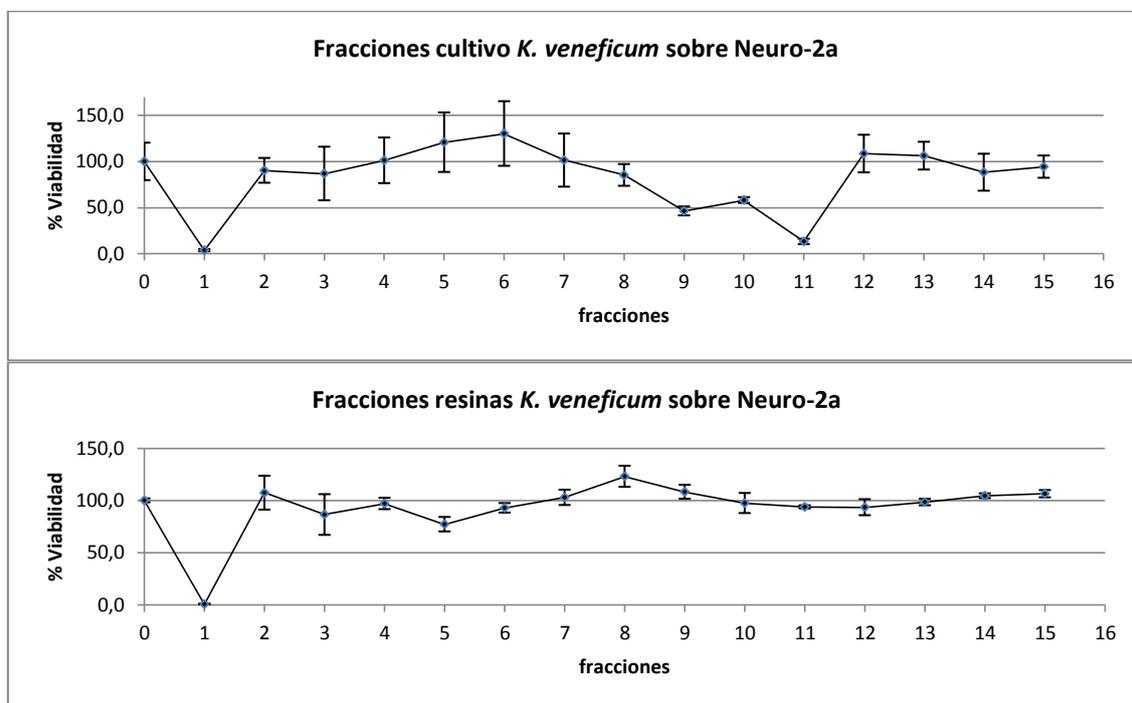


Figura 38. Fraccionamientos del extracto metanólico de *K. veneficum* (arriba) y del extracto procedente de las resinas SPATT®.

Los resultados fueron similares a los encontrados en *Amphidinium*, con algunas divergencias, por ejemplo, en la potencia. Una concentración de 558.000 microalgas Eq/mL, apenas producía un incremento de $[Ca^{2+}]_c$ de 0,3 unidades de fluorescencia y de 0,1 unidades en el caso de Kr1, K10 y K11. Esto podría haberse debido a la degradación de karlotoxinas, puesto que éstas se degradan con relativa facilidad.

Las pruebas sobre la eliminación del Ca^{2+} y posterior reposición, mostraron en todos los casos un patrón similar al de la F9 de *Amphidinium*, produciéndose un ligero aumento en la concentración de Ca_i^{2+} al añadir el extracto, que aumentaba de forma súbita al reponer el Ca^{2+} en el tampón. Así, por ejemplo, para K1 el incremento inicial era de 0,2 unidades en el tampón

sin Ca^{2+} y al ser restaurado se producía un incremento de 0,4 unidades. Este patrón se repitió también para Kr1, K10 y K11.

El reemplazo de Na^+ por Li^+ producía una reducción del incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ inicial que descendía paulatinamente, del mismo modo que sucedía con la F9 del *Amphidinium*. Este patrón se repitió también para Kr1, K10 y K11.

Finalmente, la adición de los antagonistas no tuvo efecto sobre ninguno de las fracciones testadas, a excepción del LaCl_3 que producía una ligera reducción (0,04 unidades de fluorescencia) que posteriormente desaparecía. Este patrón se repitió también para Kr1, K10 y K11.

Como se ha mencionado anteriormente, tanto *Amphidinium* como *Karlodinium* muestran una gran variedad de productos bioactivos, hemolíticos y anticancerígenos ante diferentes líneas celulares. Muchos de ellos están solo en fases iniciales de estudio y en la mayoría de los casos estos estudios se centran en su síntesis (Albadry et al., 2014; Bensoussan et al., 2014; Bhakuni y Rawat, 2005; Kita et al., 2010; Kobayashi y Kubota, 2007; Van Wagoner et al., 2008).

Los efectos neuroactivos podrían tener relación directa con el cambio en los flujos de iones ya que el perfil de fluorescencia obtenido mediante la determinación con Fura-2 podría estar indicando un efecto de tipo ionóforo. Esto concordaría con los resultados de otros estudios realizados para evaluar la capacidad de los amphidinoles de formar poros en las membranas celulares y su interrelación con componentes de la bicapa lipídica (Houdai et al., 2008, 2004; Morsy et al., 2008). El modo de acción de la karlotoxina es también mediante la formación de un poro en la membrana celular vía unión a fosfolípidos (Deeds et al., 2015, 2006) de forma similar al amphidinol producido por *Amphidinium*. Los últimos estudios de Deeds et al. (2015) indican que la KmTx-2 causa un incremento en la permeabilidad a cationes como el Na^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} y K^+ , en diferentes tipos celulares de vertebrados, lo que está de acuerdo con lo observado en este estudio. Una de las diferencias entre el mecanismo de acción de estos dos grupos de toxinas (amphidinoles y karlotoxinas) es el papel que juegan los esteroides de membrana. La presencia de colesterol en liposomas potencia la acción de los amphidinoles (Paul et al., 1997). La presencia de esteroides de membrana específicos del *Karlodinium* tiene una acción protectora contra las Km-Txs (Deeds y Place, 2006).

Las microalgas del género *Karlodinium* suelen expulsar con facilidad la toxina (Delgado y Alcaraz, 1999). Esta característica es usada por el dinoflagelado para paralizar a sus presas (Sheng et al., 2010). En los estudios de Sheng y col. (2010) la presencia de microalgas de cepas tóxicas de *Karlodinium veneficum* al igual que la presencia de KmT-1 y KmT-2 producía una disminución de la movilidad de la presa.

En el presente estudio, mediante el uso de resinas de adsorción SPATT[®], se obtuvo una fracción claramente tóxica para Neuro-2a presente tanto en el extracto de microalgas como en el extracto de las resinas. Esta fracción tóxica no parece coincidir con un perfil de Km-Txs, puesto que en estudios anteriores la obtención de las Karlotoxinas se producía en las fracciones entre 60%-80% MeOH acuoso (Van Wagoner et al., 2010, 2008) mientras que en el fraccionamiento realizado en este estudio la fracción 1 se corresponde con un 20:80 (MeOH:H₂O).

Las KmT-1 y KmT-2 son muy similares a Amphidinoles con fórmula molecular de C₆₉H₁₂₆O₂₄ (Van Wagoner et al., 2008) y C₆₇H₁₂₁Cl O₂₄ (Peng et al., 2008) respectivamente (figura 39). El fraccionamiento realizado con el mismo protocolo en ambas microalgas revela fracciones tóxicas aproximadamente en el mismo rango de dilución (fracciones 9-11), a excepción del caso del *Karlodinium* donde se reveló la presencia del compuesto polar en la fracción 1 que aparece tanto en la microalga como en el medio.

En cuanto al potencial tóxico, se sabe que el *Karlodinium* en cultivo presenta menor toxicidad que en las muestras naturales, como pudo ser también comprobado en este estudio (Bachvaroff et al., 2009; Deeds et al., 2002).

Los tipos celulares que se utilizaron en estos experimentos, tanto las Neuro-2a como las MCF-7 mostraron idéntica sensibilidad a los extractos crudos que se evaluaron. Este hecho también parece indicar que las muestras contenían compuestos poco específicos, que afectan a muy diferentes tipos celulares de vertebrados, tal y como se comprobó también en el estudio de Deeds y col. (2015).

Conclusión

De los resultados obtenidos podemos concluir que la cepa de la microalga *A. carterae* estudiada produce al menos un compuesto con actividad y rango de m/z similar a los amphidinoles, que muestra toxicidad en células Neuro-2a y CGC, no dependiente de canales

iónicos. Estos efectos son coincidentes con los que aparecen en los compuestos de *Karlodinium*, por lo que sería muy probable que se tratasen de derivados de karlotoxinas.

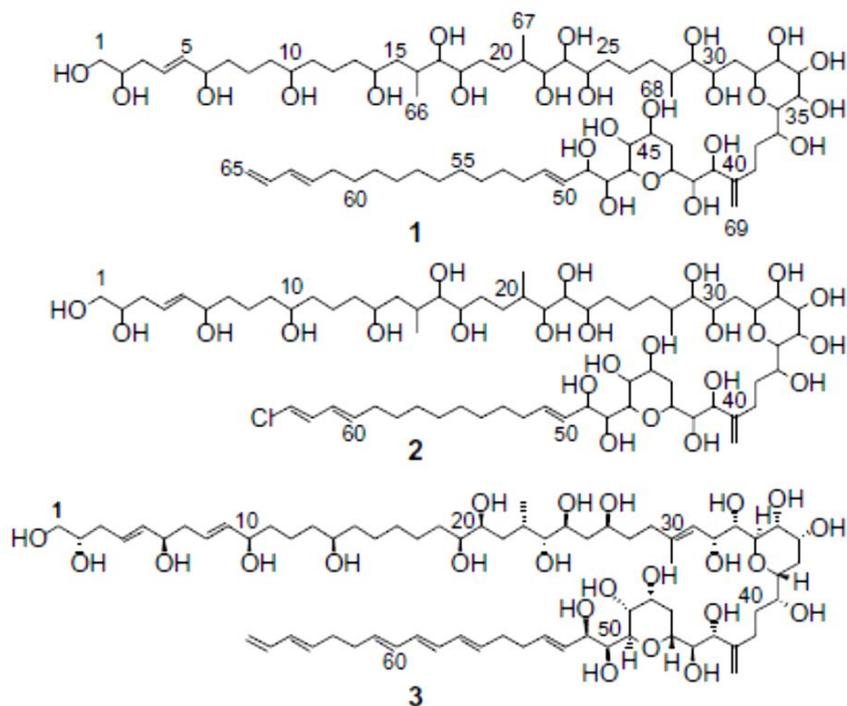


Figura 39. Estructuras de las karlotoxinas y amphidinol 3: 1) KmTx1; 2) KmTx2; 3) amphidinol 3.

2.2. Potencial inflamatorio y tumoral de extractos de *Ostreopsis cf. ovata* y efectos sobre canales iónicos de las ovatoxinas a y b aisladas de una cepa de del Mediterráneo

Parte de los resultados expuestos en este apartado han dado lugar a la publicación: *Semi-purified Ovatoxins a and b from a Ostreopsis cf. ovata exhibit similar toxicity to palytoxin on rat cerebella granule cells*. Lucía Soliño, María García-Altres, Patrizia Ciminiello, Jorge Diogène and Francesc X. Sureda. *Toxicon* (en revisión).

Las OVTXs, al igual que las PLTXs, interfieren en el equilibrio iónico e inducen la síntesis de proteínas de respuesta inflamatoria que están implicadas en la formación de tumores. El descubrimiento de una cepa altamente productora de OVTXs en aguas de la costa catalana permitió obtener y evaluar el mecanismo de acción de estas toxinas. El objetivo de este estudio era la caracterización de su toxicidad en diferentes tipos celulares de tejidos humanos y de sus efectos sobre canales iónicos de las membranas celulares.

La cepa de *O. cf. ovata* fue aislada a partir de muestras tomadas de la macroalga *Jania rubens* en una localidad situada al sur del delta del Ebro, en Cataluña (40° 33' 15.7176" N; 0° 31' 58.242" E). El cultivo se realizó de acuerdo con lo establecido en el apartado 1 (*cultivo y captación de toxinas del medio*) de *material y métodos*. Una vez cosechado, el medio se sometió a resinas de adsorción durante 96 horas y las microalgas se mantuvieron en MeOH a -20°C hasta su extracción. Una parte del extracto crudo metanólico se utilizó para evaluar la respuesta inflamatoria en diferentes tipos celulares durante una estancia realizada en el ANSES (Francia). Otra parte del extracto crudo se fraccionó para la identificación y recuperación de las OVTXs y su posterior evaluación sobre la homeostasis del Ca²⁺ en CGC de rata.

2.2.1. Cuantificación de toxinas del extracto crudo de *O. cf. Ovata*

Esta cepa (a la que nombraremos como OSTR-21) presenta un complejo perfil de PLTXs y análogos donde están presentes las OVTXs a, b, c, d, e, g además de la iPLTX. El principal compuesto es la OVTX-a, que contribuye con un 51,9% a la toxicidad total. De hecho, el 95% de los compuestos que aparecen corresponden a las OVTXs (tabla 30).

Tabla 30. Cuantificación del extracto crudo de *O. cf. ovata* OSTR-21

Compuesto tóxico	OSTR-21 (536.052 Microalgas Eq/mL)	
	Concentración (ng/mL)	%
iPLTX	67,98	0,4
OVTX- a	10162,70	54,2
OVTX- b	5641,92	30,1
OVTX- c	622,43	3,3
OVTX- d	1006,55	5,4
OVTX- e	1120,86	6,0
OVTX- g	134,89	0,7
total	18757,32	100

2.2.2. Efectos de PLTX y extracto crudo de la cepa OSTR-21 sobre la viabilidad celular

Para estos experimentos se utilizaron tres tipos celulares diferentes: Caco-2, A549 y HepaRG. La exposición a las toxinas se realizó con el extracto crudo de la cepa OSTR-21 y PLTX.

Los efectos de PLTX y del extracto crudo de OSTR-21 sobre la viabilidad celular se presentan en la tabla 31. El EC₅₀ para el extracto crudo se presenta tanto en microalgas Eq/mL como ng/mL y corresponde a la cantidad total de compuestos tóxicos en el extracto (iPLTX+OVTXs).

Tabla 31. Valores de EC₅₀ obtenidos en las diferentes líneas celulares estudiadas cuando eran expuestas 24 horas a PLTX y a extracto crudo de OSTR-21. Las desviaciones estándar corresponden a tres repeticiones del ensayo llevadas a cabo de forma independiente en diferentes días.

Línea celular	PLTX EC ₅₀ (ng/mL)	OSTR-21 EC ₅₀	
		Toxicidad total (ng/mL)	(Microalgas Eq/mL)
A549	7,29 ± 1,48	9,556 ± 1,17	189,83 ± 23,26
HepaRG	8,666 ± 0,13	9,346 ± 3,26	185,86 ± 64,84
CaCo-2	9,65 ± 0,60	11,692 ± 1,90	232,26 ± 37,87

2.2.3. Efecto sobre la inflamación y promoción tumoral causado por PLTX y OSTR-21 en células hepáticas y alveolares: Producción de interleucina 8, caspasa 3, NF-κβ, γH2ax y Ki67.

En células alveolares A459 la producción de IL-8 era baja y no dependiente de la concentración de PLTX o del extracto de OSTR-21. La máxima respuesta obtenida fue 78,66 pg/mL de IL-8 para

una concentración de PLTX igual a 0,23 ng/mL y de 32,87 pg/mL de IL-8 para una concentración de 14,47 microalgas Eq/mL o 0,62 ng/mL de OSTR-21. En ninguno de los dos casos se incrementaba la producción de IL-8.

En las células hepáticas HepaRG, sin embargo, la IL-8 se incrementaba ligeramente con concentraciones de PLTX de entre 0,03 a 15 ng/mL y concentraciones de extracto crudo de OSTR-21 de entre 0,83 a 450 microalgas Eq/mL (o lo que es lo mismo 0,041-22,65 ng/mL de toxinas). En este caso la máxima respuesta cuantificable con el estándar de IL-8 para estas muestras era que 1 ng/mL de PLTX y 26,62 microalgas Eq/mL (1,34 ng/mL de toxinas) producían 125 pg/mL de IL-8.

En cuanto a la producción de caspasa 3 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre OSTR-21 y PLTX, aunque sí se mostraba un ligero incremento en la producción de caspasa 3 a medida que aumentaba la concentración de PLTX. Este efecto era apreciable tanto en A-549 como en HepaRG y era más marcado en esta última línea celular (figura 40).

La producción de NF- κ B no produjo diferencias estadísticamente significativas respecto al control en ninguna de los dos tratamientos (PLTX o OSTR-21), aunque si se mostraba una ligera correlación entre el aumento de la dosis de las toxinas y NF- κ B en células A-549.

En el caso de γ H2ax se observaba un ligero aumento en ambas líneas celulares y para ambos compuestos tóxicos a medida que aumentaba la concentración, especialmente notable en la cepa HepaRG. A pesar de ello, no se encontraron diferencias significativas respecto al control ni entre ambos tratamientos.

En el caso de la medida de Ki67, prácticamente no había diferencias respecto al control sin toxinas. Es notable que, en estos controles la cantidad de Ki67 fuera más elevada en A549 que en HepaRG. Esto es debido, muy posiblemente, al hecho de que las A549 era una cepa no diferenciada y por tanto conservaba su capacidad de división, mientras que en HepaRG, estas células estaban diferenciadas y por tanto no conservaban esta capacidad. Este dato es interesante porque demuestra la capacidad del ensayo para detectar este factor.

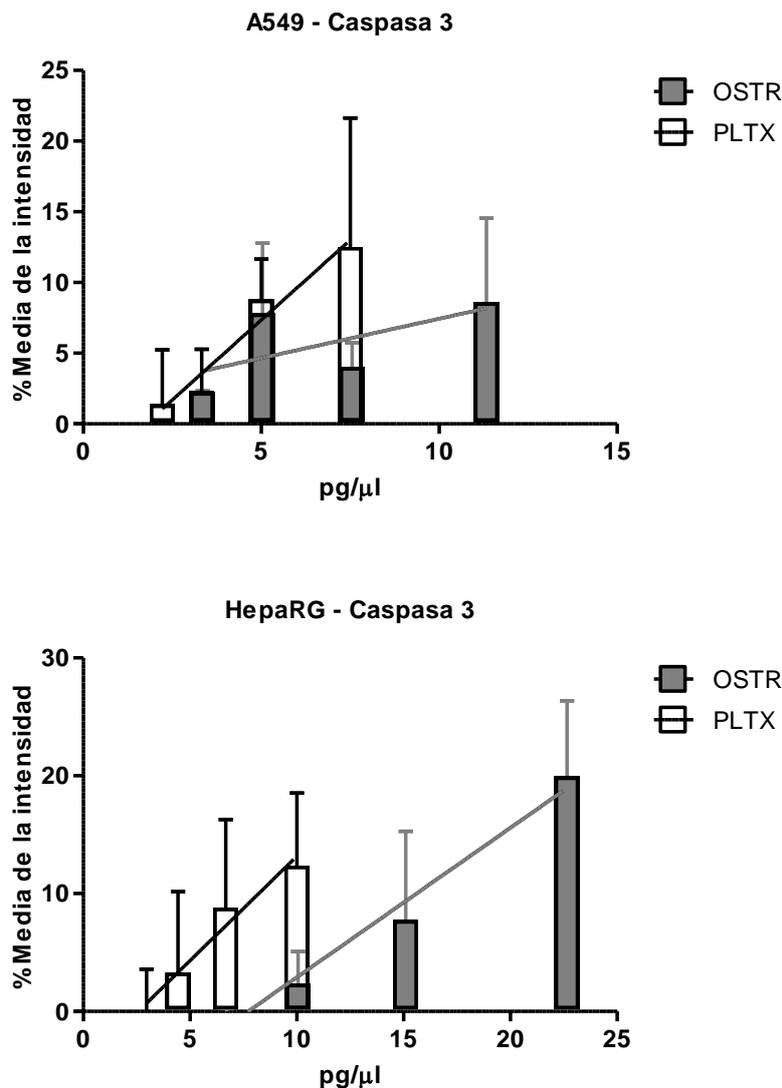


Figura 40. La intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias) refleja el incremento de caspasa 3. Las desviaciones estándar corresponden a la media de tres experimentos realizados de forma independiente, cada uno con tres réplicas de cada dosis.

2.2.4. Fraccionamiento del extracto de *O. cf. Ovata* y cuantificación del extracto semi-purificado

Para lograr el aislamiento de las OVTXs se probaron diferentes métodos de fraccionamiento. En un primer momento se usó un cromatógrafo Waters 996 Photodiode Array Detector con un colector de fracciones. Se recogieron 60 y hasta 80 fracciones con un protocolo donde el rango de solventes iban desde 95:5 hasta 2:98 (H₂O+30mM ácido acético): (95%Acetonitrilo+5%H₂O 30mM ácido acético), respectivamente. Con estos protocolos la OVTX-a eluía entre las fracciones 47-49. Tras comprobar mediante CBA y cromatografía que las fracciones contenían OVTXs a se intentó mejorar el proceso de depuración para evitar pérdidas. Para esto se utilizó

un cromatógrafo LC/MS Triple cuadrupolo Agilen 1200 LC System. Con este protocolo la OVTX-a eluía a 8,6 minutos. Así, esta técnica finalmente utilizada consistía en realizar un gran número de pinchazos sucesivos de muestra (hasta 100) de pequeño volumen (10 μ L) de forma que al pasar por la columna cromatográfica se recuperaba el rango de muestra que eluía entre los 8,4-9,2 minutos, en los cuales se encuentra la OVTX-a. Esta fracción se recogía en un tubo para su posterior evaporación y análisis.

Mientras que el perfil tóxico de los extractos crudos de *O. cf. Ovata* era muy complejo e incluía iPLTX) y OVTX-a, -b, -c, -d, -e, -g (tabla 30) (García-Altare et al., 2014), el análisis LC-HRMSⁿ del extracto semi-purificado (identificado a continuación como OV-21) revelaba la presencia de OVTX-a y OVTX-b (tabla 32 y figura 41). En ningún caso se encontraron trazas de iPLTX en la fracción aislada. Sin embargo, los extractos de las resinas expuestas al medio de cultivo no mostraban toxinas de ningún tipo.

Tabla 32. Cuantificación del contenido de ovatoxinas en OV- 21.

OVTX-a (ng/mL)	OVTX- b (ng/mL)	Total (ng/mL)
1583,81	797,53	2381,35

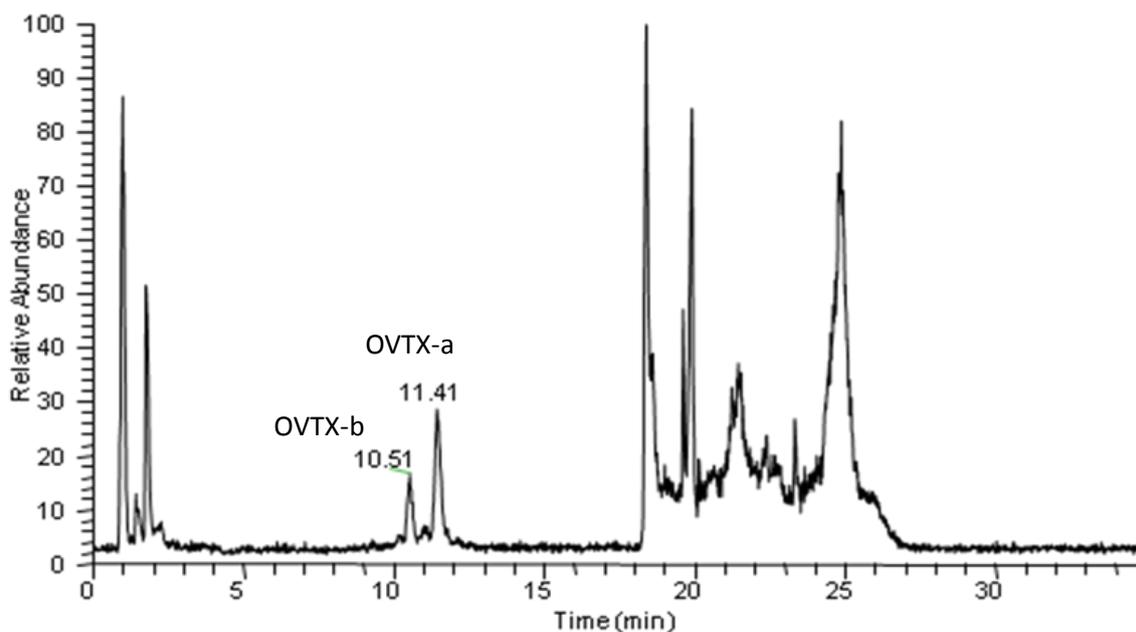


Figura 41. Cromatograma de OV-21 mostrando los picos correspondientes a OVTX-a y b.

2.2.5. Efecto tóxico de PLTX y OV-21 sobre la viabilidad de CGC

Las EC₅₀ para el estándar de PLTX y OV-21 obtenidas fueron de 4,2 y 4,7 ng/mL, respectivamente, por tanto, su efecto era similar (figura 42).

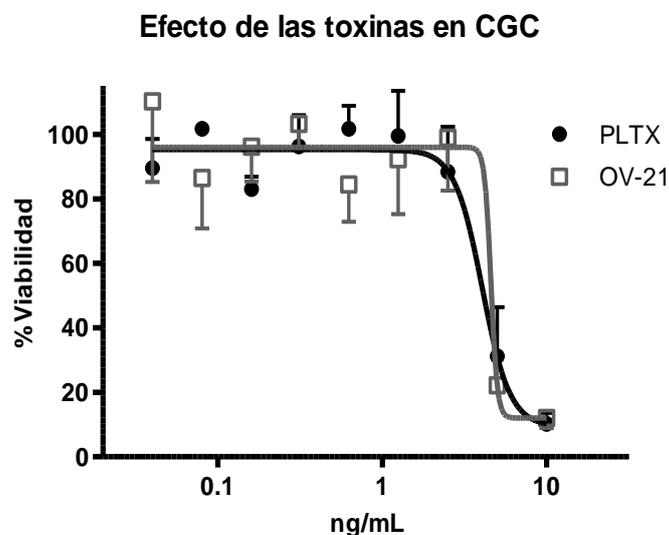


Figura 42. Viabilidad de CGC expuestas a PLTX o OV-21. Las desviaciones estándar corresponden a tres réplicas.

2.2.6. Efecto sobre el flujo de calcio en CGC de rata, expuestas a PLTX y OV-21

Con la finalidad de establecer diferencias entre el mecanismo de acción de las OVTXs presentes en OV21 y PLTX se realizaron los experimentos que se relacionan en la siguiente tabla (tabla 33).

Tabla 33. Experimentos llevados a cabo para la evaluación de $[Ca^{2+}]_c$ en CGC expuestas a las toxinas.

Nº experimento	Objetivo	Antagonista/agonista (concentración final)
1	Reversibilidad	-
2	Dependencia de Na ⁺ extracelular	P-CTX-1 (0,15 ng/mL)
3	Dependencia de Ca ²⁺ extracelular	-
4	Efecto en el bloqueo de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa y VGSC	Ouabaina (1 mM)
		Saxitoxina (100nM)
5	Efecto en el bloqueo de VGSC y VGCC tipo L	Saxitoxina (100 nM)
		Nifedipino (25 μM)

Nº experimento	Objetivo	Antagonista/agonista (concentración final)
6	Efecto en el bloqueo de otras proteínas que intervienen en la homeostasis del calcio intracelular	KB-R7943 (10 µM)
		LaCl ₃ (75 µM)
		CPA (10 µM)
		CGP (10 µM)

2.2.6.1. Potencial tóxico y reversibilidad

Las curvas concentración-respuesta del efecto de los extractos sobre el incremento del calcio intracelular se muestran en la figura 43. Los valores de EC₅₀ son la media de tres experimentos llevados a cabo en diferentes lotes de cultivos. Se encontraron valores de EC₅₀ de 6,35 ±1,4 para PLTX y 2,21 ±0,8 para OV-21. En ninguno de los casos el efecto era reversible después de reemplazar el medio tóxico por un nuevo tampón sin toxinas a concentraciones de mayores de 7 ng/mL de PLTX u OVTX-a+b.

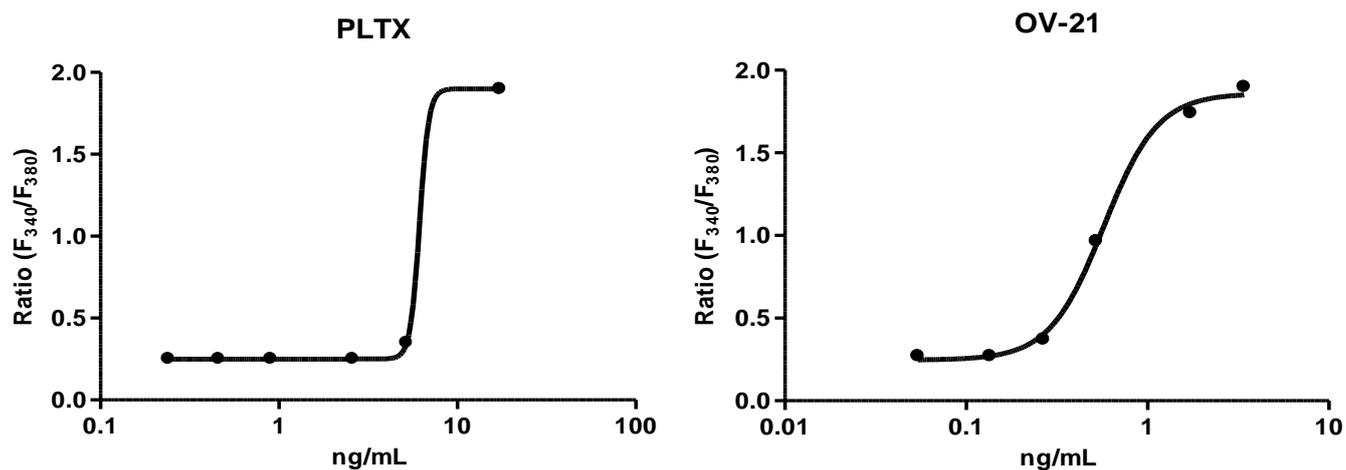


Figura 43. En la figura se representan las curvas dosis-respuesta donde se observa el incremento de fluorescencia, Ratio (F₃₄₀/F₃₈₀), o incremento de [Ca²⁺]_c en células CGC expuestas a concentraciones crecientes de PLTX y OV-21.

2.2.6.2. Dependencia de Na^+ y Ca^{2+}

Los datos obtenidos sugieren que el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es dependiente de la presencia de Na^+ en ambos casos (PLTX y OV-21) probados. Después de la adición de PLTX u OV-21 a concentraciones suficientes para provocar el influjo de Ca^{2+} (de 1,25 a 5 ng/mL) en un tampón donde el Na^+ era sustituido por Li^+ , la entrada de Ca^{2+} era completamente abolida. Este efecto persistía incluso después de la adición de 0,15 ng/mL de P-CTX-1 o 75 μM de LaCl_3 (figura 44).

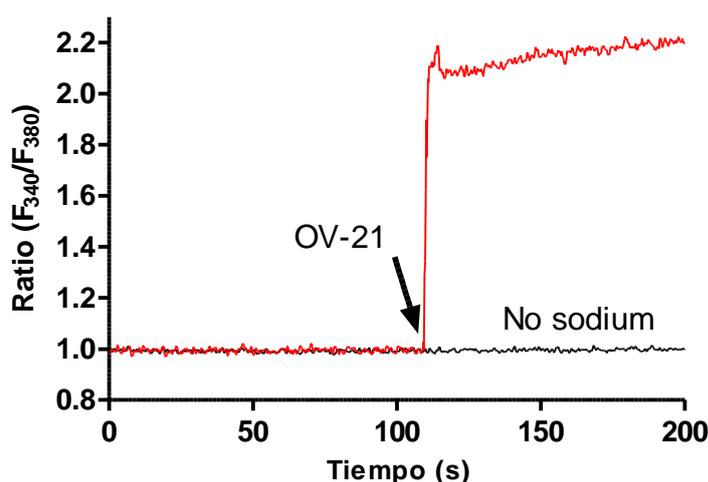


Figura 44. Incremento de Ca^{2+} intracelular después de la adición de OV-21 en un tampón completo en comparación con la ausencia total de respuesta cuando la adición se realizaba en un tampón sin Na^+ .

Cuando los experimentos eran llevados a cabo en un medio libre de Ca^{2+} la respuesta era también similar en PLTX y OV-21. En este caso la entrada de Ca^{2+} era más lenta y fluctuante. Cuando el Ca^{2+} era repuesto a las concentraciones fisiológicas normales éste se incrementaba de forma rápida y acusada. Así, la PLTX y OV-21 mostraban valores de $0,35 \pm 0,06$ y $0,43 \pm 0,06$ unidades de fluorescencia antes de la adición de calcio, mientras que después de la adición de 1,3 nM de solución de calcio el incremento intracelular de éste era de hasta $0,75 \pm 0,07$ y $0,78 \pm 0,26$ unidades de fluorescencia en pocos segundos, sin llegar a alcanzar los niveles del control (figura 45).

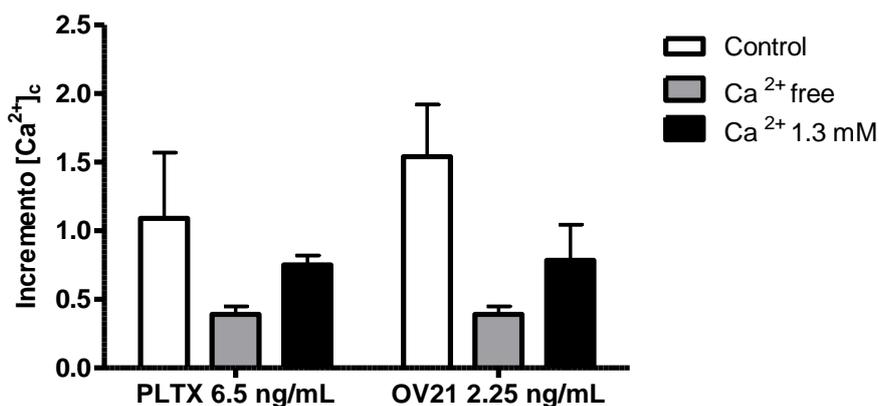


Figura 45. Incremento de $[Ca^{2+}]_i$ para la PLTX y OV-21 respecto al control, previamente y después de la adición del Ca^{2+} extracelular. Los valores representados son la media de de tres experimentos \pm SD.

2.2.6.3. Efecto del bloqueo de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa y VGSC

Para evaluar el efecto en diferentes canales se llevaron a cabo una serie de experimentos con fármacos inhibidores de canales de Na^+ . En una primera fase se intentó antagonizar la acción de PLTX y OVTXs mediante la adición directa de la ouabaína (que bloquea la bomba Na^+/K^+ -ATPasa) y STX (un inhibidor del canal de Na^+ dependiente de voltaje) a unas concentraciones finales de 1 mM y 98 nM, respectivamente. Una vez que la toxina provocaba el influjo de Ca^{2+} el efecto persistía incluso después de la adición de los antagonistas. El efecto era ligeramente contrarrestado por éstos pero desaparecía en pocos segundos. Entonces, evaluamos el efecto de las toxinas cuando las células habían sido previamente incubadas con ouabaína durante 30 minutos y posteriormente la adición de STX que se añadió tanto antes como después de la adición de las toxinas (unos 400 segundos de diferencia en ambos casos). En este caso el incremento de Ca^{2+} intracelular se reducía y con la adición de STX (en ambos casos antes y después de la toxina) casi desaparecía. Esta inhibición era dependiente de la concentración de toxinas. Por ejemplo, 1,3 ng/mL de PLTX era completamente inhibida por los fármacos mientras que con 13 ng/mL de PLTX la reducción del influjo de calcio era más o menos 2/3 del efecto sin inhibidores (figura 46). En el caso de la fracción semi-purificada solo se probó a baja concentración (1,3 ng/ml) puesto que esta concentración es suficiente para observar los efectos.

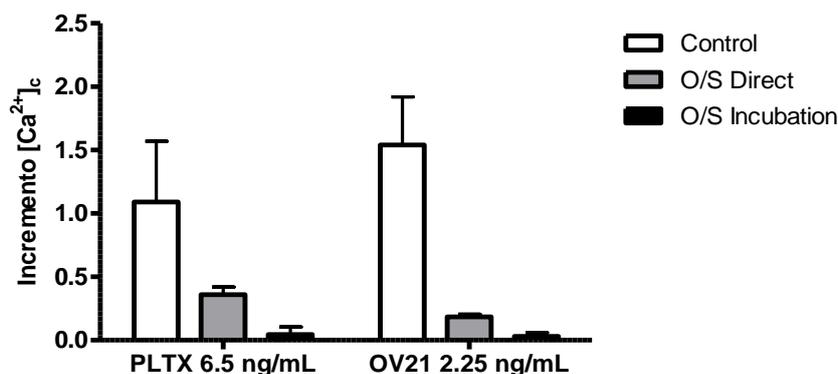


Figura 46. Efecto de la ouabaina + STX sobre el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la PLTX o OV-21 añadidos después de la adición de toxinas (O/S Direct) o antes (O/S incubación). La STX se añadía después de la ouabaina. Los antagonistas y las toxinas eran añadidos con una diferencia de 400 segundos, aproximadamente. Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes con su desviación estándar (\pm SD).

2.2.6.4. Efecto del bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC) y canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (VGCC)

Dado que la PLTX convierte la bomba Na^+/K^+ ATPasa en un poro permeable al Na^+ se probó el efecto del bloqueo de canales voltaje-dependientes de Na^+ y Ca^{2+} . Por tanto, se examinó el efecto de 98 nM de STX y nifedipino (NIF) (30 μ M) para prevenir la entrada de Ca^{2+} causada por la PLTX y OVTXs.

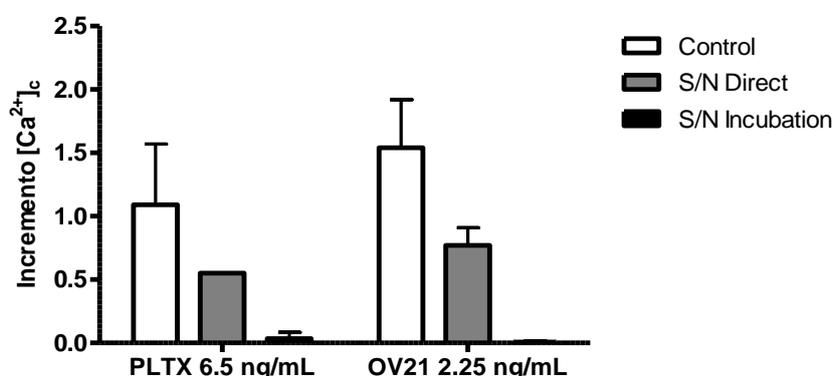


Figura 47. Efecto de la adición de los antagonistas cuantitativo sobre el $[Ca^{2+}]_i$ cuando los antagonistas STX y NIF se añadían previamente (S/N Direct) o después (S/N incubation) de la adición de las toxinas (PLTX o OV-21). Las barras representan la media de tres experimentos realizados de forma independiente y su respectiva desviación estándar.

Como en el anterior experimento, la adición de STX y NIF después de la adición de la toxina no era capaz de evitar en su totalidad el aumento de $[Ca^{2+}]_c$. Sin embargo, la adición de los antagonistas previamente a la adición de toxinas inhibía el efecto de éstas (figura 47). Los antagonistas eran añadidos cada 200 segundos, aproximadamente.

2.2.6.5. Efecto del bloqueo de diferentes transportadores de membrana implicados en el flujo de calcio

El objetivo de estos experimentos fue evaluar la función de los diferentes canales implicados en el transporte de Ca^{2+} en la entrada de éste en el citoplasma así como descartar otras posibles dianas.

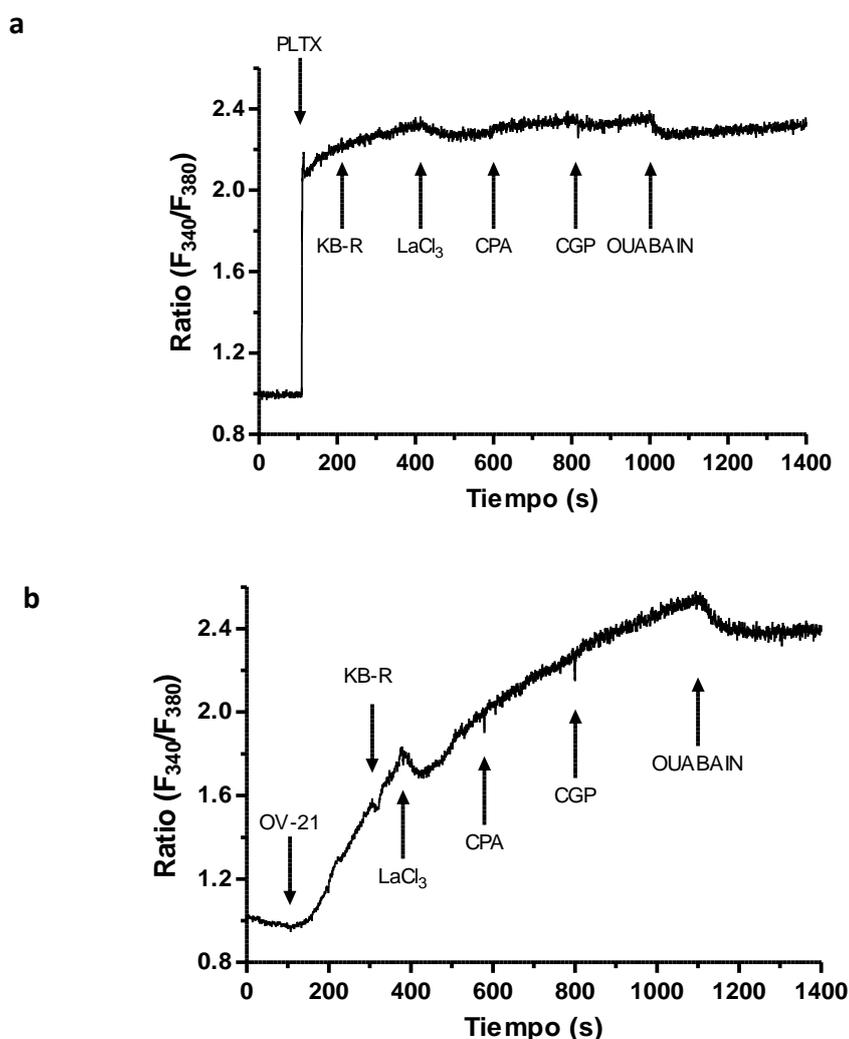


Figura 48. Efecto de diferentes moduladores de la homeostasis del calcio sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ inducido por a) PLTX o b) OV-21. Las toxinas y los antagonistas se añadieron con una diferencia de 200 segundos, aproximadamente.

Estos estudios ponen de manifiesto que las OVTXs de *O. cf. ovata* producen similares efectos que el estándar de PLTX. Las toxinas estudiadas son muy potentes, lo que producía que pequeñas concentraciones exhibieran una gran toxicidad en las células. La PLTX, además afecta a las estructuras celulares como el citoesqueleto (Valverde et al., 2008a), lo que hace que las células pierdan su capacidad de adherencia a pesar de ser viables (Valverde et al., 2008a).

Esta característica dificultó en gran medida la manipulación en los experimentos en células de tejidos humanos y este es, posiblemente, el principal motivo de la gran variabilidad en los resultados. En ninguno de los casos las toxinas produjeron un importante incremento de las proteínas implicadas en la inflamación estudiadas. La producción de caspasa 3 y de γ H2ax eran las que más se incrementaban con la concentración de toxinas. En ambos casos la línea celular que mostraba una mejor respuesta era la HepaRG. Estas células diferenciadas tienen la característica de actuar como hepatocitos y por tanto poseen capacidad de detoxificación y de producción de metabolitos secundarios (Zanelli et al., 2012). No así la producción de NF- κ B y Ki67 era más clara en A-549, aunque en el caso de Ki67 no resultaba en un incremento respecto al control.

Se sabe que la PLTX actúa en la estimulación de ácido araquidónico, producción de prostaglandinas y estimulación de factores de crecimiento (GF) y de proteínas cinasas (MAPK), como la c-jun N-terminal cinasa (JNK) y p38 (Wattenberg, 2011). Estos factores de estrés en la célula provocan la respuesta inmune (NF- κ B) y procesos de apoptosis. Si los procesos inflamatorios son intensos o prolongados se producen roturas en la cadena del DNA, lo que induce a una elevada síntesis de proteínas reparadoras de histonas como la γ H2ax. Es por ello que esta proteína se utiliza como marcador de la agresión al DNA.

La inflamación e irritación de las vías respiratorias son también síntomas relacionados con las floraciones de *Ostreopsis spp.* (posiblemente provocados por las PLTXs y análogos o otras sustancias presentes en *Ostreopsis spp.*) La producción de interleucinas y activación del NF- κ B, muy importantes en el control de los procesos inflamatorios, también se han visto afectados por estas toxinas (Crinelli et al., 2012). En nuestro estudio, las células alveolares A549 mostraron un pequeño incremento de esta proteína después de ser tratada con la PLTX y el extracto de *O. cf. ovata*.

Existen pocos estudios relacionados con el efecto inflamatorio de extractos de *Ostreopsis* y PLTX a niveles subletales. Valverde et al. (2008) estudiaron los efectos de la PLTX en células de neuroblastoma. Como en los experimentos aquí presentados, en este estudio tampoco se encontró una gran producción de caspasa 3, al menos en comparación con la que producen otras toxinas como el OA en células CaCo2 (Ferron et al., 2014).

Crinelli et al. (2012) estudiaron el efecto de la PLTX y un extracto de *Ostreopsis* sobre la producción de proteínas implicadas en la inflamación. En este caso se buscaba el mRNA que codificaba para proteínas en macrófagos. Al igual que en nuestro estudio sus resultados mostraban un comportamiento similar entre la PLTX y el extracto semi-purificado de *Ostreopsis ovata*. Es interesante resaltar que la cepa que los autores usaron contenía mayoritariamente OVTX-f, mientras que la nuestra tenía un mayor contenido de OVTX-a. A pesar de que no se ha realizado ningún estudio sobre el efecto aislado de cada OVTX, esto parece indicar que todas ellas se comportan de forma muy parecida e igualmente similar al de la PLTX.

En el estudio de Crinelli et al. (2012) encontraron mRNA de IL-8, sin embargo, sus intentos de demostrar la expresión de ésta fueron infructuosos, ya que no detectaron esta proteína ni en células ni en el medio extracelular. Esto es coincidente también con nuestros resultados, donde el test ELISA de IL-8 mostraba niveles mucho más bajos de lo esperado. En cuanto al NF- κ B, Crinelli (2012) encontró indicios de que las toxinas podrían inducir la producción de esta proteína a través de la reducción de su proteína de inhibición I κ -B α .

Otro de los aspectos a tener en cuenta son los altos tiempos de exposición a las toxinas en nuestro estudio (24 horas), en comparación con los usados en otras publicaciones (Crinelli et al., 2012; Valverde et al., 2008a) donde los tiempos son de aproximadamente 6 horas. Esto podría haber afectado negativamente a nuestros resultados, ya que las toxinas de tipo PLTXs ejercen rápidamente su toxicidad. Se ha visto que después de una hora de exposición ya se muestra síntesis de proteínas implicadas en la inflamación (Bellocci et al., 2011).

En cuanto a la potencia de las toxinas, mientras que en el mencionado estudio de Crinelli et al. , se necesitaban aproximadamente 10 veces más cantidad de extracto que de PLTX para producir el mismo efecto (tanto a nivel de potencial inflamatorio como de reducción de viabilidad en macrófagos) nuestro extracto muestra prácticamente la misma potencia en ambos casos. El extracto usado en nuestros experimentos contiene mayoritariamente OVTX-a y b, las cuales se

ha demostrado que pueden exhibir el mismo efecto y potencia que el estándar de PLTX (Soliño et al., en revisión). En estos momentos se están llevando a cabo similares experimentos a los realizados en este estudio con el extracto semi-purificado de OVTX-a+b (OV-21). Estos estudios ayudarán a elucidar el comportamiento aislado de las OVTXs, algo que no ha sido publicado hasta el momento.

En cuanto a los estudios sobre canales iónicos, estos resultados muestran importantes descubrimientos respecto a esta nueva cepa de *O. cf. ovata* mediterránea y al mecanismo de acción de las OVTXs. Durante el curso de esta investigación, el grupo de Brissard (Brissard et al., 2014) publicó un interesante artículo donde se estudiaba una cepa de *O. cf. ovata* mediterránea con un perfil tóxico prácticamente igual al de nuestro estudio. Esto podría indicar que esta nueva cepa altamente productora de OVTXs se está expandiendo a lo largo del Mediterráneo y no está restringida a una pequeña área de Cataluña, como inicialmente se creyó al comenzar este estudio. Este hecho hace más urgente la investigación del potencial tóxico real y los efectos de las OVTX- a and -b, que son los mayores componentes de estas microalgas. Para ello, llevamos a cabo una serie de estrategias de fraccionamiento hasta que encontramos la más apropiada para recuperar la mayor cantidad de toxina posible. Debido a la alta reactividad de estas toxinas solo el 15% del contenido inicial en el extracto crudo (aproximadamente) pudo ser obtenido. Además nuestro método de aislamiento no pudo evitar completamente la OVTX-b en el extracto por lo que el método de aislamiento debería ser optimizado.

No se encontraron toxinas en las resinas, lo cual sugiere que o bien la microalga no expulsa toxinas al medio o las resinas utilizadas no son apropiadas para este tipo de toxinas. Otros estudios encontraron alrededor de un 25% de toxinas en el medio de cultivo extrayendo el agua directamente recogida de los cultivos cosechados (Pezzolesi et al., 2012). Brissard et al. (2014) encontró mucha menos cantidad de toxina en el medio, alrededor de un 5% (Brissard et al., 2014).

El perfil toxínico publicado en el estudio de Brissard et al (2014) es similar al de nuestra cepa. Previamente Amzil et al (2012) había encontrado prevalencia de OVTX-a en cepas recogidas durante *blooms* ocurridos entre 2007 y 2008 en la misma localidad (Amzil et al., 2012; Brissard et al., 2014). También el grupo de Ciminiello encontró predominancia de OVTX-a en el perfil

tóxico de una cepa de *O. cf. Ovata* aislada en el mar Tirreno en las costas de Italia en 2005 (Ciminiello et al., 2008). Curiosamente, una cepa aislada en la zona del Adriático (Ancona, Italia) mostró mayor porcentaje de OVTX-f (46,6%) que de OVTX-a (21,7%) y -b (19,5%) (Pistocchi et al., 2012). Esta cepa presentaba también baja cantidad de toxinas comparado con las cepas de nuestro estudio y el del grupo de Brissard. Esto significaría, por tanto, que las cepas presentes en el Mediterráneo oriental y occidental son diferentes en cuanto a perfil y potencial tóxico. Esto es un dato importante a tener en cuenta cuando se realizan regulaciones y planes de monitoreo y control.

Otro de los elementos a tener en cuenta, como se ha dicho anteriormente, es la toxicidad real de los derivados de PLTX. Las últimas publicaciones de Ciminiello y del Favero muestran que estos derivados pueden ser tan tóxicos como la PLTX. Los estudios realizados con el estereoisómero 42-hydroxi-palytoxin (42-OH-PLTX) mostraban una actividad similar a la de la PLTX (Ciminiello et al., 2009; Del Favero et al., 2014). Este estereoisómero difiere de la PLTX por la presencia de un grupo OH en posición 42, compartiendo esta característica con otros congéneres como la OVTX-a (Ciminiello et al., 2009, 2008). Sin embargo, otros estudios recientes revelaron que el diastereoisómero de esas toxinas (42-S-hydroxy-50S-palytoxin y 42-S-hydroxy-50R-palytoxin) presentaba diferencias en la potencia tóxica en queratinocitos. Además, los estudios de SPR (surface plasmon resonance) y de ELISA indirecto revelaban diferencias en la afinidad por el anticuerpo entre cada estereoisómero probado y la PLTX (Ciminiello et al., 2014a). Estos estudios sugieren que pequeñas diferencias en la estructura molecular pueden llevar a una diferencia en el potencial tóxico o incluso en el mecanismo de acción.

Los datos encontrados respecto al efecto sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular en CGC están de acuerdo con los estudios del grupo de Vale (Vale et al., 2006). En este estudio encontraron que la concentración de PLTX que producía la respuesta máxima era 10 nM, lo que en el presente trabajo resultaba en 24,75 ng/mL o 11,72 nM.

Los datos obtenidos respecto a la reversibilidad de la toxina también están de acuerdo con otros estudios realizados con PLTX y derivados de ésta en CGC y otros tipos celulares (Del Favero et al., 2014; Frelin y Van Renterghem, 1995; Vale et al., 2006).

Estos resultados también muestran que la incubación previa de los antagonistas es necesaria para eliminar el incremento de $[Ca^{2+}]_c$. La incubación con ouabaina ha sido ampliamente usada por otros autores. Por otro lado, el efecto protector de la ouabaina no se ejerce siempre del mismo modo en las mismas células ya que este glicósido presenta diferentes afinidades según la isoforma de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (Hauck et al., 2009). En nuestro caso el efecto de la ouabaína era más efectivo cuando el influjo de Na^+ era reducido por la presencia de STX. La misma situación se observaba cuando se bloqueaban las principales entradas de sodio y calcio (VGNC y VGCC).

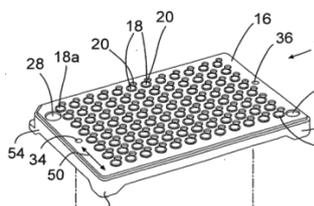
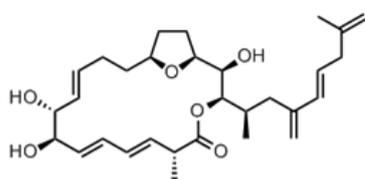
Otros autores han sugerido que la reversión del intercambiador de Ca^{2+} y Na^+ NCX es el responsable del gran incremento de $[Ca^{2+}]_c$ y posterior muerte celular (Satoh et al., 2003; Shimahara y Molgó, 1990). Los experimentos con inhibidores de canales voltaje-dependientes de Ca^{2+} y Na^+ pretendían eliminar este efecto reduciendo la entrada de Na^+ y, por ende, la reversión del transportador NCX.

Por último, en el experimento con diferentes transportadores de Ca^{2+} , estos tuvieron efecto nulo o muy reducido, aunque no puede descartarse algún efecto si se hubieran incubado antes de la adición de las toxinas.

Conclusión

Este estudio aporta datos adicionales sobre los mecanismos de acción de PLTX y OVTXs. A pesar de que nuestros resultados son todavía preliminares, esta es la primera vez que un extracto de *Ostreopsis cf. ovata* que sintetiza prácticamente todas las OVTXs conocidas hasta el momento (incluida la recientemente publicada OVTX-g) y en cantidades importantes es utilizado para elucidar el efecto de éste sobre proteínas implicadas en inflamación y daño celular. Además, este trabajo muestra por primera vez que un extracto con tan solo OVTX-a y b es tan tóxico como el estándar comercial de PLTX y que sus efectos inmediatos en la despolarización celular son también similares. Debido a esto y a las grandes cantidades de toxinas que produce esta cepa tiene un gran interés comercial como fuente de estándares y fármacos.

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS



DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

Modelos celulares como técnicas para la detección y evaluación de la toxicidad

La reciente disminución del uso de bioensayos con ratones (MBA) como métodos de rutina para detección de toxinas alimentarias en Europa, debido a la legislación vigente, ha sido un importante promotor de la investigación de nuevos métodos de detección. Aunque la tendencia parece ser la consolidación de técnicas cromatográficas como métodos oficiales de control, existen hoy en día múltiples ensayos basados en sustratos biológicos (CBA) o bioquímicos (PPIA) que ofrecen gran fiabilidad con menor coste y mayor simplicidad (Reverté et al., 2014). En la mayoría de los casos cada uno de estos ensayos presenta mejores características para detectar un grupo concreto de toxinas. No obstante, a pesar de todos los esfuerzos realizados por diferentes grupos de investigación, es casi imposible el desarrollo de una sola técnica ideal para el análisis de todas las toxinas. Lo más apropiado sería, en realidad, una combinación de técnicas basadas en biosensores (celulares, inmunoensayos, etc.) como cribado y métodos analíticos para la identificación de la toxina y confirmación de su existencia en la muestra (Soliño et al., 2014).

En este sentido los CBA presentan tres grandes ventajas que los hacen idóneos para ser usados como primera criba en muestras sospechosas de contener este tipo de sustancias nocivas:

1. Los ensayos celulares, al estar basados en sistemas vivos, pueden detectar toxinas no conocidas, de forma inespecífica (Soliño et al., 2015a).
2. Los ensayos celulares pueden ser usados también de forma específica en base a la respuesta celular en presencia de la toxina estudiada con agonistas o antagonistas. Con la ayuda de estándares de la toxina, los ensayos celulares nos permiten incluso obtener un resultado cuantitativo (Caillaud et al., 2012, 2011; Cañete y Diogène, 2010, 2008).
3. Los ensayos celulares están basados en un sistema vivo y dinámico en el que las células intentan contrarrestar el efecto de las toxinas. Cuando se realizan exposiciones a niveles subletales podemos describir el modo de acción de estas sustancias. En este sentido, los modelos celulares ayudan a caracterizar la toxicidad además de detectarla (Ferron et al., 2014; Le Hégarat et al., 2006; Vale et al., 2006; Vale-González et al., 2007).

Por todo ello, los modelos celulares aportan informaciones muy interesantes que complementan a la obtenida a través de los métodos analíticos. El mantenimiento de un cultivo celular inmortalizado no supondría una gran inversión para los laboratorios de referencia y ofrecería información de los efectos sobre un sistema vivo, sin necesidad de la instalación de un animalario. El uso de células provenientes de tejidos humanos podría incluso mejorar la descripción de los efectos reales de la toxina en humanos (Fessard y Le Hégarat, 2010; Takakura et al., 2013). De este modo, un ensayo celular, aun no siendo específico, tiene capacidad para indicar la presencia de alguna sustancia que afecta a las células. Este dato habría que tomarlo con cautela puesto que ciertas sustancias de la matriz de la muestra pueden producir interferencias en el cultivo celular, dando lugar a un falso positivo. En este caso, este problema podría solventarse mediante los procesos de fraccionamiento cromatográfico (Caillaud et al., 2009; Cañete et al., 2010; Fraga et al., 2011). Como se ha demostrado en este y otros trabajos, el fraccionamiento permitiría la separación de estos elementos por su tiempo de retención y propiedades hidrofílicas y permitiría la discriminación entre ellos (Abraham et al., 2012; Soliño et al., en revisión).

El desarrollo de CBAs específicos para cada toxina mediante la adición de activadores y/o inhibidores, nos proporciona, además, información del mecanismo de acción de la toxina, lo que nos permite un acercamiento a su identificación, para posterior confirmación mediante técnicas analíticas. Un ejemplo sería utilizar un mismo cultivo celular de Neuro-2a para realizar ensayos en presencia/ausencia de O/V para detectar actividad de tipo CTX o STX, o en ausencia/presencia de KB-R7943 o SK&F 96365 para detectar actividad de tipo PLTXs o MTX, respectivamente (Caillaud et al., 2011; Cañete and Diogène, 2008; Ledreux et al., 2009; Manger et al., 2014; Soliño et al., en revisión).

En algunos casos, el CBA por sí solo o en combinación con otras técnicas bioquímicas puede aportar suficiente capacidad de detección y bajos límites de cuantificación como para aportar datos fiables de la toxicidad de la muestra. Una prueba de esto es el CBA-Neuro-2a para detección de CTXs, como ha sido demostrado en este y otros estudios (Robertson et al., 2014; Soliño et al., 2015b). A pesar de que la PbTx presenta el mismo efecto que la CTX, raramente coexisten en la misma muestra por lo que es difícil que provoque interferencias en los resultados. En caso de duda la confirmación podría ser realizada por LC/MS. De este modo sólo se necesitaría la confirmación en aquellas muestras que hubieran presentado actividad de tipo

CTX y se ahorraría tiempo y recursos en la emisión de los resultados (Abraham et al., 2012; A Caillaud et al., 2010; R., 2008; Robertson et al., 2014; Soliño et al., 2014).

La extracción de las CTXs en muestras de pescado es un proceso lento debido a la interferencia de los lípidos del músculo. Sin embargo, el CBA no requiere de una depuración tan exhaustiva como los métodos cromatográficos, lo que también ahorra tiempo de análisis. Dadas las ventajas que supone el uso del CBA en el análisis de un gran número de muestras, el uso de este método ha contribuido a conocer y a caracterizar mejor los riesgos en el consumo de pescado y ha aportado nuevos datos sobre los niveles de toxina que pueden exhibir intoxicación en humanos, como se ha podido corroborar en esta tesis (*Resultados y discusión: 1.1 y 1.2*).

No obstante, antes de la instauración de un CBA (o cualquier otra técnica) como método oficial de referencia o cribado es necesaria la realización de ejercicios comparativos intra e inter laboratorios. Se debe asumir que las células, como sistema vivo, presentan cierta variabilidad, incluso dentro del mismo cultivo. Esto puede originar una variabilidad significativa entre los resultados de diferentes laboratorios y el retraso en la armonización de la técnica (Ledreux et al., 2012; Sérandour et al., 2012). Por todo ello, sería necesaria la inminente puesta en marcha de este tipo de evaluaciones, en vista de la aparente expansión de *Gambierdiscus* en Europa y en sus territorios fuera del continente (Aligizaki y Nikolaidis, 2008; Gouveia et al., 2009; Hossen et al., 2013; Laza-Martínez et al., 2013; Nuñez et al., 2012; Otero et al., 2010; Pérez-Arellano et al., 2005).

Otro de los retos en la identificación de toxinas marinas es la gran cantidad de familias de toxinas que existen con sus numerosos análogos. Normalmente estos análogos se cuantifican dentro de un total (por ejemplo las dinofisistoxinas y sus hidrolizados), pero en la mayoría de los casos no se tienen datos de la toxicidad real que estos análogos presentan ni de su mecanismo de acción (Ciminiello et al., 2011; Otero et al., 2011; Pistocchi et al., 2012; Place et al., 2012). Otro de los retos que entraña la aparición de estas toxinas y sus derivados es la presencia simultánea de varias de ellas en un mismo organismo. Son escasos los estudios dirigidos a investigar el posible efecto potenciador o aditivo en humanos producido por el consumo de éstas (Pérez-Gómez et al., 2010; Sosa et al., 2013). Tampoco se dispone de datos suficientes para evaluar el riesgo que supondría una repetida exposición a toxinas por debajo

de los límites establecidos por la ley y sus posibles efectos crónicos en humanos (Gorbi et al., 2013; Ramsdell y Gulland, 2014; Ryan et al., 2015; Zaias et al., 2011; Zepeda et al., 2014). Sería necesario invertir muchos más esfuerzos en investigar los mecanismos de acción y potencial tóxicos de estos derivados para tener una mejor noción del riesgo que suponen para el consumidor. No obstante, en muchos casos estos estudios son inviables. Esto se debe a la falta de material de referencia, dadas a las dificultades que entraña su síntesis o su obtención a partir del organismo productor o del vector en cantidades suficientes y en la pureza adecuada.

Teniendo en cuenta todos estos factores, una de las más importantes contribuciones de esta tesis es la demostración de la aptitud de los cultivos celulares en la resolución de dichos problemas. Los cultivos *in vitro* utilizados en esta tesis han permitido caracterizar mejor el riesgo alimentario (*Resultados y discusión: 1.1,1.2,1.3,2.2*) y la relativa toxicidad de las toxinas y sus derivados (*Resultados y discusión: 1.3 y 2.2*), evaluar la posible toxicidad crónica (*Resultados y discusión: 2.2*), el estudio del mecanismo de acción de derivados de toxinas poco conocidas hasta el momento (*Resultados y discusión: 2.1, 2.2*), la posibilidad de obtener estándares a partir de cepas de microalgas altamente productivas (*Resultados y discusión: 2.2*) y la identificación de bioactivos con posibles usos farmacéuticos (*Resultados y discusión: 2.1*).

Riesgo asociado a la ciguatera en Europa

Es difícil calcular el porcentaje de población que se ve afectada por la ciguatera, ya que muchos casos no se registran o se confunden con otro tipo de intoxicación. Algunos estudios han realizado una estimación de que entre 10.000 y 50.000 personas se ven afectadas cada año por este tipo de intoxicación, aunque otros autores sitúan esta cifra en 500.000, teniendo en cuenta la cantidad de casos no detectados o no registrados (Dickey y Plakas, 2010; Pearn, 2001). El organismo productor aparece actualmente en los tres grandes océanos: Pacífico (Australia, islas de la Polinesia, Micronesia, Japón, Vietnam, Hawaii, Cook, Tokelau, Fiji, Marshall, entre otras), Atlántico (Golfo de México, Islas del Caribe, Florida, Brasil, Islas Canarias y Madeira) e Índico (Australia, Sri Lanka, Islas Maldivas, Madagascar y La Reunión) y se ha notificado ya su aparición en aguas del Mediterráneo oriental (Grecia) y occidental (Islas Baleares) (Aligizaki y Nikolaidis, 2008; Laza-Martínez et al., 2013; Reverté et al., 2014).

No se saben los motivos exactos de esta aparente expansión de *Gambierdiscus*. Sin embargo sí es evidente la imperativa necesidad de ajustar las actuales regulaciones europeas en materia de

toxinas marinas a esta nueva situación. La Regulación EC 854/2004 13 en su Anexo III (European Union Commission, 2004) indica que ningún producto marino que contenga toxinas, incluidas CTXs y sus derivados, puede ser comercializado. Sin embargo no establece límites de referencia en los niveles de toxinas ni métodos de detección específicos. Se han propuesto los límites de 0,01 ppb para P-CTX y 0,1 ppb para C-CTX en base a los trabajos de diferentes centros de investigación (Dickey y Plakas, 2010; EFSA, 2010). La limitación en la disponibilidad de muestras implicadas en intoxicaciones es un gran hándicap a la hora de establecer límites legales. Es sorprendente que a pesar de la amplia incidencia mundial de este síndrome no se disponga de datos claros referente a las ARfD y LOAEL exhibidos por estas toxinas.

Durante la realización de esta tesis se calcularon los ARfD y LOAEL gracias a los datos de intoxicaciones por CFP recogidas por los organismos oficiales en materia de salud pública de Guadeloupe (*Resultados y discusión: 1.1*). Esta es una importante contribución que no solo muestra valiosa información relativa al tipo de sintomatología de la C-CTX en relación a la cantidad de toxina consumida, sino que aporta datos necesarios para mejorar las legislaciones existentes en materia de salud pública.

Los síntomas exhibidos por la C-CTX en dicho trabajo eran tanto de tipo diarreico como neurotóxico. Sin embargo la severidad de los síntomas no estaba relacionada directamente con la cantidad de toxina consumida, confirmando la variabilidad individual observada en otros estudios (Bagnis et al., 1980; Dickey y Plakas, 2010; Lehane y Lewis, 2000). Estos resultados tienen una gran importancia médica que permitirá un mejor diagnóstico y tratamiento y por tanto mayor calidad de vida de las personas afectadas.

Otra de las particularidades de la CFP es que el vector de las CTXs son peces y no moluscos sésiles como es el caso de otros síndromes que afectan a productos marinos (DSP, PSP, ASP). Esto significa que el control es más complejo y más costoso e implica conocer los hábitos, no solo alimentarios, sino también territoriales de cada especie de pez, para conocer las zonas donde éstos podrían presentar mayor riesgo de acumular CTXs.

En esta tesis se ha puesto de manifiesto cómo los hábitos alimentarios *Pterois sp.* están relacionados con la acumulación de CTXs. Los resultados de este trabajo sugieren que la fidelidad territorial del pez león puede estar relacionada con la relativa localización de las

muestras tóxicas. Estos datos serán de gran importancia para el diseño de sistemas de muestreo y control de pesquerías en las Islas Guadeloupe.

Se ha observado, en diversos estudios, que el nivel que ocupa el pez en las redes tróficas y el tamaño de éste no siempre está ligada a una mayor capacidad de acumulación de toxinas (Gaboriau et al., 2014; Yogi et al., 2011). Esto significa que todas las investigaciones relativas a la biotransformación a través de redes tróficas deberían ser estudiadas de forma individual para cada especie de pez. Teniendo en cuenta que se ha calculado que más de 400 especies podrían ser vectores de CTX (Lehane y Lewis, 2000) queda un largo camino por recorrer. Otro de los campos por explorar es la biotransformación de las toxinas a través del metabolismo de los peces o incluso después del cocinado.

El estudio realizado en peces león en esta tesis (*Resultados y discusión: 1.2*) ha contribuido a identificar inequívocamente una nueva especie vector de C-CTX, siendo la C-CTX-1 la principal toxina identificada. El estudio confirma además la inexistencia de relación de tamaño y cantidad de toxina para esta especie y la relación entre acumulación de toxinas y el comportamiento territorial y trófico. Debido al incipiente aumento del consumo de pez león en las regiones del Caribe este estudio junto con el de Robertson et al. (2014) serán cruciales para evitar riesgos en el consumo de esta nueva especie.

Los trabajos realizados en Guadeloupe (*Resultados y discusión: 1.1 y 1.2*) no solo han aportado importantes hallazgos para la ciencia tales como relación individual de síntomas con la cantidad de C-CTX consumida y las relaciones entre comportamiento y ecología de los peces león con la capacidad de acumular CTX. También aporta importantes datos prácticos que ayudarán a mejorar el control sobre toxinas. Esto se traduce directamente en una mayor protección de la salud pública y menor riesgo para el consumidor.

Riesgo asociado a intoxicación por ovatoxinas en Europa

La PLTX y sus derivados tales como las OVTXs son otras de las toxinas consideradas emergentes en Europa debido a su presencia en aguas del Mediterráneo (Reverté et al., 2014). Las floraciones masivas del dinoflagelado *O. cf. ovata*, principal productor de OVTXs, están implicadas en intoxicaciones por inhalación de aerosoles en las costas mediterráneas italianas, francesas, españolas y croatas (Ciminiello et al., 2014b, 2008; Pfannkuchen et al., 2012; Tichadou et al., 2010). El cuadro clínico que presenta este tipo de intoxicación se caracteriza

por síntomas febriles, irritación del tracto respiratorio, irritación de los ojos, jaquecas y fatiga que pueden prolongarse durante varios días y en muchos casos se requiere la hospitalización de las personas afectadas. Estas floraciones masivas se presentan de forma estacional durante el verano, con lo que en muchos casos ha implicado a un gran número de afectados (hasta 200 personas) (Tubaro et al., 2011).

A pesar de que los derivados de PLTXs presentan menor toxicidad oral, se ha observado grandes acumulaciones de OVTXs en organismos marinos y son claros los efectos negativos sobre éstos (Carella et al., 2015; Faimali et al., 2012).

Sin embargo, no existen datos de la toxicidad o efectos *in vivo* de las OVTXs de forma aislada y hasta el momento de la realización de esta tesis tampoco existían estudios *in vitro* realizados con estos derivados. El trabajo desarrollado en esta tesis (*Resultados y discusión: 2.2*) muestra por primera vez la relativa toxicidad de las principales OVTXs presentes en el Mediterráneo, lo que supone una gran contribución para el análisis de los riesgos asociados a *O. cf. ovata* en Europa. Este estudio demuestra que estos extractos pueden llegar a presentar una toxicidad y mecanismo de acción equivalentes a los de la PLTX. Son conocidos los riesgos que entraña el consumo PLTX, que pueden producir graves intoxicaciones y, en casos extremos, la muerte (Aligizaki et al., 2008; Yasumoto et al., 1986). Por lo tanto, estudios como el presentado en este trabajo son necesarios de forma urgente para evitar los riesgos que pudiera entrañar la exposición o consumo de OVTXs. Para ello será necesaria la obtención de estándares a través del cultivo y purificación de éstas. Por una parte estos estándares permitirían realizar estudios más profundos sobre los efectos de las OVTXs en humanos; por otra parte porque las OVTXs son las toxinas que mayoritariamente aparecen en el Mediterráneo, por lo que sus niveles en alimentos deberían ser controlados y limitados legalmente.

Los métodos de detección de estas toxinas serían otro importante elemento a regular. En el contexto de esta tesis se realizaron varias pruebas para conseguir un CBA específico para PLTX y derivados. Los resultados obtenidos, a pesar de ser preliminares, mostraron una buena respuesta al aplicar el KB-R7943 como inhibidor específico de los efectos de la PLTX.

Los estudios con PLTX y OVTXs fruto de esta tesis contribuyen a dar el primer paso para la identificación del riesgo de OVTXs en Europa y pone de manifiesto la necesidad de regulaciones específicas para estas toxinas.

Toxinas marinas como productoras de compuestos biológicos activos

La obtención de bioactivos producidos por dinoflagelados para su uso en la industria farmacéutica es un campo en pleno auge y muy prometedor. Algunas empresas farmacéuticas ya han puesto la mirada en el mar como fuente de compuestos con utilidad en biomedicina (ej. Pharmamar-Zeltia).

En esta tesis se han estudiado dos de las especies de dinoflagelados piscicidas (*A. carterae* y *K. veneficum*) que son importantes productores de compuestos activos (Deeds y Place, 2006; Kobayashi y Kubota, 2007). Los estudios realizados respecto al efecto de estas toxinas sobre la homeostasis del Ca^{2+} , a pesar de mostrar resultados preliminares, han permitido descartar algunas de las hipótesis que se postulaban sobre estas microalgas. Algunos estudios han sugerido que dichas microalgas podrían sintetizar compuestos de tipo neurotóxico (Da Costa et al., 2005; Rhodes et al., 2010). Esta hipótesis está basada en síntomas observados *in vivo* en ratón después de la administración de un extracto por vía intraperitoneal. Los resultados de esta tesis (*Resultados y discusión 2.1*), indican que ninguna de las fracciones de los extractos purificados a partir de las cepas de *A. carterae* y *K. veneficum* cultivados en el laboratorio presenta un efecto de tipo específico sobre canales iónicos que pudiera afectar a la homeostasis del Ca^{2+} . Por tanto, es muy poco probable que los efectos observados en ratón sean debido a una neurotoxicidad directa, causada por la unión de estos compuestos a canales iónicos.

Como ya se ha mencionado, otra de las interesantes aplicaciones de los dinoflagelados es su utilidad para desarrollar estándares de sus toxinas.

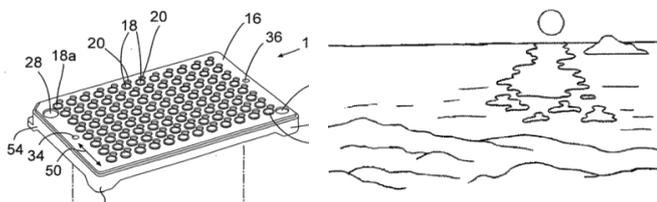
La escasez de estos estándares y las dificultades de su obtención son un problema actual ahora mismo en el mundo. Por ejemplo hoy en día existen pocos proveedores de PLTX comercial, que se obtiene mayoritariamente de *Palythoa toxica* o *P. turberculata*.

Para ilustrar la dificultad de la obtención de estos estándares, tan necesarios para elucidar estructuras moleculares y realizar estudios de toxicidad, podemos citar los trabajos del grupo de Scheurer. Estos investigadores necesitaron 750 g *P. toxica* para llegar a aislar la molécula de PLTX (Moore y Scheuer, 1971). Años más tarde, fueron necesarios 62 kg de víscera de morena para obtener 1,3 mg de P-CTX depurada (Tachibana, 1980).

Mejorar los protocolos de extracción y recuperación de toxinas o identificar cepas que produzcan en gran cantidad de estos derivados, serían estrategias adecuadas para solventar este problema. La cepa de *O. cf. ovata* utilizada en esta tesis tiene potencial interesante como productora de estándares debido a su rápido crecimiento y facilidad de cultivo, las altas densidades que alcanza y la gran cantidad de toxina que produce, que incluye OVTX-a, b, c, d, e, g y iPLTX (Carnicer, 2014; García-Altare et al., 2014). En este trabajo, gracias a la combinación de diferentes técnicas y estudios se pudo identificar esta cepa con capacidad de producir una importante cantidad de OVTXs y se consiguió un extracto suficientemente purificado para la realización de pruebas de mecanismos de acción tanto a nivel agudo como crónico. Este estudio es un ejemplo de la importancia de la multidisciplinaridad y combinación de esfuerzos para mejorar el conocimiento en esta área, desarrollar protocolos y legislaciones más fiables y proporcionar mayor protección al consumidor. Además, estos estudios permiten identificar, no solo las microalgas con gran potencial para la producción de estándares de referencia sino de otros bioactivos que podrían tener importancia en la industria farmacéutica o en investigación médica. En este campo convergen diferentes ramas como: el estudio de la ecología y cultivo de diferentes cepas de microalgas, la descripción química dos compuestos bioactivos, su purificación, síntesis y actividad a nivel celular, sus efectos agudos y crónicos, etc.

Por lo tanto, el futuro de la investigación en microalgas tóxicas / productoras de bioactivos implica la cooperación de muchos grupos con diferentes capacidades técnicas. A pesar de que en este campo se han realizado importanísimos avances en las últimas décadas, sigue siendo un campo de estudio relativamente nuevo y en el que queda todavía mucho camino por recorrer. En lo que se refiere a los ensayos celulares este camino debería dirigirse hacia la realización de ejercicios de validación de los CBAs como métodos oficiales de cribado y a su aplicación en el estudio de mecanismos de acción de los compuestos bioactivos producidos por estas microalgas.

CONCLUSIONES GENERALES



CONCLUSIONES GENERALES

De los diferentes estudios realizados en este trabajo pueden obtenerse las siguientes conclusiones de cada uno de ellos:

- Estudios sobre el uso de CBAs para la detección de C-CTX en muestras de pescado:

1. El ensayo celular CBA-Neuro-2a desarrollado para detectar toxinas con actividad sobre canales VGSCs permite detectar CTXs con límites de detección muy por debajo de los niveles de seguridad recomendados de la EFSA. Por lo tanto, los CBAs son una herramienta de cribado útil para la detección de estas toxinas marinas, previa a la confirmación por técnicas analíticas.
2. El CBA-Neuro-2a permite el análisis de un gran número de muestras, aporta información cualitativa y cuantitativa fiable respecto a las toxinas presentes en las muestras y permite valorar los riesgos que supone el consumo de pescado y la incidencia de la ciguatera en un área determinada.
3. El pez invasor *Pterois sp.* es un vector de C-CTX y la mayor presencia de estos tóxicos en el estudio desarrollado en el archipiélago de Guadeloupe se encuentra confinada a la isla de St. Barthelemy.
4. No existe relación directa entre tamaño de pez y cantidad de toxina acumulada en el caso de la especie de *Pterois sp.* estudiada en el presente trabajo.
5. El análisis de la información recogida de varias intoxicaciones por ciguatera en Guadeloupe, junto con los resultados de los análisis por MBA y CBA sugieren que los niveles máximos de C-CTXs recomendados por la EFSA de 0,1 ppb son adecuados para la protección del consumidor. Sin embargo, la variabilidad individual es un factor importante a tener en cuenta en este tipo de intoxicaciones y son necesarios más estudios epidemiológicos para establecer niveles de seguridad de C-CTXs en alimentos fiables.

- Estudios de la estimación de los TEFs de tres toxinas diarreicas en tres modelos celulares:

6. Los ensayos celulares (CBAs) aportan información complementaria a los métodos analíticos como son la toxicidad *in vitro* de los derivados del OA y DTX -1 y -2.

7. La DTX-1 presenta mayor toxicidad que el OA y la DTX-2 en cuanto a la viabilidad celular en tres modelos celulares: Neuro-2a, MCF-7 y NG108-15.
8. En ensayos *in vitro* de tipo inespecíficos los modelos celulares Neuro-2a y NG108-15 presentan resultados de viabilidad equivalentes por lo que ambos modelos podrían ser usados con resultados comparables. No obstante, el modelo MCF-7 presenta menor sensibilidad a las toxinas y un comportamiento, en cuanto a los resultados viabilidad celular, “todo o nada”.

- Estudios relacionados con la caracterización de la toxicidad y efectos sobre homeostasis de Ca^{2+} de las toxinas en CGC:

9. Dado que los cultivos primarios presentan mayor número de dianas que las células inmortalizadas, resultan muy adecuadas para el estudio de los efectos de toxinas en canales iónicos o receptores de glutamato.
10. Mediante el estudio de la concentración de Ca^{2+} intracelular en cultivos primarios de CGC es posible conocer el efecto de los productos extraídos de microalgas sobre canales iónicos y sobre la concentración de otros iones y a nivel celular. Gracias a la aplicación de estas técnicas se ha podido descartar la implicación sobre canales iónicos de compuestos aislados de *Amphidinium carterae* y *Karlodinium veneficum*.
11. Mediante la aplicación de cultivos primarios de CGC y medida de Ca^{2+} intracelular se ha podido verificar, por primera vez, la toxicidad y modo de acción de las OVTXs procedentes de *Ostreopsis cf. ovata*.
12. La fracción de la cepa de *O. cf. ovata* aislada de las costas catalanas que contenía únicamente OVTX-a y b producía efectos muy similares, sobre la homeostasis del Ca^{2+} en CGC de rata, que el estándar de PLTX evaluado.

- Estudios sobre potencial tóxico a nivel subletal del extracto crudo de *O. cf. ovata*:

13. El uso de diferentes modelos celulares procedentes de tejidos humanos, como HepaRG y A549 aportan valiosa información respecto los efectos intracelulares de la PLTX y de sus análogos, lo que permite una aproximación al conocimiento de su toxicidad a nivel subletal, como son su potencial para producir inflamación y la formación de tumores.

14. El extracto obtenido a partir de la cepa *O. cf. Ovata* produce efectos similares en cuanto a citotoxicidad, inflamación y potencial tumoral a los del estándar de PLTX evaluado en los cultivos de células de tejido humano HepaRG y A549.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, A., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Plakas, S.M., Dickey, R.W., 2012. Caribbean ciguatera profile in raw and cooked fish implicated in ciguatera. *Food Chem.* 131, 192-198.
- Adolf, J.E., Krupatkina, D., Bachvaroff, T., Place, A.R., 2007. Karlotoxin mediates grazing by *Oxyrrhis marina* on strains of *Karlodinium veneticum*. *Harmful Algae* 6, 400-412.
- Albadry, M., Waters, A., Tomioka, T., Hamann, M.T., 2014. Karlotoxin 5 synthetic studies: Concise synthesis of a C91-17 polyol chain fragment. *Planta Med.* 80, PK1.
- Albins, M.A., Hixon, M.A., 2013. Worst case scenario: potential long-term effects of invasive predatory lionfish (*Pterois volitans*) on Atlantic and Caribbean coral-reef communities. *Environ. Biol. Fishes* 96, 1151-1157.
- Alfonso, A., Fernández-Araujo, A., Alfonso, C., Caramés, B., Tobio, A., Louzao, M.C., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2012. Palytoxin detection and quantification using the fluorescence polarization technique. *Anal. Biochem.* 424, 64-70.
- Alfonso, A., Pazos, M.-J., Fernández-Araujo, A., Tobio, A., Alfonso, C., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2013. Surface plasmon resonance biosensor method for palytoxin detection based on Na⁺, K⁺-ATPase affinity. *Toxins (Basel)*. 6, 96-107.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Milandri, A., Diogène, J., 2011. Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon* 57, 390-399.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G., Panou, A., 2008. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 51, 418-427.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2008. Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Sinophysis* in the Mediterranean Sea. *J. Biol. Res.* 9, 75-82.
- Amzil, Z., Sibat, M., Chomerat, N., Grosseil, H., Marco-Miralles, F., Lemee, R., Nezan, E., Sechet, V., 2012. Ovatoxin-a and Palytoxin Accumulation in Seafood in Relation to *Ostreopsis cf. ovata* Blooms on the French Mediterranean Coast. *Mar. Drugs* 10, 477-496.
- Aonuma, S., Nakayasu, M., Ushijima, T., Sugimura, T., Nagao, M., 1991. Mutagenicity of okadaic acid on cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 253, 242.
- Arrêté Préfectoral n° 2002/1249 du 19/08/2002, 2002.
- Artigas, P., Gadsby, D.C., 2003a. Na⁺/K⁺-pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 501-505.
- Artigas, P., Gadsby, D.C., 2003b. Ion occlusion/deocclusion partial reactions in individual palytoxin-modified Na⁺/K⁺ pumps. *Ann. New York Acad. Sci.* 986, 116-126.
- Artigas, P., Gadsby, D.C., 2004. Large diameter of palytoxin-induced Na⁺/K⁺ pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na⁺/K⁺ pump ligands. *J. Gen. Physiol.* 123, 357-376.

- Aune, T., Larsen, S., Aasen, J.A.B., Rehmann, N., Satake, M., Hess, P., 2007. Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice. *Toxicon* 49, 1-7.
- Bachvaroff, T.R., Adolf, J.E., Place, A.R., 2009. Strain variation in *Karlodinium veneficum* (dinophyceae): toxin profiles, pigments, and growth characteristics. *J. Phycol.* 45, 137-153.
- Baden, D.G., 1989. Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins. *FASEB J.* 3, 1807-1817.
- Bagnis, R., 1995. Natural versus anthropogenic disturbances to coral reefs: comparison in epidemiological patterns of ciguatera. *Oceanogr. Lit. Rev.* 42.
- Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Hurtel, J.M., Yasumoto, T., Inoue, A., 1980. Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitively involved as a causal agent. *Toxicon* 18, 199-208.
- Bagnis, R., Kuberski, T., Laugier, S., 1979. Clinical observations on 3,009 cases of ciguatera (fish poisoning) in the South Pacific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 1067-1073.
- Banner, A.H., 1976. Ciguatera: a disease from coral reef fish. *Biol. Geol. coral reefs* 3, 177-213.
- Barbour, A.B., Montgomery, M.L., Adamson, A.A., Díaz-Ferguson, E., Silliman, B.R., 2009. Mangrove use by the invasive lionfish *Pterois volitans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 401, 291-294.
- Bellocci, M., Ronzitti, G., Milandri, A., Melchiorre, N., Grillo, C., Poletti, R., Yasumoto, T., Rossini, G.P., 2008. A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line. *Anal. Biochem.* 374, 48-55.
- Bellocci, M., Sala, G.L., Callegari, F., Rossini, G.P., 2010. Azaspiracid-1 inhibits endocytosis of plasma membrane proteins in epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 117, 109-121.
- Bellocci, M., Sala, G.L., Prandi, S., 2011. The cytolytic and cytotoxic activities of palytoxin. *Toxicon* 57, 449-59.
- Bensoussan, C., Rival, N., Hanquet, G., Colobert, F., Reymond, S., Cossy, J., 2014. Isolation, structural determination and synthetic approaches toward amphidinol 3. *Nat. Prod. Rep.* 31, 468-488.
- Bhakuni, D.S., Rawat, D.S., 2005. *Bioactive marine natural products*. Springer.
- Bialojan, C., Takai, A., 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* 256, 283-290.
- Bidard, J.N., Vijverberg, H.P., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A.M., Bagnis, R., Lazdunski, M., 1984. Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin. *J. Biol. Chem.* 259, 8353-8357.
- Bienfang P, DeFelice S, Laws E, Wallsgrove N, C.P., 2012. Ciguatoxicity in the main Hawaiian Islands: spatial and temporal variability in the introduced reef carnivore *Cephalopholis Argus*. *J Res Env. Sci Toxicol* (3), 47-57.
- Biggs, C.R., Olden, J.D., 2011. Multi-scale habitat occupancy of invasive lionfish (*Pterois volitans*) in coral reef environments of Roatan, Honduras. *Aquat. Invasions* 6, 447-453.

- Bignami, G.S., 1993. A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon* 31, 817-820.
- Biré, R., Trotereau, S., Lemée, R., Delpont, C., Chabot, B., Aumond, Y., Krysz, S., 2013. Occurrence of palytoxins in marine organisms from different trophic levels of the French Mediterranean coast harvested in 2009. *Harmful Algae* 28, 10-22.
- Blanco, G., Mercer, R.W., 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 275, F633-F650.
- Brissard, C., Herrenknecht, C., Séchet, V., Hervé, F., Pisapia, F., Harcouet, J., Lémée, R., Chomérat, N., Hess, P., Amzil, Z., 2014. Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification. *Mar. Drugs* 12, 2851-2876.
- Cagide, E., Louzao, M.C., Espiña, B., Vieytes, M.R., Jaen, D., Maman, L., Yasumoto, T., Botana, L.M., 2009. Production of functionally active palytoxin-like compounds by mediterranean *Ostreopsis cf. siamensis*. *Cell. Physiol. Biochem.* 23, 431-440.
- Caillaud, A., Cañete, E., de la Iglesia, P., Giménez, G., Diogène, J., 2009. Cell-based assay coupled with chromatographic fractioning: A strategy for marine toxins detection in natural samples. *Toxicol. Vitr.* 23, 1591-1596.
- Caillaud, A., de la Iglesia, P., Barber, E., Eixarch, H., Mohammad-Noor, N., Yasumoto, T., Diogene, J., 2011. Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture. *Harmful Algae* 10, 433-446.
- Caillaud, A., de la Iglesia, P., Campàs, M., Elandaloussi, L., Fernández, M., Mohammad-Noor, N., Andree, K., Diogène, J., 2010. Evidence of okadaic acid production in a cultured strain of the marine dinoflagellate *Prorocentrum rathymum* from Malaysia. *Toxicon* 55, 633-637.
- Caillaud, A., De La Iglesia, P., Darius, H.T., Pauillac, S., Aligizaki, K., Fraga, S., Chinain, M., Diogène, J., 2010. Update on methodologies available for ciguatoxin determination: Perspectives to confront the onset of ciguatera fish poisoning in Europe. *Mar. Drugs* 8, 1838-1907.
- Caillaud, A., Eixarch, H., de la Iglesia, P., Rodriguez, M., Dominguez, L., Andree, K.B., Diogene, J., 2012. Towards the standardisation of the neuroblastoma (neuro-2a) cell-based assay for ciguatoxin-like toxicity detection in fish: application to fish caught in the Canary Islands. *Food Addit. Contam. Part A* 29, 1000-1010.
- Camacho, F.G., Rodríguez, J.G., Mirón, A.S., García, M.C., Belarbi, E.H., Chisti, Y., Grima, E.M., 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnol. Adv.* 25, 176-194.
- Cañete, E., Campàs, M., de la Iglesia, P., Diogène, J., 2010. NG108-15 cell-based and protein phosphatase inhibition assays as alternative semiquantitative tools for the screening of lipophilic toxins in mussels. Okadaic acid detection. *Toxicol. Vitr.* 24, 611-619.
- Cañete, E., Diogène, J., 2008. Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma × glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon* 52, 541-550.

- Cañete, E., Diogène, J., 2010. Improvements in the use of neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon* 55, 381-389.
- Carballeira, N.M., Emiliano, A., Sostre, A., Restituyo, J.A., González, I.M., Colon, G.M., Tosteson, C.G., Tosteson, T.R., 1998. Fatty acid composition of bacteria associated with the toxic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* and with Caribbean *Palythoa* species. *Lipids* 33, 627-632.
- Carella, F., Sardo, A., Mangoni, O., Di Cioccio, D., Urciuolo, G., De Vico, G., Zingone, A., 2015. Quantitative histopathology of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) exposed to the harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *J. Invertebr. Pathol.* 127, 130-140.
- Carnicer, O., 2014. Spatio-temporal distribution, physiological characterization and toxicity of the marine dinoflagellate *Ostreopsis* (Schmidt) from a temperate area, the Ebre Delta. Phylogenetic variability in comparison with a tropical area, Reunion Island. Barcelona University.
- Casabianca, S., Casabianca, A., Riobó, P., Franco, J.M., Vila, M., Penna, A., 2013. Quantification of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis spp.* by qPCR Assay in marine aerosol. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3788-3795.
- Catalunya, G. de, 1997. Decreto 214/1997 de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para la experimentación y otras finalidades científicas.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Florio, C., Lorenzon, P., De Bortoli, M., Tubaro, A., Poli, M., Bignami, G., 2009. Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: A new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1851-1859.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Vanucci, S., 2012. Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 1869-1875.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Forino, M., Tartaglione, L., Pelin, M., Sosa, S., Tubaro, A., Chaloin, O., Poli, M., Bignami, G., 2014a. Stereoisomers of 42-hydroxy palytoxin from Hawaiian *Palythoa toxica* and *P. tuberculosa*: Stereostructure elucidation, detection, and biological activities. *J. Nat. Prod.* 77, 351-357.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., 2011. A 4-decade-long (and still ongoing) hunt for palytoxins chemical architecture. *Toxicon* 57, 362-367.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. Putative Palytoxin and Its New Analogue, Ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* Collected Along the Ligurian Coasts During the 2006 Toxic Outbreak. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 111-120.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. Dello, Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Yasumoto, T., Battocchi, C., Giacobbe, M., Amorim, A., 2013. Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis cf. siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Harmful Algae* 23, 19-27.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2010. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of

- four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 2735-2744.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Benedettini, G., Onorari, M., Serena, F., Battocchi, C., Casabianca, S., Penna, A., 2014b. First finding of *Ostreopsis cf. ovata* toxins in marine aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3532-3540.
- Crain, S.M., Perez, R.A., Walter, J.A., McCarron, P., Quilliam, M.A., Melanson, J.E., 2012a. NRC CRM-DTX1, Certified Calibration Solution for Dinophysistoxin-1. CRMP Tech. Rep. DTX1-20071024.
- Crain, S.M., Perez, R.A., Walter, J.A., McCarron, P., Quilliam, M.A., Melanson, J.E., 2012b. NRC CRM-DTX2, Certified Calibration Solution for Dinophysistoxin-2. CRMP Tech. Rep. DTX1-20071121.
- Crinelli, R., Carloni, E., Giacomini, E., Penna, A., Dominici, S., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Magnani, M., 2012. Palytoxin and an *Ostreopsis* toxin extract increase the levels of mRNAs encoding inflammation-related proteins in human macrophages via p38 MAPK and NF- κ B. *PLoS One* 7.
- Cruz-Rivera, E., Villareal, T.A., 2006. Macroalgal palatability and the flux of ciguatera toxins through marine food webs. *Harmful Algae* 5, 497-525.
- Da Costa, R.M., Franco, J., Cacho, E., Fernández, F., 2005. Toxin content and toxic effects of the dinoflagellate *Gyrodinium corsicum* (Paulmier) on the ingestion and survival rates of the copepods *Acartia grani* and *Euterpina acutifrons*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 322, 177-183.
- Daneshian, M., Botana, L.M., Bottein, M.-Y.D., Buckland, G., Campàs, M., Dennison, N., Dickey, R.W., Diogène, J., Fessard, V., Hartung, T., Humpage, A., Leist, M., Molgó, J., Quilliam, M.A., Rovida, C., Suarez-Isla, B.A., Tubaro, A., Wagner, K., Zoller, O., Dietrich, D., 2013. T4 Report: A roadmap for hazard monitoring and risk assessment of marine biotoxins on the basis of chemical and biological test systems. *ALTEX* 30, 487-545.
- De Sylva, D.P., 1994. Distribution and ecology of ciguatera fish poisoning in Florida, with emphasis on the Florida Keys. *Bull. Mar. Sci.* 54, 944-954.
- Dechraoui, M., Bottein, Y., Tiedeken, J.A., Persad, R., Wang, Z., Granade, H., Dickey, R.W., Ramsdell, J.S., 2005. Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: application to great barracuda from Florida Keys. *Toxicon* 46, 261-270.
- Deeds, J.R., Hoesch, R.E., Place, A.R., Kao, J.P.Y., 2015. The cytotoxic mechanism of karlotoxin 2 (KmTx 2) from *Karlodinium veneficum* (Dinophyceae). *Aquat. Toxicol.* 159, 148-155.
- Deeds, J.R., Place, A.R., 2006. Sterol-specific membrane interactions with the toxins from *Karlodinium micrum* (Dinophyceae) — a strategy for self-protection? *African J. Mar. Sci.* 28, 421-425.
- Deeds, J.R., Reimschuessel, R., Place, A.R., 2006. Histopathological effects in fish exposed to the toxins from *Karlodinium micrum*. *J. Aquat. Anim. Health* 18, 136-148.
- Deeds, J.R., Terlizzi, D.E., Adolf, J.E., Stoecker, D.K., Place, A.R., 2002. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (= *Gyrodinium galatheanum*)(Dinophyceae)—a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. *Harmful Algae* 1, 169-189.

- Del Favero, G., Sosa, S., Poli, M., Tubaro, A., Sbaizero, O., Lorenzon, P., 2014. In vivo and in vitro effects of 42-hydroxy-palytoxin on mouse skeletal muscle: structural and functional impairment. *Toxicol. Lett.* 225, 285-93.
- Delgado, M., Alcaraz, M., 1999. Interactions between red tide microalgae and herbivorous zooplankton: the noxious effects of *Gyrodinium corsicum* (Dinophyceae) on *Acartia grani* (Copepoda: Calanoida). *J. Plankton Res.* 21, 2361-2371.
- Dickey, R.W., Plakas, S.M., 2010. Ciguatera: a public health perspective. *Toxicon* 56, 123-136.
- Dominguez, H.J., Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Franco, J.M., Fernández, J.J., 2010. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications. *Toxicon* 56, 191-217.
- Doucet, E., Ross, N.N., Quilliam, M.A., 2007. Enzymatic hydrolysis of esterified diarrhetic shellfish poisoning toxins and pectenotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 335-342.
- Echigoya, R., Rhodes, L., Oshima, Y., Satake, M., 2005. The structures of five new antifungal and hemolytic amphidinol analogs from *Amphidinium carterae* collected in New Zealand. *Harmful Algae* 4, 383-389.
- EFSA, 2008. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission on marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analogues. *EFSA J.* 589, 1-62.
- EFSA, 2009a. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission of marine biotoxins in shellfish - saxitoxin group. *EFSA J.* 1019, 1-76.
- EFSA, 2009b. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission on marine biotoxins in shellfish - pectenotoxin group. *EFSA J.* 1109, 1-47.
- EFSA, 2009c. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group. *EFSA J.* 1393, 1-38.
- EFSA, 2010. Panel on Contaminants in the Food Chain; Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. *EFSA J.* 1627, 1-38.
- Espiña, B., Cagide, E., Louzao, M., Fernandez, M., Vieytes, M., Katikou, P., Villar, A., Jaen, D., Maman, L., Botana, L., 2009. Specific and dynamic detection of palytoxins by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells. *Biosci. Rep.* 29, 13-23.
- European Commission, 2003. Directive 91/493/EC Council Directive of 22 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of fishery products.
- European Commission, 2005. Commission Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation.
- European Commission, 2011. Commission Regulation of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs.

- European Union Commission, 2004. EC 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption.
- Faimali, M., Giussani, V., Piazza, V., Garaventa, F., Corrà, C., Asnaghi, V., Privitera, D., Gallus, L., Cattaneo-Vietti, R., Mangialajo, L., Chiantore, M., 2012. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 76, 97-107. doi:10.1016/j.marenvres.2011.09.010
- Fernández, D.A., Louzao, M.C., Fraga, M., Vilariño, N., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2013. Experimental basis for the high oral toxicity of dinophysistoxin 1: A comparative study of DSP. *Toxins (Basel)*. 6, 211-228.
- Ferron, P.-J., Hogeveen, K., Fessard, V., Le Hégarat, L., 2014. Comparative analysis of the cytotoxic effects of okadaic acid-group toxins on human intestinal cell lines. *Mar. Drugs* 12, 4616-4634.
- Fessard, V., Grosse, Y., Pfohl-Leskowicz, A., Puiseux-Dao, S., 1996. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 361, 133-141.
- Fessard, V., Le Hégarat, L., 2010. A strategy to study genotoxicity: Application to aquatic toxins, limits and solutions. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1715-1722.
- Fleming, L.E., Kirkpatrick, B., Backer, L.C., Walsh, C.J., Nierenberg, K., Clark, J., Reich, A., Hollenbeck, J., Benson, J., Cheng, Y.S., 2011. Review of Florida red tide and human health effects. *Harmful Algae* 10, 224-233.
- Fraga, S., Riobó, P., Diogène, J., Paz, B., Franco, J.M., 2004. Toxic and potentially toxic benthic dinoflagellates observed in Macaronesia (NE Atlantic Archipelago), en: Abstract book of the 11th International Conference on Harmful Algae. p. 115.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., Zapata, M., 2011. *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae* 11, 10-22.
- Frelin, C., Van Renterghem, C., 1995. Palytoxin. Recent electrophysiological and pharmacological evidence for several mechanisms of action. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 26, 33-37.
- Frelin, C., Vigne, P., Breittmayer, J.-P., 1990. Mechanism of the cardiotoxic action of palytoxin. *Mol. Pharmacol.* 38, 904-909.
- Friedman, M.A., Fleming, L.E., Fernandez, M., Bienfang, P., Schrank, K., Dickey, R., Bottein, M.-Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., 2008. Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Mar. Drugs* 6, 456-479.
- Fujiki, H., Suganuma, M., 1993. Tumor Promotion by Inhibitors of ProteinZ Phosphatases 1 and 2A: The Okadaic Acid Class of Compounds, en: Research, G.F.V.W. and G.K.B.T.-A. in C. (Ed.), . Academic Press, pp. 143-194.

- Fujiki, H., Suganuma, M., Nakayasu, M., Hakii, H., Horiuchi, T., Takayama, S., Sugimura, T., 1986. Palytoxin is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 7, 707-710.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Yoshizawa, S., Nishiwaki, S., Winyar, B., Sugimura, T., 1991. Mechanisms of action of okadaic acid class tumor promoters on mouse skin. *Environ. Health Perspect.* 93, 211.
- Fujiki, H., Sugimura, T., 1987. New classes of tumor promoters: teleocidin, aplysiatoxin, and palytoxin. *Adv. Cancer Res.* 49, 223-264.
- Gaboriau, M., Ponton, D., Darius, H.T., Chinain, M., 2014. Ciguatera fish toxicity in French Polynesia: Size does not always matter. *Toxicon* 84, 41-50.
- García-Altare, M., Tartaglione, Luciana Dell'Aversano, C., Carnicer, O., de la Iglesia, P., Forino, M., Diogène, J., Ciminiello, P., 2014. The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from *Ostreopsis cf. ovata* (NW Mediterranean Sea): structural insights by LC-high resolution MSn. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 1191-1204.
- Garibo, D., De La Iglesia, P., Diogène, J., Campàs, M., 2013. Inhibition equivalency factors for dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 in protein phosphatase assays: Applicability to the analysis of shellfish samples and comparison with LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2572-2579.
- Gerssen, A., McElhinney, M.A., Mulder, P.P.J., Bire, R., Hess, P., de Boer, J., 2009. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1213-1226.
- Gestal Otero, J.J., 2009. Aspectos epidemiológicos de la intoxicación por toxina diarreica de los moluscos (DSP), en: *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Gorbi, S., Avio, G.C., Benedetti, M., Totti, C., Accoroni, S., Pichierri, S., Bacchiocchi, S., Orletti, R., Graziosi, T., Regoli, F., 2013. Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 941-950.
- Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., 2009. Primeiro Registo da Ocorrência de Episódios do Tipo Ciguatérico no Arquipélago da Madeira. X Reun. Ibérica, Fitoplânct. Tóxico e Biotoxinas, Lisboa 12-15 Maio, 2009 poster.
- Grzebyk, D., Berland, B., Thomassin, B.A., Bosi, C., Arnoux, A., 1994. Ecology of ciguateric dinoflagellates in the coral reef complex of Mayotte Island (SW Indian Ocean). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 178, 51-66.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, en: *Culture of marine invertebrate animals*. Springer, pp. 29-60.
- Guisande, C., Frangópulos, M., Maneiro, I., Vergara, A.R., Riveiro, I., 2002. Ecological advantages of toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* under phosphorus limitation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 225, 169-176.
- Gusovsky, F., Daly, J.W., 1990. Maitotoxin: a unique pharmacological tool for research on calcium-dependent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 39, 1633-1639.

- Habermann, E., 1989. Palytoxin acts through Na^+ , K^+ -ATPase. *Toxicon* 27, 1171-1187.
- Habermann, E., Hudel, M., Dauzenroth, M.-E., 1989. Palytoxin promotes potassium outflow from erythrocytes, HeLa and bovine adrenomedullary cells through its interaction with Na^+ , K^+ -ATPase. *Toxicon* 27, 419-430.
- Halstead, B.W., Courville, D.A., 1965. *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World: Invertebrates*. US Government Printing Office.
- Hamilton, B., Hurbungs, M., Vernoux, J.-P., Jones, A., Lewis, R.J., 2002. Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon* 40, 685-693.
- Hauck, C., Potter, T., Bartz, M., Wittwer, T., Wahlers, T., Mehlhorn, U., Scheiner-Bobis, G., McDonough, A.A., Bloch, W., Schwinger, R.H., 2009. Isoform specificity of cardiac glycosides binding to human Na^+ , K^+ -ATPase alpha1beta1, alpha2beta1 and alpha3beta1. *Eur. J. Pharmacol.* 622, 7-14.
- Haystead, T.A.J., Sim, A.T.R., Carling, D., Honnor, R.C., Tsukitani, Y., Cohen, P., Hardie, D.G., 1989. Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337, 78-81.
- Hilgemann, D.W., 2003. From a pump to a pore: How palytoxin opens the gates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 386-388.
- Hossen, V., Velge, P., Turquet, J., Chinain, M., Laurent, D., Krys, S., 2013. La ciguatera: un état des lieux en France et dans l'Union européenne. *Bull. épidémiologique, santé Anim. Aliment.* 56, 3-9.
- Houdai, T., Matsumori, N., Murata, M., 2008. Structure of membrane-bound amphidinol 3 in isotropic small bicelles. *Org. Lett.* 10, 4191-4194.
- Houdai, T., Matsuoka, S., Matsumori, N., Murata, M., 2004. Membrane-permeabilizing activities of amphidinol 3, polyene-polyhydroxy antifungal from a marine dinoflagellate. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* 1667, 91-100.
- Huynh-Delerme, C., Puisseux-Dao, S., 1997. Algal toxins, inhibitors of serine/threonine phosphatases. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 192, 387-408.
- Ikehara, T., Imamura, S., Yoshino, A., Yasumoto, T., 2010. PP2A inhibition assay using recombinant enzyme for rapid detection of okadaic acid and its analogs in shellfish. *Toxins (Basel)*. 2, 195-204.
- Ito, E., Terao, K., 1994. Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds. *Nat. Toxins* 2, 371-377.
- Ito, E., Yasumoto, T., 2009. Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes. *Toxicon* 54, 244-251.
- Ito, E., Yasumoto, T., Takai, A., Imanishi, S., Harada, K., 2002. Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method. *Toxicon* 40, 159-165.
- Jud, Z.R., Layman, C.A., 2012. Site fidelity and movement patterns of invasive lionfish, *Pterois spp.*, in a Florida estuary. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 414, 69-74.

- Kerbrat, A.-S., Darius, H.T., Pauillac, S., Chinain, M., Laurent, D., 2010. Detection of ciguatoxin-like and paralyzing toxins in *Trichodesmium spp.* from New Caledonia lagoon. Mar. Pollut. Bull. 61, 360-366.
- Kibler, S.R., Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Holland, W.C., Tester, P.A., 2010. Effect of light intensity on five species of *Gambierdiscus*, en: GEOHAB Open Science Meeting on Benthic HABs. Hawaii, USA. pp. 21-23.
- Kita, M., Ohno, O., Han, C., Uemura, D., 2010. Bioactive secondary metabolites from symbiotic marine dinoflagellates: Symbiodinolide and durinskiols. Chem. Rec. 10, 57-69.
- Kobayashi, J., 2008. Amphidinolides and its related macrolides from marine dinoflagellates. J. Antibiot. (Tokyo). 61, 271-284.
- Kobayashi, J., Ishibashi, M., Murayama, T., Takamatsu, M., Iwamura, M., Ohizumi, Y., Sasaki, T., 1990. Amphidinolide E, a novel antileukemic 19-membered macrolide from the cultured symbiotic dinoflagellate *Amphidinium sp.* J. Org. Chem. 55, 3421-3423.
- Kobayashi, J., Kubota, T., 2007. Bioactive Macrolides and Polyketides from Marine Dinoflagellates of the Genus *Amphidinium*. J. Nat. Prod. 70, 451-460.
- Kogure, K., Tamplin, M.L., Simidu, U., Colwell, R.R., 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. Toxicon 26, 191-197.
- Konishi, M., Yang, X., Li, B., Fairchild, C.R., Shimizu, Y., 2004. Highly Cytotoxic Metabolites from the Culture Supernatant of the Temperate Dinoflagellate *Protoceratium cf. r eticulatum*. J. Nat. Prod. 67, 1309-1313.
- Kuroki, D.W., Bignami, G.S., Wattenberg, E. V, 1996. Activation of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase by the non-TPA-type tumor promoter palytoxin. Cancer Res. 56, 637-644.
- Kuroki, D.W., Minden, A., Sánchez, I., Wattenberg, E. V, 1997. Regulation of a c-Jun amino-terminal kinase/stress-activated protein kinase cascade by a sodium-dependent signal transduction pathway. J. Biol. Chem. 272, 23905-23911.
- Laza-Martínez, A., David, H., Ispizua, I., Orive, E., 2013. Caracterización de una cepa de *Gambierdiscus* de las Islas Baleares. XII Reun. ibérica sobre microalgas nocivas y biotoxinas conference Palma de Mallorca, Octubre 2013.
- Le Hégarat, L., Jacquin, A.-G., Bazin, E., Fessard, V., 2006. Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid, in human Caco-2 cells and in mice gut cells. Environ. Toxicol. 21, 55-64.
- Ledreux, A., Krys, S., Bernard, C., 2009. Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). Toxicon 53, 300-308.
- Ledreux, A., Sérandour, A.-L., Morin, B., Derick, S., Lancelleur, R., Hamlaoui, S., Furger, C., Biré, R., Krys, S., Fessard, V., 2012. Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part II: Application to shellfish extracts spiked with lipophilic marine toxins. Anal. Bioanal. Chem. 403, 1995-2007.
- Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. Int. J. Food Microbiol. 61, 91-125.

- LePage, K.T., Baden, D.G., Murray, T.F., 2003. Brevetoxin derivatives act as partial agonists at neurotoxin site 5 on the voltage-gated Na⁺ channel. *Brain Res.* 959, 120-127.
- LePage, K.T., Dickey, R.W., Gerwick, W.H., Jester, E.L., Murray, T.F., 2005. On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Crit. Rev. Neurobiol.* 17.
- Lewis, R., 2003. Detection of toxins associated with ciguatera fish poisoning, en: Hallegraeff GM, Anderson DM, C.A. (Ed.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, Paris, pp. 257-267.
- Lewis, R.J., Endean, R., 1986. Direct and indirect effects of ciguatoxin on guinea-pig atria and papillary muscles. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 334, 313-322.
- Lewis, R.J., Holmes, M.J., 1993. Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 106, 615-628.
- Li, S., Wattenberg, E. V, 1998. Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases by Palytoxin and Ouabain, Two Ligands for the Na⁺, K⁺-ATPase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 377-384.
- Li, S., Wattenberg, E. V, 1999. Cell-type-specific activation of p38 protein kinase cascades by the novel tumor promoter palytoxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160, 109-119.
- Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Faust, M.A., Kibler, S.R., Chinain, M., Holmes, M.J., Holland, W.C., Tester, P.A., 2009. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *J. Inf.* 48.
- Lombet, A., Bidard, J.-N., Lazdunski, M., 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel. *FEBS Lett.* 219, 355-359.
- Lopes, V.M., Lopes, A.R., Costa, P., Rosa, R., 2013. Cephalopods as vectors of harmful algal bloom toxins in marine food webs. *Mar. Drugs* 11, 3381-3409.
- Lorente, A., Lamariano-Merketegi, J., Albericio, F., Álvarez, M., 2013. Tetrahydrofuran-containing macrolides: a fascinating gift from the deep sea. *Chem. Rev.* 113, 4567-4610.
- Manger, R., Woodle, D., Berger, A., Dickey, R.W., Jester, E., Yasumoto, T., Lewis, R., Hawryluk, T., Hungerford, J., 2014. Flow cytometric-membrane potential detection of sodium channel active marine toxins: application to ciguatoxins in fish muscle and feasibility of automating saxitoxin detection. *J. AOAC Int.* 97, 299-306.
- Manger, R.L., Lee, S.Y., Leja, L.S., Hungerford, J.M., Hokama, Y., Dickey, R.W., Granade, H.R., Lewis, R., Yasumoto, T., Wekell, M.M., 1995. In vitro analysis of ciguatoxins, brevetoxins, and satitoxins, en: *Proceedings of the International Symposium on Ciguatera and Marine Natural Products*. Hokama Y, Sheuer PJ, Yasumoto T, editors. Honolulu: Asian Pacific Research Foundation. pp. 123-136.
- Manger, R.L., Leja, L.S., Lee, S.Y., Hungerford, J.M., Wekell, M.M., 2001. Cell bioassay of neurotoxins.
- Matsunaga, K., Nakatani, K., Ishibashi, M., Kobayashi, J., Ohizumi, Y., 1999. Amphidinolide B, a powerful activator of actomyosin ATPase enhances skeletal muscle contraction. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* 1427, 24-32.

- Mayer, A., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G.S., Hamann, M.T., 2009. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous system. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* 1790, 283-308.
- McMillan, J.P., Hoffman, P.A., Granade, H.R., 1986. *Gambierdiscus toxicus* from the Caribbean: a source of toxins involved in ciguatera. *Mar. Fish. Rev* 48, 48-52.
- Miura, D., Kobayashi, M., Kakiuchi, S., Kasahara, Y., Kondo, S., 2006. Enhancement of transformed foci and induction of prostaglandins in Balb/c 3T3 cells by palytoxin: in vitro model reproduces carcinogenic responses in animal models regarding the inhibitory effect of indomethacin and reversal of indomethacin's effect by ex. *Toxicol. Sci.* 89, 154-163.
- Moon, D.-O., Kim, M.-O., Nam, T.-J., Kim, S.-K., Choi, Y.H., Kim, G.-Y., 2010. Pectenotoxin-2 induces G2/M phase cell cycle arrest in human breast cancer cells via ATM and Chk1/2-mediated phosphorylation of cdc25C. *Oncol. Rep.* 24, 271-276.
- Mooney, B.D., De Salas, M., Hallegraeff, G.M., Place, A.R., 2009. Survey for karlotoxin production in 15 species of gymnodinioid dinoflagellates (Kareniaceae, Dinophyta) 1. *J. Phycol.* 45, 164-175.
- Moore, R.E., Scheuer, P.J., 1971. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* (80-). 172, 495-498.
- Morris Jr, J.A., Akins, J.L., 2009. Feeding ecology of invasive lionfish (*Pterois volitans*) in the Bahamian archipelago. *Environ. Biol. Fishes* 86, 389-398.
- Morris Jr, J.A., Whitfield, P.E., 2009. Biology, ecology, control and management of the invasive Indo-Pacific lionfish: an updated integrated assessment.
- Morsy, N., Houdai, T., Konoki, K., Matsumori, N., Oishi, T., Murata, M., 2008. Effects of lipid constituents on membrane-permeabilizing activity of amphidinols. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 3084-3090.
- Morsy, N., Houdai, T., Matsuoka, S., Matsumori, N., Adachi, S., Oishi, T., Murata, M., Iwashita, T., Fujita, T., 2006. Structures of new amphidinols with truncated polyhydroxyl chain and their membrane-permeabilizing activities. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 6548-6554.
- Morton, S.L., Moeller, P.D.R., Young, K.A., Lanoue, B., 1998. Okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum* Faust isolated from the Belizean coral reef ecosystem. *Toxicon* 36, 201-206.
- Mountfort, D.O., Suzuki, T., Truman, P., 2001. Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. *Toxicon* 39, 383-390.
- Munday, R., 2013. Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic acid in animals? *Toxins (Basel)*. 5, 267-285.
- Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y., Fukui, M., Yasumoto, T., 1990. Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4380-4386.

- Murata, M., Legrand, A.M., Ishibashi, Y., Yasumoto, T., 1989. Structures of ciguatoxin and its congener. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8929-8931.
- Naar, J.P., Flewelling, L.J., Lenzi, A., Abbott, J.P., Granholm, A., Jacocks, H.M., Gannon, D., Henry, M., Pierce, R., Baden, D.G., 2007. Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish. *Toxicon* 50, 707-723.
- Nuñez, D., Matute, P., Garcia, A., Garcia, P., Abadia, N., 2012. Outbreak of ciguatera food poisoning by consumption of amberjack (*Seriola spp.*) in the Canary Islands, May 2012. *Euro Surveill* 17, 2.
- Ogino, H., Kumagai, M., Yasumoto, T., 1997. Toxicologic evaluation of Yessotoxin. *Nat. Toxins* 5, 255-259.
- Onodera, K., Nakamura, H., Oba, Y., Ohizumi, Y., Ojika, M., 2005. Zooxanthellamide Cs: vasoconstrictive polyhydroxylated macrolides with the largest lactone ring size from a marine dinoflagellate of *Symbiodinium sp.* *J. Am. Chem. Soc.* 127, 10406-10411.
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H., Yasumoto, T., 1999. Identification of putative palytoxin as the cause of clupectoxism. *Toxicon* 37, 55-65.
- Otero, A., Chapela, M.-J., Atanassova, M., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2011. Cyclic imines: chemistry and mechanism of action: a review. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1817-1829.
- Otero, P., Pérez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodríguez, P., Gouveia, N.N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hirama, M., 2010. First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe). *Anal. Chem.* 82, 6032-6039.
- Park, M.G., Kim, S., Kim, H.S., Myung, G., Kang, Y.G., Yih, W., 2006. First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Aquat. Microb. Ecol.* 45, 101-106.
- Parsons, M.L., Aligizaki, K., Bottein, M.-Y.D., Fraga, S., Morton, S.L., Penna, A., Rhodes, L., 2012. *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. *Harmful Algae* 14, 107-129.
- Parsons, M.L., Preskitt, L.B., 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai 'i. *Harmful Algae* 6, 658-669.
- Patergnani, S., Suski, J.M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Rimessi, A., Duszynski, J., Wieckowski, M.R., Pinton, P., 2011. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun. Signal.* 9.
- Paul, G.K., Matsumori, N., Konoki, K., Murata, M., Tachibana, K., 1997. Chemical structures of amphidinols 5 and 6 isolated from marine dinoflagellate *Amphidinium klebsii* and their cholesterol-dependent membrane disruption. *J. Mar. Biotechnol.* 5, 124-128.
- Paul, G.K., Matsumori, N., Murata, M., Tachibana, K., 1995. Isolation and chemical structure of amphidinol 2, a potent hemolytic compound from marine dinoflagellate *Amphidinium klebsii*. *Tetrahedron Lett.* 36, 6279-6282.

- Pawlowicz, R., Darius, H.T., Cruchet, P., Rossi, F., Caillaud, A., Laurent, D., Chinain, M., 2013. Evaluation of seafood toxicity in the Australes archipelago (French Polynesia) using the neuroblastoma cell-based assay. *Food Addit. Contam. Part A* 30, 567-586.
- Pearn, J., 2001. Neurology of ciguatera. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70, 4-8.
- Peng, J., Place, A., Yoshida, W., Anklin, C., Hamann, M.T., 2008. Structure of Karlotoxin-2, A Toxin Causing Massive Fish Kills Worldwide. *Planta Med.* 74, P-65.
- Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Giacobbe, M.G., Riobó, P., Vernesi, C., 2010. A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *J. Biogeogr.* 37, 830-841.
- Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Perini, F., Capellacci, S., Casabianca, A., Riobó, P., Giacobbe, M.G., Totti, C., 2012. Genetic diversity of the genus *Ostreopsis* Schmidt: phylogeographical considerations and molecular methodology applications for field detection in the Mediterranean Sea. *Cryptogam. Algal.* 33, 153-163.
- Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobó, P., Vernesi, C., 2005. Characterization of *Ostreopsis and Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean sea based on morphology, toxicity and Internal Transcribed Spacer 5.8 S rDNA sequences. *J. Phycol.* 41, 212-225.
- Perez, R.A., Crain, S.M., Walter, J.A., Quilliam, M.A., Melanson, J.E., 2008. NRC CRM-OA-c, Certified Calibration Solution for Okadaic Acid. CRMP Tech. Rep. OA-c-20070328,.
- Pérez-Arellano, J., Luzardo, O., Pérez Brito, A., Hernández Cabrera, M., Zumbado, M., Carranza, C., Angel-Moreno, A., Dickey, R., Boada, L., 2005. Ciguatera fish poisoning, Canary Islands. *Emerg Infect Dis.* 11, 1981-1982.
- Pérez-Gómez, A., García-Rodríguez, A., James, K.J., Ferrero-Gutierrez, A., Novelli, A., Fernández-Sánchez, M.T., 2004. The marine toxin dinophysistoxin-2 induces differential apoptotic death of rat cerebellar neurons and astrocytes. *Toxicol. Sci.* 80, 74-82.
- Pérez-Gómez, A., Novelli, A., Fernández-Sánchez, M.T., 2010. Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor palytoxin enhances vulnerability of cultured cerebellar neurons to domoic acid via sodium-dependent mechanisms. *J. Neurochem.* 114, 28-38.
- Pezzolesi, L., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. Dello, Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Pistocchi, R., 2012. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis cf. ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Water Res.* 46, 82-92.
- Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Marić Pfannkuchen, D., Iveša, L., Kružić, P., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Godrijan, M., 2012. Toxin-producing *Ostreopsis cf. ovata* are likely to bloom undetected along Coastal Areas. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5574-5582.
- Piel, J., 2009. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 26, 338-362.

- Pierotti, S., Malaguti, C., Milandri, A., Poletti, R., Rossini, G.P., 2003. Functional assay to measure yessotoxins in contaminated mussel samples. *Anal. Biochem.* 312, 208-216.
- Pimiento, C., Nifong, J.C., Hunter, M.E., Monaco, E., Silliman, B.R., 2013. Habitat use patterns of the invasive red lionfish *Pterois volitans*: a comparison between mangrove and reef systems in San Salvador, Bahamas. *Mar. Ecol.*
- Pistocchi, R., Guerrini, F., Pezolesi, L., Riccardi, M., Vanucci, S., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Forino, M., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Milandri, A., Pompei, M., Cangini, M., Pigozzi, S., Riccardi, E., 2012. Toxin Levels and Profiles in Microalgae from the North-Western Adriatic Sea—15 Years of Studies on Cultured Species. *Mar. Drugs* 10, 140-162.
- Place, A.R., Bowers, H.A., Bachvaroff, T.R., Adolf, J.E., Deeds, J.R., Sheng, J., 2012. *Karlodinium veneficum*—The little dinoflagellate with a big bite. *Harmful Algae* 14, 179-195.
- Place, A.R., Munday, R., Munday, J.S., 2014. Acute toxicity of karlotoxins to mice. *Toxicon* 90, 184-190.
- Prandi, S., Sala, G.L., Bellocci, M., Alessandrini, A., Facci, P., Bigiani, A., Rossini, G.P., 2011. Palytoxin induces cell lysis by priming a two-step process in MCF-7 cells. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1283-1296.
- Provasoli, L., 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae, en: *Cultures and Collections of Algae. Proceedings of the US-Japan Conference, Hakone, September 1966.* Japanese Society for Plant Physiology, pp. 63-75.
- R., D., 2008. Ciguatera toxins: chemistry, toxicology, and detection, en: Dekker, M. (Ed.), *Food science and technology.* New York, pp. 173-179.
- Ramos, V., Vasconcelos, V., 2010. Palytoxin and analogs: Biological and ecological effects. *Mar. Drugs* 8, 2021-2037.
- Ramsdell, J.S., Gulland, F.M., 2014. Domoic acid epileptic disease. *Mar. Drugs* 12, 1185-1207.
- Randall, J.E., 1958. A review of ciguatera, tropical fish poisoning, with a tentative explanation of its cause. *Bull. Mar. Sci.* 8, 236-267.
- Ray, S.D., Kamendulis, L.M., Gurule, M.W., Yorkin, R.D., Corcoran, G.B., 1993. Ca²⁺ antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. *FASEB J.* 7, 453-463.
- Redondo, J., Fiedler, B., Scheiner-Bobis, G., 1996. Palytoxin-induced Na⁺ influx into yeast cells expressing the mammalian sodium pump is due to the formation of a channel within the enzyme. *Mol. Pharmacol.* 49, 49-57.
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P.A., Pizarro, G., Paz, B., Franco, J.M., Blanco, J., 2014. Dinophysis Toxins: Causative Organisms, Distribution and Fate in Shellfish. *Mar. Drugs* 12, 394-461.
- Reguera, B., Velo-Suárez, L., Raine, R., Park, M.G., 2012. Harmful *Dinophysis* species: A review. *Harmful Algae* 14, 87-106.
- Rein, K.S., Borrone, J., 1999. Polyketides from dinoflagellates: origins, pharmacology and biosynthesis. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 124, 117-131.

- Reverté, L., Soliño, L., Carnicer, O., Diogène, J., Campàs, M., 2014. Alternative methods for the detection of emerging marine toxins: Biosensors, biochemical assays and cell-based assays. *Mar. Drugs* 12, 5719-5763.
- Rhodes, L., 2011. World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon* 57, 400-407.
- Rhodes, L.L., Smith, K.F., Munday, R., Selwood, A.I., McNabb, P.S., Holland, P.T., Bottein, M.-Y., 2010. Toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from Rarotonga, Cook Islands. *Toxicon* 56, 751-758.
- Riobó Agulla, P., 2006. Palitoxinas, ensayos biológicos y métodos químicos para su determinación en organismos marinos. Universidade de Vigo.
- Rivas, M., García, C., Liberona, J.L., Lagos, N., 2000. Biochemical characterization and inhibitory effects of dinophysistoxin-1, okadaic acid and microcystine 1-r on protein phosphatase 2a purified from the mussel *Mytilus chilensis*. *Biol. Res.* 33, 197-206.
- Robertson, A., Garcia, A.C., Quintana, H.A.F., Smith, T.B., II, B.F.C., Reale-Munroe, K., Gulli, J.A., Olsen, D.A., Hooe-Rollman, J.I., Jester, E.L.E., 2014. Invasive lionfish (*Pterois volitans*): a potential human health threat for ciguatera fish poisoning in tropical waters. *Mar. Drugs* 12, 88-97.
- Rongo, T., van Woesik, R., 2013. The effects of natural disturbances, reef state, and herbivorous fish densities on ciguatera poisoning in Rarotonga, southern Cook Islands. *Toxicon* 64, 87-95.
- Rossini, G.P., Bigiani, A., 2011. Palytoxin action on the Na⁺, K⁺-ATPase and the disruption of ion equilibria in biological systems. *Toxicon* 57, 429-39.
- Rubiolo, J.A., López-Alonso, H., Vega, F. V, Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2011. Okadaic acid and dinophysin toxin 2 have differential toxicological effects in hepatic cell lines inducing cell cycle arrest, at G0/G1 or G2/M with aberrant mitosis depending on the cell line. *Arch. Toxicol.* 85, 1541-1550.
- Ruff, T.A., Lewis, R.J., 1994. Clinical aspects of ciguatera: an overview. *Mem. Queensl. Museum. Brisbane* 34, 609-619.
- Ryan, J.C., Wu, Q., Shoemaker, R.C., 2015. Transcriptomic signatures in whole blood of patients who acquire a chronic inflammatory response syndrome (CIRS) following an exposure to the marine toxin ciguatoxin. *BMC Med. Genomics* 8.
- Saito, S., Feng, J., Kira, A., Kobayashi, J., Ohizumi, Y., 2004. Amphidinolide H, a novel type of actin-stabilizing agent isolated from dinoflagellate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 961-965.
- Sakai, R., Swanson, G.T., 2014. Recent progress in neuroactive marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 31, 273-309.
- Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., Fujita, T., Naoki, H., 1991. Amphidinol, a polyhydroxy-polyene antifungal agent with an unprecedented structure, from a marine dinoflagellate, *Amphidinium klebsii*. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 9859-9861.

- Sato, S., Nishimura, T., Uehara, K., Sakanari, H., Tawong, W., Hariganeya, N., Smith, K., Rhodes, L., Yasumoto, T., Taira, Y., 2011. Phylogeography of *Ostreopsis* along west Pacific coast, with special reference to a novel clade from Japan. PLoS One 6, e27983.
- Satoh, E., Ishii, T., Nishimura, M., 2003. Palytoxin-induced increase in cytosolic-free Ca^{2+} in mouse spleen cells. Eur. J. Pharmacol. 465, 9-13.
- Scheiner-Bobis, G., Hübschle, T., Diener, M., 2002. Action of palytoxin on apical H^+/K^+ -ATPase in rat colon. Eur. J. Biochem. 269, 3905-3911.
- Schirone, M., Visciano, P., Luciani, M., Ciarelli, A., Berti, M., Tofalo, R., Suzzi, G., 2013. Yessotoxin determination in *Mytilus galloprovincialis* revealed by an in vitro functional assay. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 1189-1192.
- Seemann, P., Gernert, C., Schmitt, S., Mebs, D., Hentschel, U., 2009. Detection of hemolytic bacteria from *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin-screening assay. Antonie Van Leeuwenhoek 96, 405-411.
- Selwood, A.I., Wilkins, A.L., Munday, R., Shi, F., Rhodes, L.L., Holland, P.T., 2013. Portimine: a bioactive metabolite from the benthic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*. Tetrahedron Lett. 54, 4705-4707.
- Senft-Batoh, C.D., Dam, H.G., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Schlichting, C.D., 2015. Influence of predator-prey evolutionary history, chemical alarm-cues, and feeding selection on induction of toxin production in a marine dinoflagellate. Limnol. Oceanogr.
- Sérandour, A.-L., Ledreux, A., Morin, B., Derick, S., Augier, E., Lancelleur, R., Hamlaoui, S., Moukha, S., Furger, C., Biré, R., Kryš, S., Fessard, V., Troussellier, M., Bernard, C., 2012. Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part I: Screening strategy and pre-validation study with lipophilic marine toxins. Anal. Bioanal. Chem. 403, 1983-1993.
- Setliff, J.A., Rayner, M.D., Ki Hong, S., 1971. Effect of ciguatera on sodium transport across the frog skin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 18, 676-684.
- Sheng, J., Malkiel, E., Katz, J., Adolf, J.E., Place, A.R., 2010. A dinoflagellate exploits toxins to immobilize prey prior to ingestion. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 2082-2087.
- Shimahara, T., Molgó, J., 1990. Palytoxin enhances quantal acetylcholine release from motor nerve terminals and increases cytoplasmic calcium levels in a neuronal hybrid cell line. Life Sci. Adv. Pharmacol 9, 785-792.
- Skinner, M.P., Lewis, R.J., Morton, S., 2013. Ecology of the ciguatera causing dinoflagellates from the Northern Great Barrier Reef: Changes in community distribution and coastal eutrophication. Mar. Pollut. Bull. 77, 210-219.
- Smienk, H., Domínguez, E., Rodríguez-Velasco, M.L., Clarke, D., Kapp, K., Katikou, P., Cabado, A.G., Otero, A., Vieites, J.M., Razquin, P., 2013. Quantitative determination of the okadaic acid toxins group by a colorimetric phosphatase inhibition assay: Interlaboratory study. J. AOAC Int. 96, 77-85.

- Soliño, L., de la Iglesia, P., Garia-Altare, M., Diogène, J., 2014. The Chemistry of Ciguatoxins: From the First Records to Current Challenges of Monitoring Programs, en: *Toxins and Biologically Active Compounds from Microalgae*. CRC Press, p. 176.
- Soliño, L., Sureda, F.X., Diogène, J., 2015. Evaluation of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 toxicity on Neuro-2a, NG108-15 and MCF-7 cell lines. *Toxicol. Vitro*. 29, 59-62.
- Soliño, L., Widgy, S., Pautonnier, A., Turquet, J., Loeffler, C.R., Flores Quintana, H.A., Diogène, J., s. f. Prevalence of ciguatoxins in lionfish (*Pterois spp.*) from Guadeloupe, Saint Martin, and Saint Barthélmy Islands (Caribbean). *Toxicon*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.05.015>
- Sosa, S., Ardizzone, M., Beltramo, D., Vita, F., Dell'Ovo, V., Barreras, A., Yasumoto, T., Tubaro, A., 2013. Repeated oral co-exposure to yessotoxin and okadaic acid: A short term toxicity study in mice. *Toxicon* 76, 94-102.
- Spira, M.E., Oren, R., Dormann, A., Ilouz, N., Lev, S., 2001. Calcium, protease activation, and cytoskeleton remodeling underlie growth cone formation and neuronal regeneration. *Cell. Mol. Neurobiol.* 21, 591-604.
- Stacey, G., Viviani, B., 2001. Cell culture models for neurotoxicology, en: Stacey, G., Doyle, A., Ferro, M. (Eds.), *Cell cultura Methods for in vitro toxicology*. Kluwer Academic Publishers, pp. 115-119.
- Stewart, I., McLeod, C., 2014. The Laboratory Mouse in Routine Food Safety Testing for Marine Algal Biotoxins and Harmful Algal Bloom Toxin Research: Past, Present and Future. *J. AOAC Int.* 97, 356-372.
- Swinker, M., Tester, P., Attix, D.K., Schmechel, D., 2002. Human health effects of exposure to *Pfiesteria piscicida*: a review. *Microbes Infect.* 4, 751-762.
- Tachibana, K., 1980. Structural studies on marine toxins.
- Takai, A., Murata, M., Torigoe, K., Isobe, M., Mieskes, G., Yasumoto, T., 1992. Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship. *Biochem. J* 284, 539-544.
- Takakura, N., Sanders, P., Fessard, V., Le Hégarat, L., 2013. In vitro combined cytotoxic effects of pesticide cocktails simultaneously found in the French diet. *Food Chem. Toxicol.* 52, 153-162. doi:10.1016/j.fct.2012.11.011
- Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T., Mahmud, Y., Noguchi, T., 2003. *Ostreopsis sp.*, a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon* 42, 29-33.
- Terao, K., Ito, E., Ohkusu, M., Yasumoto, T., 1993. A comparative study of the effects of DSP-toxins on mice and rats., en: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Ed.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, vol. 3. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 581-586.
- Tichadou, L., Glaizal, M., Armengaud, A., Grosse, H., Lemée, R., Kantin, R., Lasalle, J.-L., Drouet, G., Rambaud, L., Malfait, P., De Haro, L., 2010. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: Experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin. Toxicol.* 48, 839-844.

- Tripathi, A., Fang, W., Leong, D.T., Tan, L.T., 2012. Biochemical studies of the lagunamides, potent cytotoxic cyclic depsipeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Mar. Drugs* 10, 1126-1137.
- Truxal, L.T., Bourdelais, A.J., Jacocks, H., Abraham, W.M., Baden, D.G., 2010. Characterization of tamulamides A and B, polyethers isolated from the marine dinoflagellate *Karenia brevis*. *J. Nat. Prod.* 73, 536-540.
- Tubaro, A., Durando, P., Del Favero, G., Ansaldi, F., Icardi, G., Deeds, J.R., Sosa, S., 2011. Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon* 57, 478-495.
- Tubaro, A., Sosa, S., Carbonatto, M., Altinier, G., Vita, F., Melato, M., Satake, M., Yasumoto, T., 2003. Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon* 41, 783-792.
- Turner, J.T., Tester, P.A., 1997. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1203-1213.
- Usui, T., Kazami, S., Dohmae, N., Mashimo, Y., Kondo, H., Tsuda, M., Terasaki, A.G., Ohashi, K., Kobayashi, J., Osada, H., 2004. Amphidinolide H, a potent cytotoxic macrolide, covalently binds on actin subdomain 4 and stabilizes actin filament. *Chem. Biol.* 11, 1269-1277.
- Vale, C., Alfonso, A., Suñol, C., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2006. Modulation of calcium entry and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by palytoxin. *J. Neurosci. Res.* 83, 1393-1406.
- Vale-González, C., Gómez-Limia, B., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2007. Effects of the marine phycotoxin palytoxin on neuronal pH in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 85, 90-98.
- Valverde, I., Lago, J., Reboreda, A., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2008a. Characteristics of palytoxin-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells. *Toxicol. Vitro.* 22, 1432-1439.
- Valverde, I., Lago, J., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2008b. In vitro approaches to evaluate palytoxin-induced toxicity and cell death in intestinal cells. *J. Appl. Toxicol.* 28, 294-302.
- Van Apeldoorn, E.N., Van Egmond, H.P., 1998. Diarrhetic shellfish poisoning: a review. RIVM/CSR. Rep. 05722A00.
- Van Egmond, H., Aune, T., Lassus, P., Speigers, G., Waldock, M., 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity analysis and regulation. No Title. *J. Nat. Toxins* 2, 41-83.
- Van Egmond, H.P., 2004. Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1152-1160.
- Van Wagoner, R.M., Deeds, J.R., Satake, M., Ribeiro, A.A., Place, A.R., Wright, J.L.C., 2008. Isolation and characterization of karlotoxin 1, a new amphipathic toxin from *Karlodinium veneficum*. *Tetrahedron Lett.* 49, 6457-6461.
- Van Wagoner, R.M., Deeds, J.R., Tatters, A.O., Place, A.R., Tomas, C.R., Wright, J.L.C., 2010. Structure and Relative Potency of Several Karlotoxins from *Karlodinium veneficum*. *J. Nat. Prod.* 73, 1360-1365.

- Verdaguer, E., García-Jordà, E., Jiménez, A., Stranges, A., Sureda, F.X., Canudas, A.M., Escubedo, E., Camarasa, J., Pallàs, M., Camins, A., 2002. Kainic acid-induced neuronal cell death in cerebellar granule cells is not prevented by caspase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1297-1307.
- Vernoux, J.-P., Lewis, R.J., 1997. Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*). *Toxicon* 35, 889-900.
- Villareal, T.A., Hanson, S., Qualia, S., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Dickey, R.W., 2007. Petroleum production platforms as sites for the expansion of ciguatera in the northwestern Gulf of Mexico. *Harmful Algae* 6, 253-259.
- Warmka, J.K., Winston, S.E., Zeliadt, N.A., Wattenberg, E. V, 2002. Extracellular signal-regulated kinase transmits palytoxin-stimulated signals leading to altered gene expression in mouse keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185, 8-17.
- Watkins, S.M., Reich, A., Fleming, L.E., Hammond, R., 2008. Neurotoxic shellfish poisoning. *Mar. Drugs* 6, 431-455.
- Wattenberg, E. V, 2007. Palytoxin: exploiting a novel skin tumor promoter to explore signal transduction and carcinogenesis. *Am. J. Physiol. Physiol.* 292, C24-C32.
- Wattenberg, E. V, 2011. Modulation of protein kinase signaling cascades by palytoxin. *Toxicon* 57, 440-448.
- Wattenberg, E. V, Fujiki, H., Rosner, M.R., 1987. Heterologous regulation of the epidermal growth factor receptor by palytoxin, a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-type tumor promoter. *Cancer Res.* 47, 4618-4622.
- Wattenberg, E. V, McNeil, P.L., Fujiki, H., Rosner, M.R., 1989. Palytoxin down-modulates the epidermal growth factor receptor through a sodium-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 264, 213-219.
- Wilcox, C.L., Hixon, M.A., 2014. False positive tests for ciguatera may derail efforts to control invasive lionfish. *Environ. Biol. Fishes* 1-9.
- Woofter, R.T., Brendtro, K., Ramsdell, J.S., 2005. Uptake and elimination of brevetoxin in blood of striped mullet (*Mugil cephalus*) after aqueous exposure to *Karenia brevis*. *Environ. Health Perspect.* 11-16.
- Wu, C.H., 2009. Palytoxin: membrane mechanisms of action. *Toxicon* 54, 1183-9.
- Yang, M.H., Kim, J., Khan, I.A., Walker, L.A., Khan, S.I., 2014. Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1) modulators from natural products as anti-cancer agents. *Life Sci.* 100, 75-84.
- Yasumoto, T., Murata, M., 1990. Polyether toxins involved in seafood poisoning. *ACS Symp. Ser.* 418, 120-132.
- Yasumoto, T., Murata, M., 1993. Marine toxins. *Chem. Rev.* 93, 1897-1909.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K., Clardy, J., 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41, 1019-1025.

- Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R., Adachi, R., 1977. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.
- Yasumoto, T., Underdal, B., Aune, T., Hormazabal, V., Skulberg, O.M., Oshima, Y., 1990. Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polylepsis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters.
- Yasumoto, T., Yasumura, D., Ohizumi, Y., 1986. Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines. Agric. Biol. Chem. 50, 163-167.
- Yogi, K., Oshiro, N., Inafuku, Y., Hirama, M., Yasumoto, T., 2011. Detailed LC-MS/MS analysis of ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative alga from the Pacific. Anal. Chem. 83, 8886-8891.
- Yoshizumi, M., Houchi, H., Ishimura, Y., Masuda, Y., Morita, K., Oka, M., 1991. Mechanism of palytoxin-induced Na⁺ influx into cultured bovine adrenal chromaffin cells: Possible involvement of Na⁺ H⁺ exchange system. Neurosci. Lett. 130, 103-106.
- Zaias, J., Fleming, L.E., Baden, D.G., Abraham, W.M., 2011. Repeated exposure to aerosolized brevetoxin-3 induces prolonged airway hyperresponsiveness and lung inflammation in sheep. Inhal. Toxicol. 23, 205-211.
- Zanelli, U., Caradonna, N.P., Hallifax, D., Turlizzi, E., Houston, J.B., 2012. Comparison of cryopreserved HepaRG cells with cryopreserved human hepatocytes for prediction of clearance for 26 drugs. Drug Metab. Dispos. 40, 104-110.
- Zepeda, R.J., Candiracci, M., Lobos, N., Lux, S., Miranda, H.F., 2014. Chronic toxicity study of neosaxitoxin in rats. Mar. Drugs 12, 5055-5071.

Listado de publicaciones y contribuciones científicas

A continuación se enumeran las publicaciones científicas derivadas de esta tesis, así como las contribuciones a otros artículos y comunicaciones en congresos:

Capítulo de libro: Soliño, L., de la Iglesia, P., Garia-Altare, M. y Diogène, J. (2014). The Chemistry of Ciguatoxins: From the First Records to Current Challenges of Monitoring Programs. En *Toxins and Biologically Active Compounds from Microalgae* (Vol. 1, p. 176). CRC Press.

Short communication: Soliño, L., Sureda, F. X. y Diogène, J. (2015). Evaluation of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 toxicity on Neuro-2a, NG108-15 and MCF-7 cell lines. *Toxicology in Vitro*.29, 59-62.

Artículo: Soliño, L., Widy, H., Pautonnier, A., Turquet, J., Loeffler, C.R., Flores-Quintana, H. y Diogène, J. Prevalence of ciguatoxins in lionfish (*Pterois spp.*) from Guadeloupe, Saint Martin, and Saint Barthélmy Islands. *Toxicon* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.05.015>.

Artículo: Soliño, L., García-Altare, M., Ciminiello, P. Diogène J. y Francesc-Xavier Sureda. Semi-purified Ovatoxins a and b from a super-producer Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strain and palytoxin exhibit similar toxicity. Studies on cerebellar granular cells calcium influx. *Toxicon* (en revisión).

Artículo: Soliño, L., Diogène J. y Francesc-Xavier Sureda. Advances in Cell Based Assay for palytoxin detection. *Toxicology in Vitro* (en revisión).

Review: Reverté, L., Soliño, L., Carnicer, O., Diogène, J. y Campás, M. (2015). Alternative methods for the detection of emerging marine toxins: Biosensors, biochemical and cell-based assays. *Marine Drugs*. 12, 5719-5763.

Artículo: Hossen, V., Soliño, L., Leroy, P., David, E., Velge, P., Dragacci, S., Krys, S. y Diogène, J. A contribution to the risk characterization of ciguatoxins: estimation of a LOAEL from eight Ciguatera Fish Poisoning events occurred in 2010-2012 in Guadeloupe (French West Indies). *Environmental Research* (en revisión).

Póster: Soliño, L., Caillaud, A., Andree, K., Eixarch, H., de la Iglesia, P., Rodríguez, M., Domínguez, L., Acosta, F., Padilla, D., Turquet, J., Pascal Quod, J. y Diogène, J. *Application of CBA (cell based assay) for determination of CTX in fishes from different species and geographic origin (Atlantic, Pacific and Indian Ocean)*. 15th International Conference on Harmful Algae, October 29th-November 2nd, 2012. Gyeongnam, Korea.

Presentación oral: *Detección de Productos citotóxicos en la microalga Amphidinium carterae Hulbert*. XII Reunión ibérica de Microalgas nocivas y biotoxinas. October 17th. Palma de Mallorca.

