



Araceli Escudeiro Rossignoli

Tesis Doctoral

**Acumulación de toxinas DSP en el
mejillón *Mytilus galloprovincialis***

Instituto de Acuicultura

ISBN 978-84-9887-792-2 (Edición digital PDF)



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Instituto de Acuicultura

Acumulación de toxinas DSP en el mejillón
Mytilus galloprovincialis

Araceli Escudeiro Rossignoli

Memoria de tesis doctoral para optar al título de doctora

Santiago de Compostela, 2011

D. Juan Blanco Pérez, Investigador del Centro de Investigacións Mariñas de Corón, Vilanova de Arousa

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: “*Acumulación de toxinas DSP en el mejillón Mytilus galloprovincialis*”, presentada por la Licenciada en Biología, Dña. Araceli Escudeiro Rossignoli para optar al grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela, ha sido realizada en el Centro de Investigacións Mariñas bajo mi dirección y que, hallándose concluida, autorizo su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Vilanova de Arousa, a 7 de abril de 2011.

Fdo. Dr. Juan Blanco Pérez

Director de la tesis

Durante la elaboración de esta Tesis Doctoral, Araceli Escudeiro Rossignoli disfrutó de una Beca para la realización de la tesis de doctoramiento en temas de investigación marina concedida por la Consellería do Mar (Xunta de Galicia) 2006-2008 así como de un Contrato Laboral en Prácticas como Titulada Superior Bióloga por la Consellería do Mar da Xunta de Galicia en el siguiente período: 1/10/2008-30/9/2010.

Desarrollo su labor en el Centro de Investigacións Mariñas de Vilanova de Arousa dentro del departamento de “Episodios Tóxicos”.



El trabajo de esta Tesis se ha apoyado por los siguientes proyectos:

“Ligazón das toxinas DSP nas células de mexillón, aceleración da eliminación destas toxinas e das ASP por medio de sustancias non dixeribles e apoio analítico ós subproxectos de epidemioloxía, fisioloxía e xenética”. Proyecto integrado en una acción estratégica de investigación financiada por la DXID de la Xunta de Galicia. 2008-2011.

Investigador principal: Dr. Juan Blanco Pérez.

“Evaluación del impacto de los métodos y niveles utilizados para el control de toxinas en el mejillón”. Proyecto englobado dentro del Plan Nacional JACUMAR “Cultivo de mitílidos: expansión y sostenibilidad (CULMITES)”, financiado por la Junta Asesora de Cultivos Marinos del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. 2007-2009.

Investigador principal: Dr. Juan Blanco Pérez.

“Depuración de toxinas de tipo diarreico (DSP) del mejillón *Mytilus galloprovincialis* y de tipo Amnésico (ASP) de la vieira *Pecten maximus*”. Proyecto financiado por la DXID de la Xunta de Galicia. PGIDIT04RMA501007PR, 2004-2007.

Investigador principal: Dr. Juan Blanco Pérez.

A Xurxo

Agradecimientos

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me han brindado su ayuda, sus conocimientos y su apoyo. Quiero agradecerles a todas ellas todo lo que han hecho por mí, para que este trabajo saliera adelante de la mejor manera posible.

Quedo especialmente agradecida a mi director de tesis, el Dr. Juan Blanco. Gracias Juan por haberme acogido en tu grupo de trabajo y abrirme las puertas de un mundo tan interesante y apasionante como el de las biotoxinas marinas. Gracias por tu ayuda y apoyo en todo momento, por tu asesoramiento científico, tus comentarios, tus sugerencias y las correcciones con las que he podido elaborar una adecuada memoria de todo el trabajo realizado durante estos últimos 5 años. Gracias por compartir conmigo tu gran calidad científica y humana.

Por supuesto a todo el equipo de Episodios Tóxicos del Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA). A Carmen Mariño, Helena Martín, David Fernández, Jorge Regueiro, Gonzalo Álvarez, Eva Martín y Carmen Pérez tanto por su apoyo técnico como por su amistad.

Al Dr. Antonio Villalba por su ayuda y consejos en temas relacionados con la fisiología del mejillón.

Al Dr. Manuel Zapata por su asesoramiento sobre pigmentos y técnicas cromatográficas.

Al Dr. Arne Duinker por el intercambio de opiniones que mantuvimos acerca de la distribución del ácido okadaico en los orgánulos subcelulares.

A los doctores José Franco, Pilar Riobó, Beatriz Paz y Gemita Pizarro del Instituto Español de Oceanografía de Vigo (IEO) por el análisis de determinadas muestras de toxinas DSP, por sus sabios consejos y por la amistad y compañía que me mostraron en los congresos y cursos a los que asistimos juntos.

Al Dr. Javier Fernández del Instituto Universitario de Biología de la Laguna y su equipo por su colaboración durante el desarrollo de las investigaciones relacionadas con el ligamiento del ácido okadaico a una HDL.

A los doctores Alejandro Guerra (Director del CIMA) y David Iglesias por introducirme en el mundo de la investigación y ayudarme a llevar a cabo mi primer trabajo científico en el CIMA.

A Rafael Iniesta y Aída Mauríz por su apoyo en los comienzos de mi etapa en el departamento de Episodios Tóxicos.

A toda la gente del CIMA que siempre me ha manifestado su amistad y su disposición a ayudarme y animarme, especialmente a: Laura M., Nerea, Rosana, Elena, Pepi, Maite, María Varela, Maribel, Ana, Gemma, Sergio, Andrea, Cristina, Gonzálo, Paulino, Manel y Hermes.

Al Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño (INTECMAR) por todas las muestras biológicas que me cedieron para poder llevar a cabo mis estudios. En especial a la Dra. Ángeles Morono, a Fabiola Arévalo, Susana Muñiz y a Jorge Correa.

A todos mis amigos, mil gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos y por haber estado siempre a mi lado.

A mi compañero Xoán por su cariño, comprensión y constante estímulo.

A mi hijo Xurxo por enseñarme a enfrentarme a los obstáculos con alegría y darme fuerzas para seguir.

Finalmente a toda mi familia por estar siempre ahí dispuesta a escuchar, aconsejar y a echar una mano cuando se les necesita.

Abreviaturas

ABC	ATP-Binding cassette
ACAT	Acil-CoA: colesterol aciltransferasa
ADAM	9-anthryldiazomethane
AE-OTf	2-(anthracene-2,3-dicarboximido) ethyl trifluoromethanesulfonate
APROMAR	Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning
ATP	Adenosin Trifosfato
AZA	Azaspirácido
BAP	1-bromoacetylpyrene
CF	Formas conjugadas
CFP	Ciguatera Fish Poisoning
CRLMB	Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas
DA	Ácido domoico
DSP	Diarrhetic Shellfish Poisoning
DTX	Dinofisitoxinas
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Electro-spray ionization
EUROSTAT	Statistical Office of the European Communities
FAO	Food and Agriculture Organization
FD	Detección fluorimétrica
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IMB-NRC	Institute for Marine Biosciences - National Research Council Canadá
INTECMAR	Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariiño
JACUMAR	Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos y Ministerio de Medio Ambiente
LC	Cromatografía líquida
<i>P</i>	Coeficiente de partición
<i>D</i>	Coeficiente de distribución

<i>m/z</i>	Relación masa - carga
MARM	Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino
MDR/MDR	Proteínas relacionadas con la resistencia a multidrogas
MS	Espectrometría de masas
NSP	Neurotoxic Shellfish Poisoning
OA	Ácido okadaico
OABP	Proteína fijadora de aniones orgánicos
PP	Proteín fosfatasas
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
PTX	Pectenotoxina
RIA	Radioinmunoassay
SIM	Single ion monitoring
SPE	Extracción en fase sólida
SPX	Espirólido
STX	Saxitoxina
TGN	Red trans - golgi
UR	Unidades de ratón
YTX	Yesotoxina

Artículos publicados y en proceso de publicación originados como consecuencia del trabajo de investigación realizado en esta tesis doctoral.

Artículos publicados

Rossignoli, A.E., Blanco, J. 2008. Cellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Toxicon* 52: 957-959.

Rossignoli, A.E., Blanco, J. 2010. Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*: First evidences of lipoprotein binding to okadaic acid. *Toxicon* 55: 221-226.

Rossignoli, A.E., Fernández, D., Acosta, C.P., Blanco, J. 2011. Microencapsulation of okadaic acid as a tool for studying the accumulation of DSP toxins in bivalves. *Marine Environmental Research* 71 (1): 91-93.

Rossignoli, A.E., Fernández, D., Regueiro, J., Mariño, C., Blanco, J., 2011. Esterification of okadaic acid in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 57: 712-720.

Artículos enviados

Rossignoli, A.E., Fernández, D., Regueiro, J., Martín, H., Mariño, C., Blanco, J., en revisión. Okadaic acid uptake by digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Enviado a *Aquatic Toxicology*.

Regueiro, J., **Rossignoli, A.E.,** Álvarez, G., Blanco, J., en revisión. Automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of lipophilic marine toxins in shellfish. Enviado a *Food Chemistry*.

ÍNDICE.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. Importancia creciente de la acuicultura en los últimos años.....	7
2. Episodios tóxicos.....	8
3. Toxinas marinas.....	9
3.1. Toxinas responsables de intoxicaciones paralizantes.....	9
3.2. Toxinas responsables de intoxicaciones amnésicas.....	10
3.3. Toxinas lipofílicas responsables de intoxicaciones diarreicas.....	10
3.3.1 Toxinas del grupo del ácido okadaico.....	10
3.3.2. Azaspirácidos.....	11
3.4. Toxinas lipofílicas no diarreogénicas.....	11
3.4.1. Pectenotoxinas.....	11
3.4.2. Yesotoxinas.....	12
3.4.3. Espirólidos.....	12
3.5. Toxinas neurotóxicas.....	12
3.6. Ciguatera.....	12
3.7. Palitoxina.....	13
4. Toxinas DSP.....	13
4.1. Antecedentes históricos.....	13
4.2. Estructura química.....	15
4.3. Distribución.....	17
4.4. Principales organismos productores.....	18
4.5. Toxicología.....	20
4.6. Técnicas de detección.....	21
4.6.1. Ensayos <i>in vivo</i> (bioensayos).....	21

4.6.2.	Ensayos <i>in vitro</i>	23
4.6.2.1.	Ensayos funcionales.....	23
4.6.2.2.	Ensayos estructurales (inmunoensayos).....	26
4.6.3.	Métodos químicos.....	27
4.6.3.1.	Cromatografía líquida con detector de fluorescencia (HPLC-FD).....	27
4.6.3.2.	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	29
4.6.3.3.	Electroforesis capilar.....	30
5.	Mitigación de los episodios tóxicos.....	30
5.1.	Reducción de la disponibilidad de toxina.....	31
5.2.	Eliminación de toxinas de los organismos.....	32
5.3.	Selección genética de los moluscos cultivados.....	33
5.4.	Importancia de los mecanismos de acumulación.....	34
5.5.	Fisiología digestiva de los moluscos bivalvos.....	35
	OBJETIVOS.....	39
	DESARROLLO DE LA TESIS.....	43
	 CAPÍTULO 1: Estudio <i>in vitro</i> de la absorción del ácido okadaico por las células de la glándula digestiva del mejillón <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819).....	45
	ARTÍCULO 1: Okadaic acid uptake by digestive gland cells of the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i>	49
	 CAPÍTULO 2: Distribución celular del ácido okadaico en la glándula digestiva del mejillón <i>Mytilus galloprovincialis</i>	73
	ARTÍCULO 2: Cellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of <i>Mytilus galloprovincialis</i>	77

CAPÍTULO 3: Distribución subcelular del ácido okadaico en la glándula digestiva del mejillón <i>Mytilus galloprovincialis</i> . Primeras evidencias de ligamiento a una lipoproteína.....	83
ARTÍCULO 3: Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of <i>Mytilus galloprovincialis</i> : First evidences of lipoprotein binding to okadaic acid.....	87
CAPÍTULO 4: Microencapsulación del ácido okadaico como una herramienta para el estudio de la acumulación de las toxinas DSP en los moluscos bivalvos.....	95
ARTÍCULO 4: Microencapsulation of okadaic acid as a tool for studying the accumulation of DSP toxins in mussels.....	99
CAPÍTULO 5: Vías de depuración del ácido okadaico en la glándula digestiva del mejillón <i>Mytilus galloprovincialis</i>	105
5.1. Introducción.....	107
5.2. Material y métodos.....	108
5.3. Resultados.....	113
5.4. Discusión.....	117
CAPÍTULO 6: Esterificación del ácido okadaico en el mejillón <i>Mytilus galloprovincialis</i>	123
ARTÍCULO 5: Esterification of okadaic acid in the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i>	127
CONCLUSIONES GENERALES.....	139
REFERENCIAS.....	143

INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA CRECIENTE DE LA ACUICULTURA EN LOS ÚLTIMOS AÑOS

Debido a que la creciente demanda mundial de productos pesqueros es cubierta con dificultad por la pesca extractiva, la acuicultura se perfila como la mejor alternativa de cara a cubrir esta demanda (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos, APROMAR 2009). En los últimos 50 años la acuicultura mundial ha crecido espectacularmente, pasando de una producción de menos de un millón de toneladas anuales a comienzos de la década de 1950, a 51.7 millones de toneladas en 2006, lo que representa una tasa de crecimiento anual de casi el 7% con un valor de 78.800 millones de dólares. Según la FAO (2009), la acuicultura actualmente representa casi la mitad (47%) del alimento acuático mundial, y está previsto que su contribución siga aumentando hasta alcanzar el 50 % en 2015.

China es el principal productor mundial en términos de cantidad de productos acuícolas, representando en el 2005 el 67 % de la producción mundial. Europa, por su parte, produjo en el mismo año el 4% incluyendo capturas y producción acuícola (Statistical Office of the European Communities, EUROSTAT 2007). Dentro del continente Europeo, España y Dinamarca aportan, cada una, el 14 % de la producción pesquera, seguidos por Francia y el Reino Unido que aportan el 12 % (Statistical Office of the European Communities, EUROSTAT 2007).

Según los datos de la Subdirección General de Estadística del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino (MARM) del año 2008, la actividad acuícola en España sustenta en torno a 3400 empresas, titulares de 5503 establecimientos. Además según los últimos datos aportados por las Comunidades Autónomas a la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos y Ministerio de Medio Ambiente (JACUMAR), la producción española de acuicultura continental y marina alcanzó, en el año 2008, 265.313 toneladas, correspondiendo 65.262 toneladas a peces, 113 toneladas a crustáceos y 199.938 toneladas a moluscos. Dentro del cultivo de moluscos la especie por excelencia es el mejillón que supone un 72,69% del total de su producción acuícola.

Galicia es la comunidad autónoma española con las tasas más elevadas de producción de mejillón, actividad que genera unos 11.500 puestos de trabajo directos y 7.000 indirectos. Las más de 3300 bateas que existen dedicadas al cultivo de este molusco, han situado a España como segundo productor mundial después de China con un volumen de facturación anual que oscila entre 120 y 150 millones de euros en primera venta (Consello Regulador do Mexillón de Galicia, 2007)

2. EPISODIOS TÓXICOS

Los moluscos bivalvos son organismos filtradores que se alimentan principalmente de microalgas planctónicas. Algunas especies de estas microalgas producen compuestos tóxicos que se acumulan en los tejidos del bivalvo y se transmiten a través de la cadena trófica a niveles superiores llegando incluso al hombre, lo que, en ocasiones, supone graves problemas para la salud pública.

El término “episodio tóxico” se emplea para referirse a una proliferación de microalgas (especialmente del grupo de los dinoflagelados) productoras de potentes venenos o toxinas y a su acumulación en los organismos que las consumen.

Para que se produzca un episodio tóxico, no es necesario que la biomasa del fitoplancton tóxico en el agua sea muy elevada, ya que la gran capacidad filtradora de la mayoría de los moluscos bivalvos conlleva que estos invertebrados las acumulen fácilmente.

En los últimos años la aparición de este tipo de episodios tóxicos ha ido en aumento, no solo en su frecuencia sino también en intensidad y distribución geográfica. Esto ha obligado a la generalización de programas de control, tanto de las condiciones oceanográficas como del fitoplancton, que garanticen la salubridad de los productos del mar para el consumo humano. En Galicia esta labor es llevada a cabo por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino (INTECMAR), institución que se encarga de prohibir la explotación en las zonas de producción cuando los niveles detectados de toxinas en los moluscos, superan los límites legales establecidos.

Debido a que la explotación de moluscos bivalvos es una actividad de gran tradición e importancia en las costas gallegas, la aparición de episodios tóxicos conlleva repercusiones económicas y sociales que ocasionan importantes pérdidas económicas en los sectores marisquero y de acuicultura. La incidencia económica de los episodios tóxicos sobre la acuicultura del mejillón es muy variable y depende fundamentalmente de: 1) la duración del periodo de cierre, 2) la localización geográfica (dentro de Galicia, Pontevedra es la ría más afectada), 3) la situación de la instalación de cultivo en la ría (normalmente se ven más afectados los polígonos que están en la parte más externa de las rías), 4) la extensión geográfica del episodio (si, por ejemplo, se cierran todas las áreas de producción el mercado quedará sin abastecimiento). En ocasiones, la situación en algunos polígonos puede ser muy grave llegando a reducirse a un 16% el número de días al año en los que la recolección está permitida.

3. TOXINAS MARINAS

Los episodios tóxicos pueden estar provocados por la presencia de toda una serie de toxinas de origen fitoplanctónico, cuyas distribuciones geográficas son muy amplias y sus efectos sobre el hombre variables. Atendiendo a los efectos biológicos que producen dichas toxinas se pueden clasificar en 7 grupos principales cuyos componentes, responsables y síntomas se describen brevemente a continuación.

3.1.- Toxinas responsables de intoxicaciones paralizantes (PSP =*Paralytic Shellfish Poisoning*)

Los principales síntomas de una intoxicación del tipo paralizante van desde un entumecimiento o picazón leve hasta la parálisis respiratoria completa que, en casos fatales, ocurre entre dos y doce horas después de la ingestión. El principal representante del grupo de toxinas causantes de este síndrome, y el compuesto que mayor toxicidad presenta, es una guanidina heterocíclica denominada saxitoxina (STX), que además fue la primera toxina

PSP caracterizada químicamente (Schantz *et al.*, 1957; Schantz *et al.*, 1961). Los principales responsables de la producción de estas toxinas son dinoflagelados del género *Alexandrium* (Doucette and Anderson, 1993) y de las especies *Gymnodinium catenatum* (Anderson *et al.*, 1989) y *Pyrodinium bahamense* (Bates *et al.*, 1978).

3.2.- Toxinas responsables de intoxicaciones amnésicas (ASP= *Amnesic Shellfish Poisoning*)

Entre los síntomas que se asocian a las intoxicaciones amnésicas destacan los espasmos abdominales, vómitos, desorientación y pérdida de memoria (amnesia). El principal representante del grupo de toxinas causantes de este síndrome es el aminoácido tricarbóxico denominado ácido domoico (DA) (Wright *et al.*, 1989). Los principales responsables de la producción de estas toxinas son diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*, principalmente, *P. multiseriata* (= *Nitzschia pungens*) (Subba Rao *et al.*, 1988; Bates *et al.*, 1989).

3.3.- Toxinas lipofílicas responsables de intoxicaciones diarreicas

Los principales síntomas de la intoxicación que produce el consumo de moluscos contaminados con toxinas lipofílicas son diarrea, náuseas, vómitos y dolores abdominales. Dichos síntomas aparecen entre 30 minutos y algunas horas tras la ingestión y la recuperación completa se observa dentro de los tres días siguientes. Aunque las lipofílicas son el grupo de toxinas que tiene repercusiones menos drásticas sobre la salud humana, su amplia distribución geográfica y su elevada frecuencia de aparición las convierte en uno de los grupos más importantes. Este grupo incluye las toxinas del grupo del ácido okadaico y los azaspirácidos.

3.3.1.- Toxinas del grupo del ácido okadaico (DSP= *Diarrhetic Shellfish Poisoning*)

Las toxinas en forma libre son un grupo de poliésteres ácidos constituido por el ácido okadaico (OA), como componente principal, y las dinofisitoxinas 1 y 2 (DTX1 y DTX2)

(Murata *et al.*, 1982; Yasumoto *et al.*, 1985). Los principales productores son, generalmente, los dinoflagelados del género *Dinophysis*. (*D. acuminata*, *D. fortii*, *D. acuta*...) (Yasumoto *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1989) y del género *Prorocentrum* (*P. lima*, *P. belizeanum*, *P. maculosum*) (Zhou and Fritz, 1994; Quilliam *et al.*, 1996; Morton, 1998).

3.3.2.- Azaspirácidos (AZAs)

Son un grupo de toxinas caracterizadas por una única estructura que incluye un anillo de unión azaspiro, una amina cíclica y un ácido carboxílico (Satake *et al.*, 1998). Además de los síntomas característicos de su grupo, también provocan en los ratones una parálisis lenta y progresiva. Hasta hace unos años el dinoflagelado heterotrófico *Protoperdinium crassipes* era considerado el principal responsable de la producción de estas toxinas (Yasumoto *et al.*, 2002; James *et al.*, 2003), pero en el año 2009, el dinoflagelado fotosintético *Azadinium spinosum*, se identificó como productor primario de los AZAs (Tillmann *et al.*, 2009), sugiriendo que el citado *Protoperdinium* es exclusivamente un vector de estas toxinas.

3.4.- Toxinas lipofílicas no diarreogénicas: (YTX, PTX, SPX)

Incluye toxinas con características de solubilidad similares a las toxinas diarreogénicas, con las que concurren frecuentemente en muestras naturales (MacKenzie *et al.*, 2002). Hasta hace poco, este tipo de toxinas se incluían en el grupo anterior ya que su respuesta en el método del bioensayo en ratón es la misma que la de las toxinas propiamente diarreicas (produce la muerte de los ratones). Hace unos años se realizó una nueva clasificación basada en los efectos biológicos de las toxinas, de tal forma que se excluían del grupo anterior por no tener efectos diarreogénicos (Ogino *et al.*, 1998; FAO *et al.*, 2004). Este grupo incluye principalmente a las pectenotoxinas, las yesotoxinas y los espirólidos.

3.4.1. - Pectenotoxinas (PTX)

Son compuestos tipo poliéter lactona (Daiguji *et al.*, 1998). Por inyección intraperitoneal son hepatotóxicas y según estudios histopatológicos realizados en ratones,

producen daños severos en la mucosa intestinal y acumulación de fluidos en el intestino delgado.

Son producidas por dinoflagelados de diferentes especies. *Dinophysis fortii*, fue el primer productor identificado (Draisci *et al.*, 1996), pero también se han encontrado en *D. acuminata* (Mackenzie *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007a), *D. acuta* (Suzuki *et al.*, 2003) y *D. caudata* (Fernández *et al.*, 2006).

3.4.2. - Yesotoxinas (YTX)

Son poliéteres sulfatados. Pueden presentar efectos cardiotoxicos (Terao *et al.*, 1990). Sus principales productores son los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum* (Satake *et al.*, 1997) y *Lingulodinium polyedrum* (Tubaro *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2004).

3.4.3. - Espirólidos (SPX)

Son iminas macrocíclicas (Hu *et al.*, 1995a) y sus principales síntomas en ratón incluyen piloerección, espasmos musculares y abdominales, hiperextensión del lomo y arqueado de la cola. Su principal productor es el dinoflagelado *Alexandrium ostenfeldii* (Cembella *et al.*, 1998).

3.5. - Toxinas neurotóxicas (NSP= *Neurotoxic Shellfish Poisoning*)

Afectan al sistema nervioso central alterando a la visión, el habla o la ingestión. Esta intoxicación neurológica es causada por brevetoxinas poliéteres producidas por el dinoflagelado *Karenia brevis* (= *Gymnodinium breve*, *Ptychodiscus brevis*).

3.6. - Ciguatera (CFP= *Ciguatera Fish Poisoning*)

Produce un tipo de intoxicación que presenta síntomas similares a los de las toxinas lipofílicas a los que se le unen síntomas neurológicos. Incluyen las gambiertoxinas y sus principales productos de biotransformación, las ciguatoxinas (Lehane and Lewis, 2000). Se caracterizan por presentar a los peces (y no a los moluscos) como vector de transmisión

entre las microalgas bentónicas que las producen (*Gambierdiscus* spp.) y el hombre. Hasta hace unos años solo se conocía su desarrollo en zonas costeras de regiones tropicales y subtropicales de donde era endémica pero en los últimos años, probablemente debido al aumento del comercio, la extensión geográfica de su incidencia ha aumentado considerablemente. De esta forma actualmente, la ciguatera es, a nivel mundial, el tipo de intoxicación alimentaria más común causada por productos de mar, estimándose que mundialmente entre 10000 y 50000 personas sufren anualmente de la enfermedad que conforma un problema sanitario global (De Fouw *et al.*, 2001).

3.7.- Palitoxina

Es una neurotoxina bastante potente de la que todavía no se sabe mucho. Su envenenamiento se caracteriza por provocar náuseas, espasmos abdominales, diarrea severa, parestesia de las extremidades y dificultad respiratoria. Aunque existen numerosos análogos estructurales e isómeros debido a su tamaño y características conformacionales, lo cierto es que hasta el momento solo se ha conseguido aislar un análogo de la misma, la Ostreocina-D, a partir de *Ostreopsis siamensis* (Usami *et al.*, 1995). Por lo general se introduce en la cadena alimentaria a través del consumo de cangrejos, en ocasiones algún pez o invertebrado marino, y básicamente es producida por corales del género *Palythoa* y por el dinoflagelado bentónico *Ostreopsis* (Taniyama *et al.*, 2003). Hace pocos años se descubrió además, el primer caso conocido de envenenamiento humano por palitoxina causado como consecuencia de las lesiones en la piel de los dedos que se produjo una persona tras el contacto directo con corales zoántidos (*Parazoanthus* sp.) mientras limpiaba el acuario de su casa (Hoffmann *et al.*, 2008).

4. TOXINAS DSP

4.1.- Antecedentes históricos

En 1961, Korringa and Roskam describieron, tras el consumo de mejillones procedentes de Holanda, una intoxicación que presentaba los síntomas característicos de las

toxinas DSP, pero en ese momento el agente causante no fue identificado. Años después en 1975, Guzmán and Campodónico describieron un episodio similar sucedido en 1970 en Chile y encontraron una relación con la aparición de una importante proliferación de organismos pertenecientes al género *Dinophysis*. Inicialmente la comunidad científica no dio gran importancia a estos descubrimientos. Sin embargo tras la aparición de dos nuevas intoxicaciones, una en Japón en 1976, en la que resultaron afectadas 42 personas que presentaron vómitos y diarreas severas tras haber consumido mejillones (*Mytilus edulis*) y vieiras (*Patinopecten yessoensis* y *Chlamys nipponensis akazara*), y otra en 1977, en la misma zona y estación del año y con síntomas similares a la anterior, en las que resultaron afectadas 122 personas, se decidió empezar a investigar las posibles causas (Blanco *et al.*, 2005).

La cuantificación de este tipo de toxicidad pudo realizarse por primera vez gracias a las investigaciones de Yasumoto *et al.* (1978, 1979), quienes consiguieron aislar por primera vez 2 tipos de toxinas lipofílicas e implementar un bioensayo en ratón para su detección.

La principal toxina responsable de estas intoxicaciones fue identificada por Murata *et al.* (1982) como OA, una molécula que ya había sido aislada y descrita previamente en la esponja *Halichondria okadai* (Tachibana *et al.*, 1981).

Respecto a los organismos productores de esta toxina no se supo nada hasta que en 1980, Yasumoto *et al.* relacionaron a las toxinas DSP con el dinoflagelado planctónico *Dinophysis fortii* y en 1982, Murakami *et al.* hicieron lo propio con el dinoflagelado bentónico *Prorocentrum lima*.

A raíz de estos nuevos descubrimientos se empezaron a identificar toda una serie de episodios tóxicos previos causados por toxinas DSP en numerosas partes del mundo, como España (Campos *et al.*, 1982) y Noruega (Underdal *et al.*, 1985). No obstante la mayoría de ellos se asociaron a la aparición de individuos de *Dinophysis* (resumen en Europa en Van Egmond *et al.*, 1993), y solo en raras ocasiones, a la presencia de *Prorocentrum lima* y otras especies del mismo género.

4.2. Estructura química

El grupo de las toxinas DSP está formado principalmente por el OA y las DTXs. El OA, que ha sido descrita como la toxina principal de las DSP (Murata *et al.*, 1982), fue aislado por primera vez de dos esponjas del género *Halichondria*, *H. okadaii*, y *H. melanodocia* (Tachibana *et al.*, 1981). La DTX1 o 35(S)-metilOA, fue aislada y descrita por Murata *et al.* (1982). Por su parte la DTX2 o 31-desmetil-35 metil ácido okadaico fue aislada y descrita por primera vez en Irlanda (Hu *et al.*, 1992a). El OA y la DTX1 han sido descritas como las principales toxinas causantes de episodios de DSP a nivel mundial, siendo la primera más abundante en Europa y la segunda en Japón (Van Egmond *et al.*, 1993). Sin embargo las DTX2 solo han sido descritas como mayoritarias en episodios de DSP concretos sucedidos en Irlanda (Carmody *et al.*, 1996), España (Gago-Martinez *et al.*, 1996) y Portugal (Vale and Sampayo, 1999).

En general, las toxinas diarreicas principales son poliéteres largos con una función carboxílica que se diferencian principalmente en el número o en la posición que ocupan los grupos metilo que contienen (C31-C35). Sus masas moleculares son algo superiores a los 800 Da. También han sido encontrados varios análogos e isómeros del OA y las DTXs en plancton y bivalvos tales como la norokadanona (Fernández *et al.*, 2003a), el ácido belizeánico (Cruz *et al.*, 2008) o el 19-epi-OA (Cruz *et al.*, 2007; Paz *et al.*, 2008). Existen además, numerosos derivados de estas toxinas que presentan una serie de modificaciones en su estructura respecto de las toxinas parentales tales como : a) esterificación del grupo hidroxilo en la posición C₇ y C₂₃ con ácidos grasos de diferente longitud de cadena, básicamente C₁₄ y C₁₈, saturados o insaturados, dando lugar a los componentes denominados genéricamente “DTX3” (Yasumoto *et al.*, 1985); b) formación de diol-ésteres insaturados en las posiciones C₇, C₈ o C₉ (Yasumoto *et al.*, 1987; Hu *et al.*, 1992b); c) oxidación de la parte diol de las moléculas de los diol-ésteres; d) esterificación de los diol-ésteres con cadenas sulfatadas, con o sin función amida en el extremo polar de la cadena dando lugar a los grupos “DTX4” y “DTX5” respectivamente (Hu *et al.*, 1995b,c.); e) pérdida de un grupo hidroxilo en cualquiera de las posiciones de C₂ a C₇ (Figura 1); f) esterificación con ácidos grasos de los diol-ésteres descritos en b; g) formación de diol ésteres de los compuestos descritos en a).

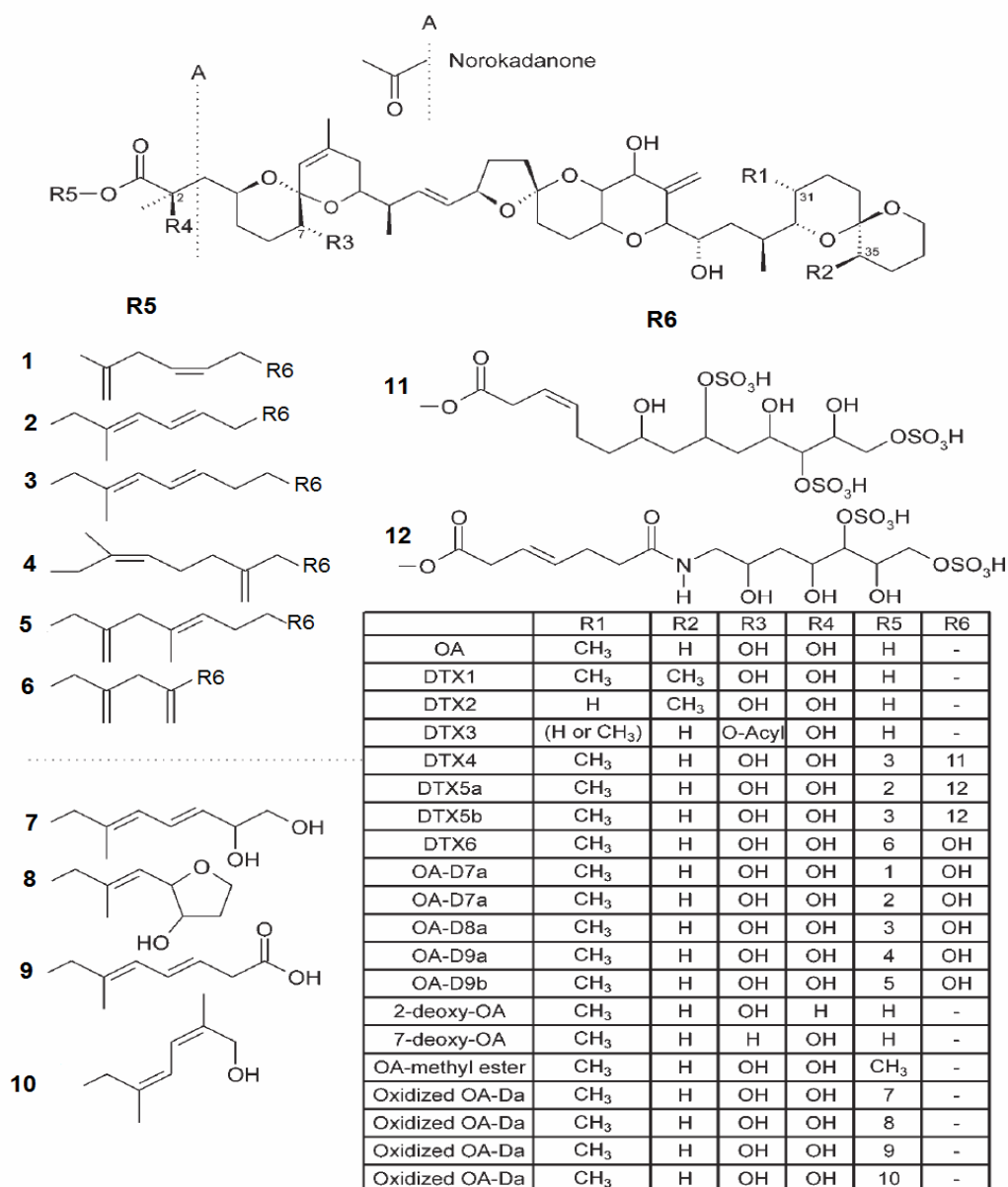


Figura 1. Estructuras químicas del ácido okadaico, dinofisitoxinas y algunos de sus derivados. Los diol-ésteres se designan como OA-D#x, donde # es el número de átomos de carbono de la cadena diol y x es una asignación arbitraria. DTX6 es un diol-éster que ha recibido esta designación específica. “Oxidized OA-Dx” son algunos derivados producidos por la oxidación de los diol-éster. Norokadanona es un posible precursor del OA encontrado en *Prorocentrum lima*. (Fuente: Fernández, 2007).

Tanto el OA como sus derivados son componentes lipofílicos y aunque su solubilidad en solventes orgánicos (metanol, acetona, cloroformo o diclorometano) es, en general elevada, varía extremadamente de unos componentes a otros. Los derivados acilados DTX3 y los diol-éster son más apolares que sus toxinas originales. Sin embargo los derivados oxidados de los diol-éster, la DTX4 y la DTX5 son más polares que sus toxinas originales y su solubilidad en determinados solventes orgánicos tales como diclorometano o hexano es bastante reducida, especialmente en el caso de DTX4 y DTX5 que son solubles en agua. El OA es poco sensible a la luz, el oxígeno y el calor. Con respecto a este último factor se ha visto que mientras el OA permanece estable hasta temperaturas de 120°C, la DTX2 comienza a degradarse a partir de los 100°C (Mccarron *et al.*, 2007). Así mismo todas las toxinas pertenecientes a este grupo son altamente estables durante meses en estado congelado (- 20°C a - 80°C) (Mccarron *et al.*, 2007).

4.3.- Distribución

Actualmente este tipo de toxicidad está ampliamente distribuida por todo el mundo, de lo que se derivan numerosas publicaciones que describen la aparición de episodios tóxicos que presentan altos niveles de toxinas DSP en bivalvos o en fitoplancton a lo largo de toda la costa de Europa, Canadá, América del Sur, Japón, Australia y África (revisado en Blanco *et al.*, 2005) (Figura 2).

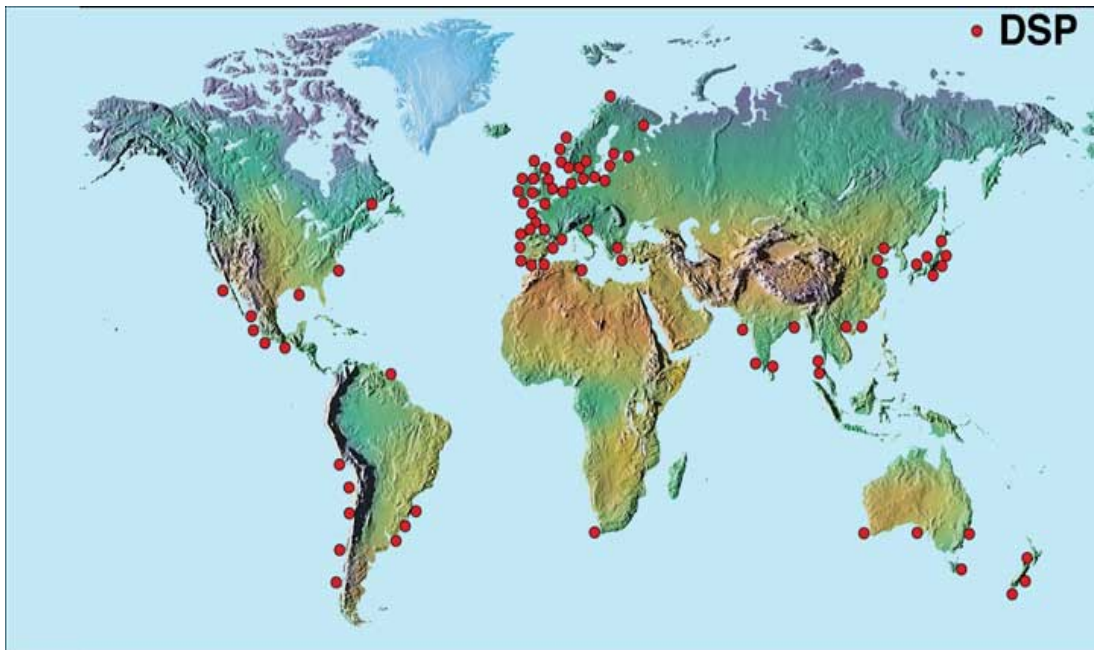


Figura 2. Distribución mundial de las toxinas DSP en 2008 (Fuente: Woods Hole Oceanographic Institution, WHOI 2008).

La situación concreta del Noroeste de España, en donde la aparición de episodios de DSP asociados especialmente a la especie *Dinophysis acuminata* es un fenómeno muy común a lo largo del año, es de notable importancia al tratarse esta zona de uno de los mayores productores de mejillón a nivel mundial.

4.4.- Principales organismos productores

Los principales organismos asociados al síndrome DSP son dinoflagelados pertenecientes al género *Dinophysis* (*D. acuminata*, *D. fortii*, *D. acuta*, *D. novergica*, *D. mitra*, *D. rotundata*) (Yasumoto *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1989; Vale *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2001) y del género *Prorocentrum* (*P. lima*, *P. belizeanum*, *P. maculosum*) (Lee *et al.*, 1987; Zhou and Fritz, 1994; Quilliam *et al.*, 1996; Morton *et al.*, 1998).

Mientras el cultivo de numerosas especies bentónicas del género *Prorocentrum* resulta relativamente sencillo empleando medios de cultivo estándares para algas fotosintéticas, el caso del género *Dinophysis* es bastante más complejo. Los dinoflagelados del género *Dinophysis* incluyen especies heterótrofas o mixótrofas, lo que dificulta

considerablemente el poder establecer y optimizar sus condiciones de crecimiento. En el año 2006, Park *et al.* (2006) consiguieron establecer por primera vez el cultivo de la especie *D. acuminata*. Para ello fue necesario alimentar al dinoflagelado con el ciliado *Mirionecta rubra*, quien a su vez requería aportes de microalgas criptofitas del género *Teleaulax*.

La variabilidad del contenido celular de toxinas en los dinoflagelados está relacionado con las diferentes fases de crecimiento celular y poblacional en interacción con las condiciones ambientales (fotoperíodo, estado nutricional, salinidad, temperatura, estrés) (Anderson *et al.*, 1990; Taroncher-Oldenburg *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1999).

Las principales toxinas DSP que han sido encontradas en células de fitoplancton son el OA, DTX1, DTX2, DTX4, DTX5 y DTX6 (revisado en Blanco *et al.*, 2005). Hasta la fecha los derivados DTX3 nunca han sido encontrados en microalgas marinas (sólo se detectaron trazas en muestras de plancton (Vale, 2010)), lo que sugiere que se originan en los propios bivalvos mediante acilación (Lee *et al.*, 1989). A partir de cultivos de *P.lima*, se descubrió en los años 90 que, mientras la transformación de las forma sulfatadas a diol-éster ocurría en cuestión de minutos, la de diol-éster a OA era más lenta y requería de horas (Quilliam and Ross, 1996; Suzuki *et al.*, 2004). Al ser consideradas estas moléculas como menos tóxicas que sus derivados (Hu *et al.*, 1992b, 1995b), su compartimentalización podría constituir una estrategia para evitar la autotoxicidad celular. Además los diol-éster al carecer de grupo ionizable (Quilliam *et al.*, 1996), podrían ser transportadores efectivos para mover la toxina libre (OA) entre los diferentes compartimentos celulares (Blanco *et al.*, 2005).

En Galicia las especie responsables de los abundantes episodios tóxicos de DSP varían de unas rías a otras. Así en las Rías Altas, las principales especies implicadas en la aparición de pulsos de presencia de toxinas DSP entre primavera y otoño son *Dinophysis acuminata* y *D. sacculus* mientras que en las Rías Baixas es más abundante la aparición de *D. acuminata* cuyas proliferaciones llegan a ser tan persistentes que en ocasiones provocan cierres de hasta 10 meses de duración (Arévalo *et al.*, 1995). La presencia de *D. acuta* y *D. caudata* suele asociarse a episodios de DSP de finales de verano – otoño, más localizados en el tiempo (Pizarro, 2008).

4.5.- Toxicología

Los efectos tóxicos característicos de una intoxicación del tipo DSP están bien caracterizados y documentados desde los primeros informes clínicos realizados a raíz de una intoxicación masiva en Japón en 1978 cuando 42 personas presentaron importantes cuadros de diarrea y vómitos (Yasumoto *et al.*, 1978). Los primeros síntomas de este tipo de intoxicación aparecen entre los 30 minutos y las pocas horas (no más de 12 horas) tras la ingesta del producto contaminado, con diarrea, vómitos, náuseas, dolor de cabeza e incluso en algunos casos, fuerte dolor abdominal. La recuperación suele producirse a los 3 días.

A través de los resultados obtenidos en los bioensayos en ratón se ha podido establecer una buena correlación entre la toxicidad de estas toxinas en humanos y los efectos físicos que causa en el ratón. De esta forma la dosis mínima de OA (principal toxina del grupo) requerida para producir síntomas en humanos adultos se ha establecido en 1 unidad de ratón (UR), y se define como la cantidad de toxina requerida para provocar la muerte de un ratón de 20 g en 24 horas, tras la inyección intraperitoneal de la toxina. Hay que tener en cuenta que los efectos causados por el OA sobre el ratón varían en función de cual sea la vía de administración de la toxina. Así si la administración es oral, el OA provoca daños intestinales, diarreas e incluso la muerte, pero no afecta al hígado. Por el contrario si la administración es mediante inyección intraperitoneal, los efectos sobre el intestino son escasos pero el hígado si se ve afectado sustancialmente (Berven *et al.*, 2001).

Tanto el OA como las DTXs actúan inhibiendo las proteín-fosfatasas serina/treonina, especialmente PP2A, un poco menos PP1B y en menor medida PP2B (Cohen, 1989; Fujiki and Suganama, 1993). Estas enzimas están implicadas en los procesos de defosforilación de los residuos de la fosfoserina y fosfotreonina de los substratos proteicos y por tanto en la regulación del metabolismo celular, replicación del DNA, transcripción, progresión del ciclo celular, diferenciación, desestabilización genómica e incluso oncogénesis (Ten-Hage *et al.*, 2000; Vanden Heuvel, 2002). La hiperfosforilación causada por la inhibición de la actividad de las proteín fosfatasas serina/treonina, afecta a la secreción de Na⁺ y a la permeabilidad de los fluidos de las células intestinales, de ahí el efecto diarreogénico de estas toxinas (Cohen *et al.*, 1990).

Además las toxinas del grupo del OA parece que tienen efectos crónicos bastante importantes que, tras una exposición prolongada, les confiere carácter de promotores tumorales y carcinógenos (Fujiki *et al.*, 1988; Fujiki and Suganama, 1999; Ten-Hage *et al.*, 2000). La salubridad para los humanos asociada a la toxicidad crónica de las toxinas DSP como promotores de tumores y componentes mutagénicos todavía no ha sido adecuadamente estimada (Cordier *et al.*, 2000).

4.6.- Técnicas de detección de las toxinas DSP

Como en el caso de otras toxinas marinas, existen básicamente dos tipos de métodos para su determinación o la de su toxicidad que se emplean en función del coste económico y de la información que se quiere obtener: Los ensayos y los análisis. Existen, a su vez dos tipos de ensayos: *in vivo* (bioensayos) e *in vitro* que normalmente se aplican para la protección de la salud pública y en los que la prioridad es determinar la toxicidad o la concentración global de toxinas. Los análisis incluyen los métodos químicos basados en la separación de las toxinas por cromatografía líquida de alta eficacia y detección colorimétrica, fluorimétrica o por espectrometría de masas, así como la electroforesis capilar. Hasta ahora los métodos analíticos se empleaban básicamente en investigación cuando lo que se quería era identificar y cuantificar cada una de las toxinas presentes en las muestras. Sin embargo recientemente, la Unión Europea acaba de aprobar un nuevo reglamento en el que se establece un período máximo de 3 años para sustituir completamente a los bioensayos por los análisis como métodos oficiales de detección de las toxinas (Comisión Europea, 2011).

4.6.1. Ensayos *in vivo* (bioensayos)

Se basan en la administración a un animal de la muestra o extracto de la misma, por vía oral o intraperitoneal y la observación de los síntomas y/o los tiempos de muerte.

Hasta el año 2014, el **bioensayo en ratón** (Yasumoto *et al.*, 1978) continuará siendo uno de los métodos oficiales para detectar el OA y las DTXs. Este método también se emplea para la detección de otras toxinas (YTX, PTX, AZAs) debido a que presentan

propiedades de solubilidad muy similares. No obstante el rango de sustancias detectadas, la sensibilidad y la recuperación de toxinas depende en gran medida, por un lado, de la selección y proporción de solventes orgánicos empleados (tanto para la extracción como para los procedimientos de limpieza de las muestras) y por otro, del modo de administración de las toxinas (ingestión oral o inyección intraperitoneal). El método estándar implica una extracción con acetona seguida de una partición líquido-líquido con éter dietílico. A continuación se evapora el éter, se resuspende en Tween 60 al 0,1% en medio salino y se inyecta por vía intraperitoneal a los ratones. Los ratones se observan durante 24 horas anotando síntomas y tiempo de muerte que se correlaciona con la toxicidad de este tipo (dependiente de la concentración de toxina y su potencia) presente. En cada ensayo deben utilizarse 3 ratones. La muerte de dos de los tres ratones en un lapso de 24 horas tras la inoculación en cada uno de ellos de un extracto equivalente a 5 g de glándula digestiva o 25 g de cuerpo entero, debe considerarse como un resultado positivo con respecto a la presencia de estas toxinas a niveles superiores a los establecidos en la legislación (Comisión Europea, 2011). La toxicidad se proporciona en unidades ratón (UR), de tal forma que una UR es definida como la cantidad mínima de toxina requerida para producir la muerte de dos de tres ratones en las 24 horas siguientes a la inyección intraperitoneal, es decir, la cantidad mínima necesaria (aproximadamente 4 µg de OA (Aune *et al.*, 2007)), administrada intraperitonealmente, para matar un ratón de 20 g en 24 horas (Yasumoto *et al.*, 1978). El límite de detección para el bioensayo en ratón depende de las condiciones específicas del procedimiento pero puede establecerse en aproximadamente 0.05 UR g⁻¹. La cantidad total máxima (en cuerpo entero o cualquier parte consumible por separado) de OA o DTXs que contenga el molusco bivalvo vivo que va a ser comercializado nunca podrá ser superior a 160 µg de equivalentes de OA por kg⁻¹ (Comisión Europea, 2004). En general se considera al bioensayo en ratón como un método caro y que requiere bastante tiempo, que no es capaz de distinguir entre toxinas o grupos y en el que se pueden producir abundantes efectos matriz (Stabell *et al.*, 1991; Goto *et al.*, 2001). Además este método, ha sido continuamente objeto de críticas desde el punto de vista ético del bienestar de los animales. No obstante este método ha asegurado la salud pública durante años, es más barato que la mayor parte de los métodos que podrían utilizarse para el control de toxinas y tiene numerosas ventajas en los programas de control,

como su fácil adaptación a volúmenes de trabajo cambiantes y la detección de toxinas desconocidas.

El bioensayo en rata (Kat, 1983) también está regulado para la detección de OA, DTXs y AZAs, Es un test de toxicidad oral en el que en cada ensayo deben utilizarse 3 ratas. Una reacción diarreica en cualquiera de las 3 ratas se considerará un resultado positivo con respecto a la presencia de OA, DTXs y AZAs a niveles superiores a los establecidos en la legislación (Comisión Europea, 2011). El límite de detección de este ensayo es de aproximadamente 800 mg de equivalentes de OA por kg⁻¹ de glándula digestiva (Blanco *et al.*, 2005). Aunque este tipo de bioensayo simula la forma en la que se intoxican los humanos y no requiere de extracción previa de las toxinas, es un método solo semicuantitativo y de baja precisión.

Existen **otra serie de ensayos *in vivo*** alternativos al bioensayo en ratón y en rata, que incluyen el empleo de crías de ratón (Hamano *et al.*, 1986), bioensayos con *Daphnia magna* (Vernoux *et al.*, 1993) e incluso bioensayos con otros mamíferos (revisado en Fernández *et al.*, 2003b).

4.6.2. Ensayos *in vitro*

4.6.2.1. Ensayos funcionales

Los ensayos funcionales correlacionan la toxicidad con la respuesta de las células de cultivo al mecanismo de acción de la toxina. Existen varios métodos desarrollados para OA y DTXs.

Los **ensayos de inhibición de las fosfatasas**, que son mencionados específicamente en la legislación como un método alternativo para la detección de toxinas lipofílicas (Comisión Europea, 2011), son ensayos funcionales que se basan en la capacidad inhibitoria que el OA y las DTXs tienen sobre las proteínas fosfatasas PP1 y PP2A (Bialojan and Takai, 1988; Cohen, 1989). El procedimiento detecta y cuantifica las toxinas midiendo la inhibición de fosfatasas parcialmente purificadas. Las fosfatasas purificadas se disponen en una fase sólida (una placa de microtitulación) y el ensayo de inhibición, para determinar

la presencia o no de las toxinas, se realiza mediante una incubación en los pocillos de la placa de un extracto metanólico de las toxinas en presencia de una determinada cantidad de enzima. Las toxinas se determinan mediante la comparación de la actividad fosfatasa con patrones conocidos de la misma. La forma de revelar la actividad de la toxina consiste en cuantificar el color del fosfato libre, la fluorescencia (para sustratos fluorescentes), la luminiscencia (para sustratos luminiscentes) o la actividad radiactiva que generan los distintos tipos de sustratos para la PP2A en un espectrofotómetro, fluorímetro, luminómetro, o medidor de radiactividad. De esta forma se han desarrollado ensayos basados en sustratos radiactivos (Holmes, 1991; Chen *et al.*, 1993; Honkanen *et al.*, 1996), ensayos colorimétricos (Takai and Mieskes, 1991; Simon and Vernoux, 1994; Tubaro *et al.*, 1996a) y ensayos fluorimétricos (Vieytes *et al.*, 1997; Prassopoulou *et al.*, 2009).

En general y en trabajo con soluciones patrón, la sensibilidad de los métodos fluorimétricos (límite de detección de 2 µg OA/kg hepatopáncreas) es mayor que la de los colorimétricos (límite de detección de 10 µg OA/kg hepatopáncreas) (Mounfort *et al.*, 1999). Además los ensayos fluorimétricos presentan buenas correlaciones tanto con métodos analíticos (HPLC) como con bioensayos (González *et al.*, 2002) lo cual también sucede con algunos colorimétricos.

Uno de los kits comerciales que ha tenido bastante utilización es el Toxiline DSP (ZEU Inmunotec). Este kit se basaba en un ensayo enzimático que emplea la fluorescencia como principio de detección. Inicialmente fue desarrollado y patentado por Botana *et al.* (1996) y posteriormente ZEU-Inmunotec lo estandarizó y comercializó. Su validación se realizó en colaboración con el CRLMB (Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas). El test es aplicable para equinodermos, tunicados, gasterópodos marinos y varias especies de bivalvos (mejillones, almejas, ostras o vieiras) tanto para la determinación del OA como de otras toxinas carboxílicas del grupo de las DSP. Presenta un límite de detección de 30 µg OA/kg hepatopáncreas y un límite de cuantificación de 85 µg OA/kg hepatopáncreas. Recientemente este test está siendo sustituido por otro colorimétrico, con límites de detección similares y que está siendo validado.

Por lo general los ensayos de inhibición enzimática son simples, económicos, sensibles, rápidos y selectivos y permiten detectar el OA, DTX1, DTX2 y presumiblemente

otros análogos de este grupo. En los casos de las DTX3, los diol-éster y la DTX4 la aplicación de este tipo de ensayos requiere un paso previo de hidrólisis (Mounfort and Suzuki, 2001).

Los **ensayos de citotoxicidad** permiten detectar cualitativa y cuantitativamente una respuesta tóxica de las células basada en la observación al microscopio, o por otros métodos, de los cambios morfológicos y/o estructurales que sufren dichas células tras ser expuestas a la toxina.

Uno de los primeros ensayos de citotoxicidad desarrollados se basó en la observación microscópica de los cambios morfológicos que sufrían hepatocitos de rata que habían sido expuestos a extractos de toxinas DSP y a OA purificado (Aune *et al.*, 1991). Posteriormente Amzil *et al.* (1992), obtuvieron una buena correlación entre los resultados del ensayo celular y de la cuantificación del OA por HPLC. Por su parte en un ensayo realizado por Fessard *et al.* (1994), y que posteriormente fue completado por Diogène *et al.* (1995), se encontró un nuevo cambio morfológico como consecuencia de exponer extractos de fibroblastos a la toxina OA. Tubaro *et al.* (1996b) desarrollaron un ensayo de citotoxicidad para la cuantificación del OA en mejillones, basado en la utilización de células KB (carcinoma epidérmico humano). Recientemente, Cañete *et al.* (2010) llevaron a cabo un estudio comparativo entre un ensayo celular con células NG108-15 (límite de detección de 47 µg equivalentes OA/kg) y un ensayo de inhibición de fosfatasas (límite de detección de 45 µg equivalentes OA/kg) y encontraron que ambos ensayos son perfectamente válidos para la detección de OA en mejillones naturales y además, que los resultados obtenidos son bastante similares respecto a los de LC-MS/MS.

En general se puede decir que el ensayo de citotoxicidad es un método cualitativo, en el que los cambios que se producen no dependen linealmente de la dosis administrada, y que permite distinguir entre el OA, la DTX1, las YTXs y la PTX1, ya que cada una de ellas induce cambios en la forma de las células o la aparición de irregularidades en la superficie de las mismas. Además este tipo de ensayos, que resultan esenciales para elucidar el mecanismo de acción de las toxinas, son altamente sensibles, relativamente sencillos y permiten aumentar el número de muestras examinadas. No obstante esta técnica presenta ciertas dificultades a la hora de replicar los resultados entre distintos laboratorios.

4.6.2.2. Ensayos estructurales (inmunoensayos)

A lo largo de los años se han ido desarrollando diferentes tipos de inmunoensayos para la detección del OA y las DTXs, basados en la medición de la interacción que se produce entre anticuerpos y toxinas específicas y que no tienen por qué relacionarse necesariamente con la actividad biológica de la toxina.

El método **RIA** (“Radioinmunoassay”) desarrollado para el OA por Levine *et al.* (1988), mide la inhibición resultante de la competencia que se produce por el anticuerpo entre el OA de las muestras y OA tritiado. Es un método sensible con un límite de detección de 0.2 pg OA mL⁻¹, pero su complejidad y uso de componentes radiactivos lo limitan sustancialmente para su aplicación rutinaria en laboratorios de control.

También se han desarrollado varios métodos **ELISA** (“enzyme-linked immunosorbent assay”) en forma de kits para la detección de toxinas DSP entre los que se encuentran el “DSP Rapid kit” (Sceti, Tokio, Japón) y el “Okadaic acid kit” de Rougier Bio-Tech (Montreal). El “DSP Rapid kit” se basa en el uso de anticuerpos monoclonales desarrollados por Usagawa *et al.* (1989). El ensayo es muy rápido y sencillo y tiene el límite de detección en aproximadamente 20 ng OA g⁻¹. Los anticuerpos muestran una reactividad cruzada del 70% con DTX1 (Usagawa *et al.*, 1989), del 40% con DTX2 (Carmody *et al.*, 1995) y no reaccionan con las DTX3, que tendrían que ser hidrolizadas para obtener, al menos, resultados cualitativos. El “Okadaic acid kit” se basa en el uso de anticuerpos monoclonales contra el OA y un anticuerpo anti-idiotipyc (Shewstowsky *et al.*, 1992), vinculado a la fase sólida que compete con el OA de las muestras por el sitio de unión al anticuerpo. La sensibilidad del anticuerpo para DTX1 y DTX2 es considerablemente más baja que la exhibida para el OA, y las DTX3 no se detectan. Sin embargo ciertos derivados como diol-éster, DTX4 y DTX5 presentan afinidades similares a las del OA (Lawrence *et al.*, 1998).

En general los inmunoensayos son métodos sensibles, rápidos y con buen rendimiento. Sin embargo la reactividad cruzada de los anticuerpos está limitada a componentes con sitios específicos compatibles, por lo que puede que o bien no se detecten

todos los análogos (falsos negativos), o que los que se detecten no sean tóxicos (falsos positivos).

4.6.3. Métodos químicos

Permiten realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de las toxinas individuales. Miden una respuesta instrumental que es proporcional a la cantidad de toxina presente en la muestra. Requiere una calibración previa del equipo así como el uso de estándares de cada una de las toxinas.

4.6.3.1. Cromatografía líquida con detector de fluorescencia (HPLC-FD)

Dentro de los métodos químicos, la HPLC-FD ha sido ampliamente utilizada en todo el mundo para la detección de las toxinas lipofílicas. Ninguna de las toxinas pertenecientes al grupo de las DSP posee grupos que al ser excitados a una determinada longitud de onda absorban luz de una longitud de onda característica (cromóforos), o que tengan fluorescencia (fluoróforos). Debido a esto, para poder emplear las técnicas de HPLC-FD en la identificación y cuantificación de estas toxinas, es necesario introducir un paso previo a la cromatografía consistente en una derivatización química precolumna en la que los extractos tóxicos reaccionan con reactivos fluorescentes. Mediante esta técnica química se forman toda una serie de productos que posteriormente son separados en la columna cromatográfica y detectados como derivados fluorescentes de las toxinas. En el caso del OA y las DTXs, los fluoróforos más frecuentes reaccionan con el grupo carboxilo de la molécula. Uno de estos reactivos es el 9-anthryldiazomethane (ADAM) (Lee *et al.*, 1987) (Figura 3), ampliamente utilizado debido a su elevada selectividad y sensibilidad.

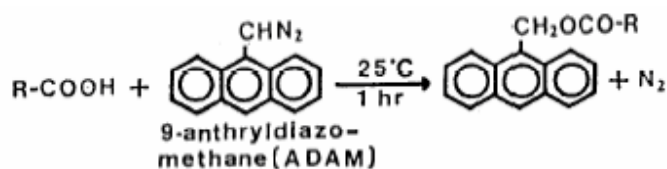


Figura 3. Marcaje fluorescente del grupo carboxilo del OA y DTX con ADAM (Lee *et al.*, 1987)

Para eliminar las posibles interferencias que pueden generar la presencia de los compuestos fluorescentes, se suele realizar un paso previo de limpieza de muestras mediante cartuchos de extracción en fase sólida (SPE). El límite de cuantificación de esta técnica es de $100 \mu\text{g}$ de OA kg^{-1} de glándula digestiva (EFSA, 2008). Las DTX3, diol-ésteres, DTX4 y DTX5 no pueden ser identificadas directamente mediante este método, por lo que es necesario para su identificación un paso previo de hidrólisis alcalina (Yasumoto *et al.*, 1989; Fernández *et al.*, 1996).

Dentro de los principales inconvenientes de esta técnica destacan la escasa estabilidad del reactivo ADAM y la posibilidad de pérdida de toxinas durante el paso de lavado en columnas de sílice. El procedimiento con ADAM ha sido objeto de numerosas modificaciones con el fin de mejorarlo (Quilliam, 1995; Quilliam *et al.*, 1998). Además se han investigado otros reactivos como posibles sustitutos del ADAM, como el 1-bromoacetylpyrene (BAP) (Dickey *et al.*, 1993), la cumarina, un derivado de un fenilpropanoide (Shen *et al.*, 1991; Luckas, 1992; Marr *et al.*, 1994), el 2-(anthracene-2,3-dicarboximido) ethyl trifluoromethanesulfonate (AE-OTf) (Akasaka *et al.*, 1996) o el luminarin-3 (James *et al.*, 1998).

4.6.3.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

El desarrollo y la aplicación de la técnica de LC-MS en los últimos años para el análisis de toxinas marinas así como el desarrollo de métodos capaces de identificar numerosas toxinas a la vez, han supuesto uno de los mayores avances en su campo, y han convertido a esta técnica, en la herramienta actual más poderosa para la identificación y determinación de múltiples toxinas. Es un método específico, sensible y selectivo, que es capaz de aportar información sobre la estructura de las toxinas facilitando su confirmación y la identificación de nuevas toxinas y análogos. Al igual que otros métodos químicos necesita patrones para la calibración, desarrollo del método y cuantificación, pero en ocasiones es posible obtener información de la presencia de un análogo de una toxina de estructura conocida a partir del patrón de la toxina más relevante del grupo.

Existen numerosos tipos de espectrómetros de masas (trampas iónicas, cuadrupolos simples, triples cuadrupolos, tiempo de vuelo...) que difieren principalmente en la sensibilidad e información que aportan.

A lo largo de los años se han ido desarrollando numerosos métodos tanto para la detección de OA, DTX1 y DTX2 (Pleasant *et al.*, 1990; Quilliam, 1995; Draisci *et al.*, 1998; Suzuki and Yasumoto, 2000; Gerssen *et al.*, 2009b) como de DTX3 y diol-ésteres de OA y DTX1 (Hu *et al.*, 1992b; Marr *et al.*, 1992; Vale and Sampayo, 1999; Suzuki *et al.*, 2004; Vale, 2006a; Torgersen *et al.*, 2008a,b; Gerssen *et al.*, 2009b). Dichos métodos difieren unos de otros básicamente en la fase móvil, tipo de tampón, pH, fuerza iónica, fase estacionaria y modo electrospray (positivo o negativo) empleado.

Uno de los grandes problemas de estas técnicas, además del elevado coste de los equipos, se deriva de la presencia de efectos derivados de la matriz biológica de las muestras que, en ocasiones, conlleva cuantificaciones erróneas. La supresión parcial o total de la ionización o el aumento de su eficiencia debido a la coelución de sustancias puede provocar variaciones en las respuestas y dificultar las cuantificaciones mediante el uso de soluciones estándar puras, por lo que Ito *et al.* (2001), sugieren el uso de métodos de adición estándar para la cuantificación de toxinas DSP mediante LC-MS. También han sido propuestas como medidas para eliminar los posibles efectos matriz, la inclusión de

pasos de limpieza mediante cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) previos al análisis en LC-MS (Ofuji *et al.*, 1999; Suzuki and Yasumoto, 2000; Gerssen *et al.*, 2009a).

Actualmente el LC-MS está siendo usado como método de rutina para la cuantificación de toxinas DSP y PTX en Nueva Zelanda para controlar la recogida de moluscos comerciales (McNabb and Holland, 2003) y hasta ahora, como complemento al bioensayo en ratón en programas de control (Hess *et al.*, 2003). Sin embargo acaba de aprobarse un nuevo reglamento (Comisión Europea, 2011) por el que se modifica uno anterior (Comisión Europea, 2005) en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos. En él se determina como nuevo método de referencia para la detección de toxinas lipofílicas el LC-MS/MS, si bien se establece un período de adaptación hasta el 31 de diciembre del 2014 durante el que el bioensayo en ratón también podrá ser utilizado, a fin de permitir que los Estados miembros adapten sus métodos al citado LC-MS/MS.

4.6.3.3. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar es un método cuantitativo que presenta una alta resolución en la separación y requiere muestras de pequeño tamaño. Han sido desarrollados algunos métodos (Gago-Martínez, 2003a; Gago-Martínez *et al.*, 2003b).

5. MITIGACIÓN DE LOS EPISODIOS TÓXICOS

El tratar de diseñar estrategias que permitan eliminar o al menos disminuir en parte, los efectos negativos que conlleva la aparición de episodios tóxicos resulta de indudable interés práctico. En los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias para tratar de mitigar las incidencias de los episodios tóxicos centrándose en los 3 agentes fundamentales involucrados en el proceso: el fitoplancton, los moluscos bivalvos y el hombre. Fundamentalmente son 3 las vías sobre las que se puede actuar: reducción de la disponibilidad de toxina, eliminación de toxinas de los organismos y selección genética de los organismos cultivados.

5.1.- Reducción de la disponibilidad de toxina

La exposición de los moluscos bivalvos al fitoplancton tóxico productor de toxinas DSP puede disminuirse, al menos en parte, o bien reduciendo la biomasa algal disponible o bien variando la localización de la población de bivalvos

Hasta el momento se han probado toda una serie de luchas físicas, químicas y biológicas para reducir la biomasa de las poblaciones tóxicas pero sin gran éxito en general (revisado en Blanco-Pérez, 2001). La única técnica que se ha desarrollado con éxito frente a la proliferación del fitoplancton nocivo se empleó en Corea para combatir toda una serie de episodios causados por el dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides* (Kim, 1998). Este método consiste en dispersar arcillas en el agua que al sedimentar, arrastran una buena parte de las células nocivas. Años más tarde se trató de romper las células mediante el uso de ultrasonidos (Thomas and Gerritsen, 2000) pero debido a las consecuencias negativas que pueden suponer la liberación de determinadas sustancias contenidas en las células al agua, se descartó para su uso a gran escala. A nivel de acción química se probó también la posibilidad de tratar a la especie *Gymnodinium breve* con una sustancia producida por una cianofícea y denominada aponina que induce la lisis celular (Steidinger, 1993). El método resultó ser efectivo contra la floración, pero al igual que en el caso de los ultrasonidos, la liberación de toxinas al agua podía producir efectos incluso más adversos que en la propia microalga, por lo que la técnica fue rechazada. El empleo de electrolisis del agua de mar como fuente de cloro activo para destruir las células tóxicas también ha sido sugerido (Kim *et al.*, 2000). No obstante, tanto este último método como el de ultrasonidos son del todo inespecíficos y pueden afectar a las poblaciones de plancton que sucedan a las que se destruyen de manera completamente impredecible. También han sido probadas a nivel experimental numerosas vías de acción biológica basadas en el uso de virus (Nagasaki and Yamaguchi, 1997; 1998a,b), bacterias (Yoshinaga *et al.*, 1997; Gentien, 1998; Doucette *et al.*, 1999), hongos (Mountfort *et al.*, 1996) y protozoos (revisados en Elbrächter and Schnepf, 1998) que fueran capaces de matar las células tóxicas, pero estas vías nunca han sido probadas en situaciones reales.

La segunda posible vía de actuación consiste en la reubicación de las poblaciones en lugares o a profundidades donde las concentraciones de las poblaciones nocivas sean menores (Haamer *et al.*, 1990; Desbiens and Cembella, 1993).

5.2. Eliminación de toxinas de los organismos

Otra forma de tratar de mitigar las consecuencias de los episodios tóxicos pasa por actuar sobre los propios moluscos bivalvos una vez que ya han adquirido la toxicidad, diseñando tratamientos que permitan la eliminación de los tóxicos, bien sea *in vivo* o mediante procesado industrial.

A lo largo de los últimos años se han hecho numerosos intentos de diseñar estrategias que permitan acelerar la depuración de organismos marinos contaminados con DSP. Entre ellas una de las más claras consiste en transferir los bivalvos a otras aguas libres de organismos tóxicos y con condiciones ambientales favorables para el proceso depurativo (Desbiens and Cembella, 1993; Lodeiros *et al.*, 1998). Desafortunadamente, un efecto muy reducido de las condiciones ambientales sobre la tasas de depuración de toxinas DSP y PSP en *Mytilus galloprovincialis* (Blanco *et al.*, 1999), sugiere que la translocación de las poblaciones es una herramienta más útil para prevenir la re intoxicación que para incrementar la propia tasa de depuración. Aunque se ha tratado de acelerar la depuración de toxinas PSP en diversos organismos y con diversos compuestos (revisado en Fernández *et al.*, 2003a), han sido pocos los intentos realizados para las toxinas DSP. De entre ellos cabe destacar, un tratamiento con ozono (Crocì *et al.*, 1994), variaciones de temperatura o salinidad (Blanco *et al.*, 1999) y la edad o el tamaño de los bivalvos (Duinker *et al.*, 2007), pero ninguno de ellos parece tener influencia sobre las tasas de eliminación de estas toxinas. Por su parte la disponibilidad de alimento sí parece tener un ligero efecto positivo sobre la depuración (Sampayo *et al.*, 1990; Blanco *et al.*, 1999) aumentando su tasa aparente en condiciones de ayuno (Svensson, 2003).

Cuando los organismos no van a ser vendidos o consumidos vivos, se pueden emplear algunos procesos industriales con el fin de eliminar o al menos reducir, la cantidad de toxina que contengan (revisado en Reboreda *et al.*, 2010). El procesado industrial más

sencillo es el que se basa en la eliminación de las partes del organismo que acumulan mayor cantidad de toxina. La acumulación de las toxinas es muy diferente en los distintos órganos y tejidos de los bivalvos (Cembella *et al.*, 1993; Bricelj and Cembella, 1995; Arévalo *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2007b) con lo que la posibilidad de reducir la toxicidad de los individuos por eliminación de las partes más tóxicas (evisceración) es viable. Sin embargo este proceso ha de emplearse con cautela, dado que el mecanismo de acumulación diferencial en los distintos órganos y tejidos es dinámico, con lo que no es posible asignar un porcentaje de toxicidad determinado a un órgano o tejido sino que éste depende del estado de intoxicación/ desintoxicación en el que se encuentre el bivalvo en ese momento. En el caso de la vieira *Pecten maximus*, la evisceración es el método más empleado para poder explotar las poblaciones evitando intoxicaciones de tipo ASP. También existen otros métodos de procesamiento industrial que han resultado tener bastante éxito, especialmente para PSP y ASP. En este sentido se ha visto que las concentraciones de toxinas PSP se reducen en diversos moluscos cuando se enlatan o autoclavan en medio básico (Berenguer *et al.*, 1993; Vieites *et al.*, 1999) o cuando se someten a un tratamiento térmico (Nagashima *et al.*, 1991; Indrasena and Gill, 1999). El efecto de la congelación para la eliminación de PSP depende, en gran medida, de la matriz empleada (Reboreda *et al.*, 2010). La congelación (Leira *et al.*, 1998), el cocinado (Vidal *et al.*, 2009) y, como ya se citó anteriormente, la evisceración, han resultado ser métodos bastante eficaces para la reducción de toxicidad de tipo ASP. Ninguna de estas técnicas parece ser efectiva para la eliminación de las DSP pero hace unos años, se desarrolló un método bastante eficaz para eliminar dicha toxicidad de los bivalvos mediante el uso de fluidos supercríticos (González *et al.*, 2002) . Esta técnica permite reducir notablemente la toxicidad de los bivalvos pero requiere una deshidratación inicial del producto con lo que únicamente es aplicable sobre aquellos productos que requieran, o al menos toleren bien, dicho tratamiento.

5.3. Selección genética de los moluscos cultivados

Actualmente está siendo objeto de estudio una tercera vía que consiste en seleccionar genéticamente los moluscos cultivados que tengan una menor capacidad de acumulación de toxinas. Mediante esta vía, en caso de resultar efectiva, se podrá disminuir,

al menos en parte, la incidencia de los episodios tóxicos. Dicha estrategia se basa en seleccionar, mediante técnicas de mejora genética, un conjunto de reproductores con menor capacidad de captación y/o retención de las toxinas que la media de la población actual.

5.4. Importancia de los mecanismos de acumulación

La aparición de episodios tóxicos suele traer consigo graves repercusiones económicas y sociales que ocasionan importantes pérdidas económicas en el sector pesquero y afines. Como ya se citó en el apartado anterior, la mayor parte de las estrategias para eliminar, o al menos mitigar, las consecuencias de estos procesos, pasan, además de por realizar controles estrictos de la presencia de las toxinas, por conseguir que los bivalvos acumulen menos cantidad de toxina o que la eliminen más rápidamente. Para ello, y en vista del poco éxito de las técnicas simples empleadas hasta ahora, es indispensable conocer las bases de los procesos de incorporación, retención y eliminación de las toxinas en los bivalvos. La información que se posee actualmente respecto a todo esto todavía es insuficiente porque, aunque se han realizado varios estudios tratando de determinar los factores que regulan los la acumulación (ver apartado 5.2.), han sido muchos menos los enfocados a los mecanismos implicados en dichos procesos (Svensson and Forlin, 2004). Comprender los mecanismos de retención de las toxinas a cualquier nivel (órgano-celular-molecular), sus posibles transformaciones intracelulares y sus principales mecanismos de eliminación, abriría toda una serie de posibilidades diferentes para tratar de diseñar mecanismos efectivos de reducción de la acumulación que permitieran minimizar, al menos en parte, las consecuencias negativas de los episodios tóxicos.

Actualmente apenas existe información acerca de dichos mecanismos de acumulación de toxinas en moluscos bivalvos. Lo esperable inicialmente es que las toxinas, independientemente de su forma de entrada en la célula y debido a que no son constituyentes celulares, en caso de que no se eliminen directamente, sufran biotransformaciones similares a las de los xenobióticos, convirtiéndose en conjugados polares que serían más fácilmente excretados. Existe también la posibilidad de que la vía de eliminación sea la opuesta, a través de la formación de compuestos más hidrofóbicos en

lugar de más hidrófilos, como los que están implicados en el metabolismo de esteroides en ostra (Janer *et al.*, 2004) o del estradiol en mejillones (Janer *et al.*, 2005; Labadie *et al.*, 2007). Algunos compuestos (ésteres con ácidos grasos) de los que serían producidos, en caso de que esta última vía fuese utilizada, están presentes en los bivalvos (Marr *et al.*, 1992; Vale and Sampayo, 1999; Suzuki *et al.*, 2004; Vale, 2006a; Torgersen *et al.*, 2008b; Gerssen *et al.*, 2009b).

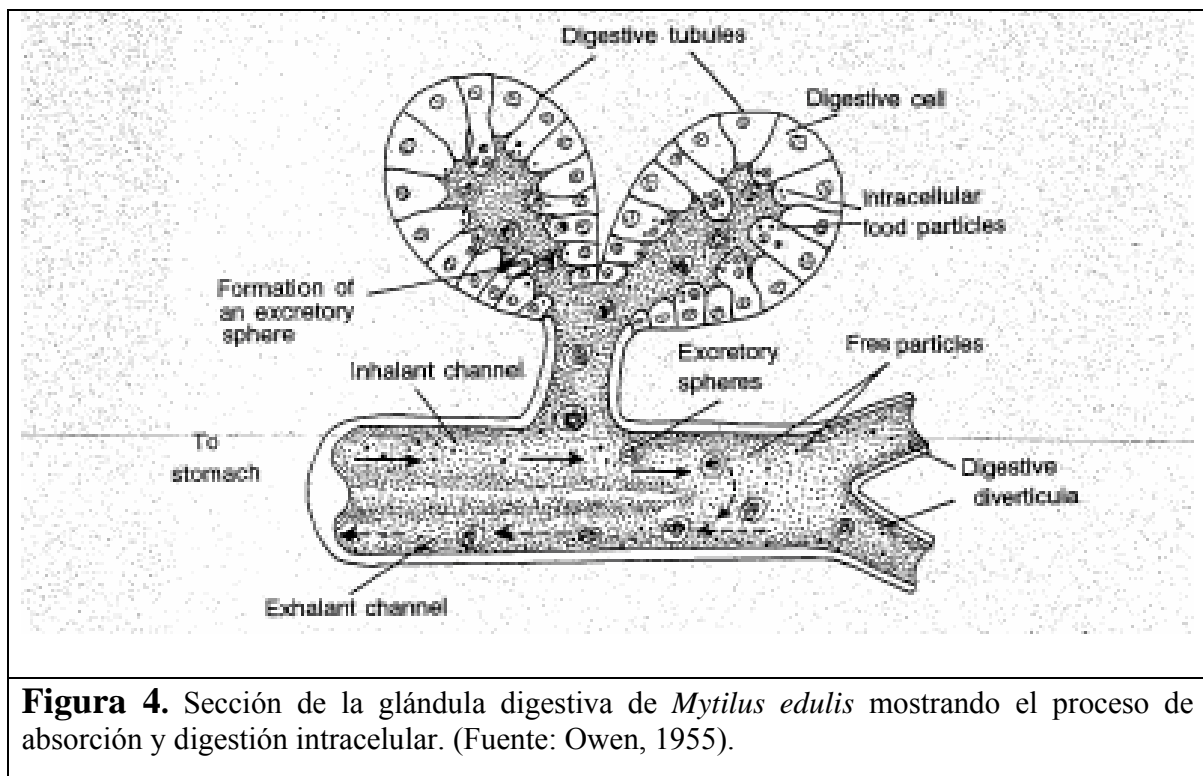
5.5. Fisiología digestiva de los moluscos bivalvos

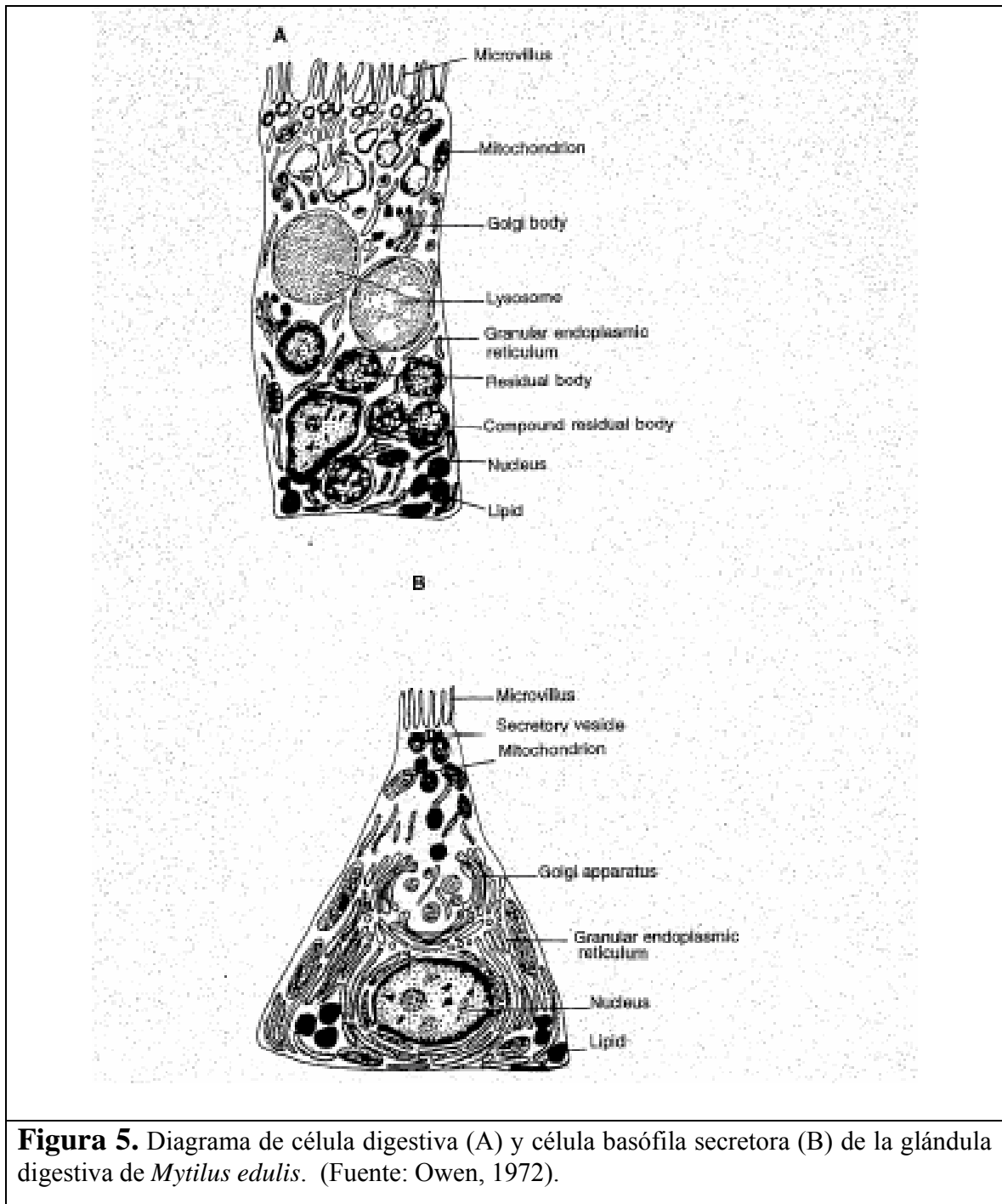
Los moluscos bivalvos se alimentan mediante filtración captando las partículas en suspensión (seston) del medio. Al estar esta tesis centrada en el mejillón y ser la fisiología de la nutrición del género *Mytilus* la más estudiada, en él se centrará esta descripción.

Las partículas en suspensión son retenidas por las branquias y transportadas hacia los palpos que rodean la boca. Cuando la cantidad de material en suspensión supera la capacidad digestiva del mejillón, este la expulsa como pseudoheces antes de entrar en la boca, por lo que no sufren el proceso digestivo (Widdows *et al.*, 1979). El alimento ingerido llega, a través del esófago, al estómago donde sufre los procesos de ruptura, selección y una parte de la digestión extracelular. En el estómago se encuentra el estilo cristalino, que al girar por acción de los cilios que presenta el saco del estilo que lo contiene, choca contra el escudo gástrico y libera enzimas digestivas. Así el alimento que llega sufre procesos de ruptura mecánica y es digerido extracelularmente. Una vez rotas y disgregadas las partículas alimenticias, se dirigen, en función de su tamaño, o bien a los divertículos de la glándula digestiva (las más pequeñas y menos densas) o bien al intestino medio directamente (las más grandes y pequeñas muy densas) desechándose directamente como heces o volviendo a la circulación en torno al estilo para ser más procesadas.

La glándula digestiva, que es el principal órgano en el que el mejillón acumula las toxinas de tipo DSP (Blanco *et al.*, 2007b), está formado por un conjunto de pequeños túbulos de unión (zona tubular) sin salida terminados en un acino digestivo (zona acinar), que conectan con el estómago a través de varios conductos ciliados (Figura 4). Los túbulos digestivos están compuestos por dos tipos celulares principalmente (Morton, 1983), las

células digestivas y las células secretoras (Weinstein, 1995). Las células digestivas (Figura 5A) son los tipos celulares más grandes y más abundantes. Se caracterizan por ser largos, con forma de columna, ricos en lisosomas, con la superficie de la célula tapizada con abundantes microvilli, su citoplasma presenta numerosas vesículas citoplasmáticas y entre sus funciones están las de digestión intracelular, detoxificación, biotransformación de xenobióticos y defensa antioxidante (Gosling, 2003). Las células secretoras (Figura 5B) son de menor tamaño y menos abundantes. Tienen forma piramidal, presentan, al igual que las células digestivas, microvilli en su superficie libre, su citoplasma presenta abundante retículo endoplasmático rugoso y cuerpos de Golgi. Su principal función es la de dar lugar a células digestivas ricas en lisosomas (Yonge, 1926), pero parecen tener, además, una función secretora (Owen, 1970; Morton, 1983; Henry *et al.*, 1991).





La cantidad de alimento que el estómago y los divertículos digestivos pueden procesar en un tiempo dado es limitado. Cuando se supera dicho límite, el material en exceso no entra en los divertículos digestivos y pasa directamente al intestino. Existe

además como ya se comentó, una selección postingestiva mediante la cual en el lumen digestivo, algunas partículas se derivan directamente al intestino y otras a los divertículos. Estos procesos son los responsables de que aparezcan dos componentes en las heces: uno intestinal con alimento poco digerido y a menudo incluso con células fitoplanctónicas vivas, y otro componente glandular compuesto por el material bien digerido que procede de los túbulos digestivos (Widdows *et al.*, 1979).

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es determinar las bases fisiológicas del proceso de acumulación de toxinas DSP en los moluscos bivalvos. El mejor entendimiento de este proceso contribuirá al desarrollo de métodos que permitan, bien mediante reducción de la incorporación o bien mediante la aceleración de la depuración, disminuir en general la acumulación de toxinas en los bivalvos. El poder disponer de estos métodos supondría así mismo una reducción, tanto en el riesgo que conlleva para la salud pública el consumo de marisco contaminado, como en el tiempo en el que la explotación permanecería prohibida.

El objetivo principal se puede subdividir en los siguientes **objetivos específicos**, en los cuales se utiliza el mejillón *Mytilus galloprovincialis* como organismo modelo:

- 1.- Conocer cuáles son los principales mecanismos de entrada del ácido okadaico en las células de la glándula digestiva.

- 2.- Conocer si existe compartimentalización de las toxinas DSP a nivel de la glándula digestiva (en los diferentes tipos celulares) y a nivel subcelular (en los diferentes orgánulos).

- 3.- Determinar si las toxinas DSP son secuestradas por medio de ligamiento a algún componente celular.

- 4.- Determinar si las toxinas DSP son degradadas y transformadas en el interior de las células o excretadas directamente.

- 5.- Establecer las principales vías de excreción así como sus mecanismos asociados.

DESARROLLO DE LA TESIS

CAPÍTULO 1

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA
ABSORCIÓN DEL ÁCIDO
OKADAICO POR LAS CÉLULAS DE
LA GLÁNDULA DIGESTIVA DEL
MEJILLÓN *MYTILUS*
GALLOPROVINCIALIS
(LAMARCK, 1819)**

Introducción

El transporte de moléculas a través de las membranas celulares puede ser de varios tipos. Por un lado existe el transporte por difusión a través del cual las moléculas fluyen a favor del gradiente de concentración y sin consumo de energía. La difusión puede ser pasiva o simple o puede ser facilitada, si requiere la ayuda de transportadores proteicos. Por otro lado existe el denominado transporte activo a través del cual, las moléculas fluyen, incluso en contra de un gradiente de concentración, lo que implica un gasto energético. Además existe un tercer mecanismo, la endocitosis, proceso por el que la célula introduce moléculas grandes o partículas a través de su membrana. Cuando la endocitosis da lugar a la captura de partículas se denomina fagocitosis, y cuando son solamente porciones de líquido las capturadas, se denomina pinocitosis.

El mecanismo de transporte que pueden utilizar las moléculas para atravesar las membranas celulares depende, en gran medida, de sus características químicas y estructurales.

El ácido okadaico (OA) presenta una estructura de poliéter constituida por una cadena carbonada lineal con un grupo carboxilo libre. Además, es un compuesto lipofílico, con una alta solubilidad en algunos solventes orgánicos (metanol, cloroformo, acetona), aunque parcialmente soluble en agua y con un peso molecular de 804.5 Da.

Hasta la fecha se han propuesto varios modelos de absorción celular para contaminantes lipofílicos. El primero de ellos, de Moore and Willows (1998), es un modelo que podría ser aplicable a microcontaminantes ligados a partículas en general y con un elevado coeficiente de partición octanol-agua ($\log P \geq 4$) (Smedes, 1994). En él, los contaminantes son absorbidos en asociación con el material particulado formando una especie de complejo de unión. La internalización del complejo en la célula se produce bien por fagocitosis o bien por endocitosis dependiendo del tamaño de las partículas. Los complejos son absorbidos por las células por medio de vesículas generadas en la membrana y al final incluidos en los lisosomas. Los otros dos modelos propuestos (Nam *et al.*, 1990; Daranas *et al.*, 2007) se basan en mecanismos de difusión a través de la membrana. La difusión directa del OA a través de las membranas

celulares es bastante improbable al tratarse de una molécula ionizada, pero su entrada mediante este mecanismo indirectamente en forma de dímeros asociados a moléculas de potasio (Daranas *et al.*, 2007) o mediante la formación de agregados de la toxina cuando se disuelve en tampones biológicos (Nam *et al.*, 1990) conllevan que este tipo de transporte no pueda ser descartado.

El trabajo que se describe en el capítulo 1 tiene por objetivo determinar cuál o cuáles son los mecanismos reales que tiene el OA para acceder a las células de la glándula digestiva, principal órgano en el que se acumula (Blanco *et al.*, 2007b) (**Objetivo 1**). El conocimiento de estos mecanismos contribuirá además a comprender mejor cuales pueden ser las principales rutas metabólicas que sigue esta toxina para ser depurada por los bivalvos.

En primer lugar y con el fin de poder llevar a cabo los estudios *in vitro*, se desarrolló un cultivo de células de glándula digestiva de mejillón sobre el que se llevaron a cabo los ensayos posteriores. A continuación se realizó una comparativa entre la capacidad de absorción por parte de las células de la toxina disuelta en agua y en emulsión de aceite, con el fin de determinar si se trataba de un mecanismo de difusión o de endocitosis. Una vez confirmado el primero de ellos, se realizó un diseño factorial en el que se estudió la posible influencia de 3 factores que, *a priori*, podrían ser relevantes en el proceso de difusión.

ARTÍCULO 1

Rossignoli, A.E., Fernández, D., Regueiro, J., Martín, H., Mariño, C., Blanco, J., en revisión. Okadaic acid uptake by digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Enviado a Aquatic Toxicology.

Manuscript Number: AQTOX-D-11-00081

Title: OKADAIC ACID UPTAKE BY DIGESTIVE GLAND CELLS OF THE MUSSEL MYTILUS GALLOPROVINCIALIS

Article Type: Original Research Paper

Keywords: Diffusion; digestive cells; absorption; okadaic acid; transport; endocytosis, okadaic acid; uptake

Corresponding Author: Dr. Juan Blanco,

Corresponding Author's Institution: Centro de Investigacions Marinas

First Author: Araceli E Rossignoli

Order of Authors: Araceli E Rossignoli; David Fernandez; Jorge Regueiro; Helena Martín; Carmen Mariño; Juan Blanco

Abstract: Okadaic acid (OA) and other toxins of the diarrhoeic shellfish poisoning (DSP) group are accumulated and transformed mainly inside the digestive gland cells of the mussels *Mytilus galloprovincialis*. In this work the absorption of okadaic acid by the those cells has been studied by supplying the toxin dissolved in water and included into oil droplets to primary cell cultures, in a series of experiments. Okadaic acid was found to be absorbed preferentially from the dissolved phase, being the uptake from oil droplets substantially lower. This fact suggests that diffusion was the main way of entrance of OA into the cells. ATP did not have any significant effect on the OA absorption indicating that the process is not an active transport. The absorption was relatively lower when the OA concentration in the incubation medium increased, suggesting that a facilitated transport could be involved. Notwithstanding, the possibility of absorption of OA in form as dimers or aggregates, that could be absorbed by simple diffusion, makes impossible the unequivocal identification of the uptake mechanism.

1. Introduction

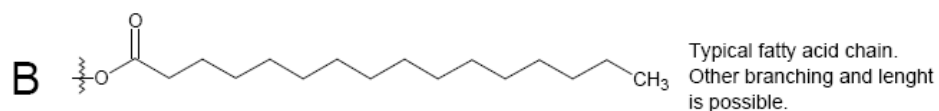
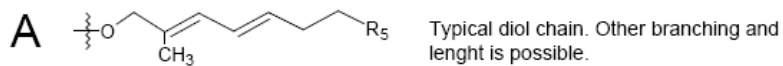
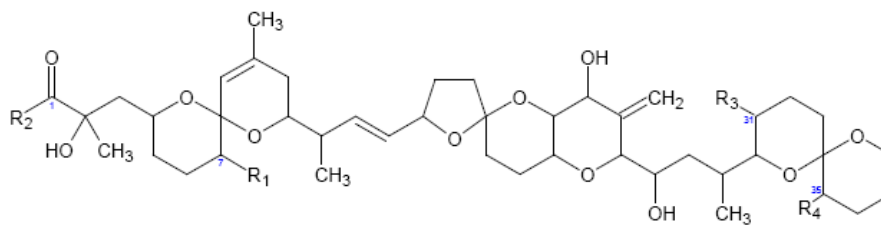
Diarrheic shellfish poisoning is a severe gastrointestinal illness caused by consumption of seafood contaminated by feeding on toxigenic dinoflagellates such as some species of the genus *Dinophysis* (Yasumoto *et al.*, 1980; Kat, 1983; Lassus *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1989; Edler and Hageltorn, 1990; Reguera *et al.*, 1990; Della Loggia *et al.*, 1993; Giacobbe *et al.*, 2000) and *Prorocentrum* (Quilliam *et al.*, 1996; Koike *et al.*, 1998; Lawrence *et al.*, 1998; Bauder *et al.*, 2001; Gayoso *et al.*, 2002; Heredia-Tapia *et al.*, 2002). The main toxins responsible for DSP are the lipophilic polyether compounds okadaic acid (OA), its isomer dinophysistoxin-2 (DTX2), its analog dinophysistoxin-1 (DTX1) (Yasumoto *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 1992) and several fatty acid esters of these three parent toxins (generically known as DTX3, Quilliam, 2003) (Figure 1.1). All these toxins are highly soluble in some organic solvents -such as methanol, acetone, chloroform or dichloromethane- but the free forms are also considerably soluble in water (MacKenzie *et al.* 2004).

DSP toxins are potent inhibitors of serine/threonine protein phosphatases, especially of PP2A, but also, to a lesser extent, of PP1B and PP2B (Cohen *et al.*, 1990; Mestrovic and Pavela Vrancic, 2003). They have been found to be potent tumor promoters (Fujiki *et al.*, 1988) and the possibility that they are also tumor inducers has been suggested (Ten-Hage *et al.*, 2000; Creppy *et al.*, 2002).

This group of toxins are accumulated almost entirely in the digestive gland of shellfish (Blanco *et al.*, 2007), which is the organ that absorbs most products of the extracellular digestion. Notwithstanding, the precise way by which they are absorbed by the cells of the digestive gland is not known yet. Two mechanisms seem to be possible: a) phagocytosis, that is a vesicular process that does not require toxins to pass through the cellular membrane; and b) diffusion through the membrane. The first mechanism has been suggested by Moore and Willows (1998) for highly lipophilic xenobiotics, and consists in phagocytosis of particles or lipid droplets to which lipophilic compounds with an octanol-water partition coefficient ($\log P \geq 4$) are likely associated (adsorbed or dissolved into them) (Smedes, 1994). Typically, the phagocytosed compounds are absorbed into the cells by

means of vesicles generated from the membrane (toxins do not need to pass through the membrane) and end included in lysosomes. The second probable mechanism, diffusion through the cell membrane, does not seem *a priori* a viable mechanism because the toxins are probably ionized in the digestive fluids, making difficult for them to pass through the cellular membrane. Nevertheless, the presence, in this group of toxins, of a large apolar portion of the molecule, and the already documented possibility of formation of dimers with potassium that are able to pass lipid bilayers (Daranas *et al.*, 2007), make diffusion a possible mechanism of absorption.

This study has been designed to determine the importance of each these two uptake mechanisms in digestive gland cells of the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). In order to do it, OA in dissolved and particulate form (lipidic droplets) was added to a culture of cells of mussel digestive gland. Furthermore, the effects of ATP, OA concentration and incubation time on the uptake of OA by digestive gland tissue were examined.



Free toxins (R₁=OH, R₂=OH)

Toxin	R ₃	R ₄
OA	CH ₃	H
DTX2	H	CH ₃
DTX1	CH ₃	CH ₃

Esters *

Group	R ₁	R ₂	R ₅
7-O-Acyl	B	OH	-
Diol	OH	A	OH
7-O-Acyl-Diol	B	A	OH
Diol-Acyl	OH	A	B

* All other radicals as in the free toxins

Figure 1.1. Structures of OA and related DSP toxins.

2. Material and methods

2.1. Biological material and chemicals

Mussels free of toxins were obtained from a culture raft from Galicia (Spain). They were maintained overnight in an aquarium with aerated seawater until the start of the experiment.

Purified water for analysis and preparation of culture medium was obtained from a MilliQ-gradient system fed with an Elix Advantage-10, both from Millipore. Acetonitrile and methanol of HPLC-grade were obtained from Rathburn and Labscan, respectively. Okadaic acid was obtained from Calbiochem (for additions) and from IMB-NRC, Canada (OA-1c certificate reference material). NaCl, KCl, EDTA, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O and ammonium hydroxide were supplied by Merck. HEPES (H3375-250G), gentamycin sulphate, L15 (Leibovitz) medium, ATP, albumin from bovine serum and trypan blue were obtained from Sigma-Aldrich and MgCl₂·6H₂O from Panreac.

2.2. Digestive gland dissociation

All procedures were carried out under sterile conditions within a laminar flow hood in a thermoregulated room (18°C ± 1°C).

Dissociation of 3 digestive glands (aprox. 0.5 g / mussel) was carried out according to the soft dissociation procedure of Birmelin *et al.* (1999). Mussels were dissected to obtain the digestive glands, the crystalline stylus was removed, the digestive glands placed in a beaker containing 50 mL CMFS buffer (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 12.5 mM KCl; pH 7.3, 1100 mOsm) supplemented with gentamycin (0.1%) and minced into small pieces (2 mm). The fragments of digestive gland were then transferred to a flask containing 250 mL CMFS buffer, including gentamycin (0.1%) and stirred gently for 2 h with a magnetic stirrer (300 rpm), taking aliquots of the cell suspension every 30 min and replacing the withdrawn suspension with fresh buffer. The obtained cell suspensions were filtered through a 100 µm sterile nylon mesh and the filtrate was centrifuged at 180 g for 10 min. The pelleted cells were resuspended in a slightly modified L15 culture medium (0.754g of Sigma-Aldrich L15 medium, 1.01g of NaCl, 0.027g of KCl, 0.03g of CaCl₂·2H₂O, 0.05g of

MgSO₄·7H₂O, 0.195g of MgCl₂·6H₂O; and 100 mL of Milli-Q-gradient water, with pH 7.3 and a osmotic pressure of 1100 mOsm). The medium was supplemented with 0.1% gentamycin sulphate (1mg·mL⁻¹) just before use. Cells were washed with that medium by centrifugation at 180 g for 5 min in order to remove CMFS buffer.

2.3. Primary cell cultures

Primary cell cultures were carried out according to Faucet *et al.* (2004). The pelleted cells from digestive gland were resuspended in culture medium (L15 modified medium) and counted using a Neubauer chamber. In order to adjust the cell density to approx. 4 x 10⁶ cells·mL⁻¹ the required volume of culture medium was added. The viability of the isolated cells was measured by dye exclusion using trypan blue. Finally 100 µL aliquots of the cell suspension (approx. 4 x 10⁶ cels·mL⁻¹) were distributed in a culture plate that was placed in an incubator at 18°C.

2.4. Experiment 1: Uptake of okadaic acid dissolved in water and oil

In order to test if the absorption of OA by the digestive gland cells is preferentially made from dissolved or particulate phase, 500 µL aliquots of cell culture were supplemented with either OA dissolved in water or in olive oil droplets. OA was added to a final concentration of 120, 600 and 2400 nM. The OA dissolved in oil droplets was prepared by dispersing olive oil containing OA in L15 medium (1:50, v/v) by sonication during 10 minutes. After the corresponding additions, cultures were incubated for 3 hours at 18°C. All tests were carried out by duplicate.

After incubation, the cells in each well were washed three times with fresh medium (centrifugation 180 g, 20 minutes), in order to remove the non-absorbed toxin. Finally the medium was removed by washing with water and the absorbed toxins were extracted by adding 100% methanol (final volume 250 µL) to the pellet (previously weighed) and sonication. The obtained extract was clarified by centrifugation at 48000 g for 20 min.

2.5. Experiment 2: Effect of toxin concentration, incubation time, and ATP

Once determined that OA was absorbed faster from the dissolved phase than from oil droplets, a factorial experiment was conducted in order to better characterize the transport of OA across the cell membrane. Both, dissociation of the digestive gland and cell culture were carried out as explained in sections 2.2 and 2.3. A factorial design with three factors –OA concentration, incubation time and ATP concentration– and central points was used in order to determine if the transport is saturable and if it is dependent on a source of energy (that would indicate that an active transport mechanism was involved). The lowest and highest levels for the factors were 1.2 and 6 μM for OA concentration, 0 and 4 mM for ATP and 1 and 4 hours for time (Figure 1.2). All treatments were carried out without replication with the exception of three central points. In such a design, each factor is estimated from 7 (4+3) independent observations. After completing the incubation, OA was extracted as in section 2.4.

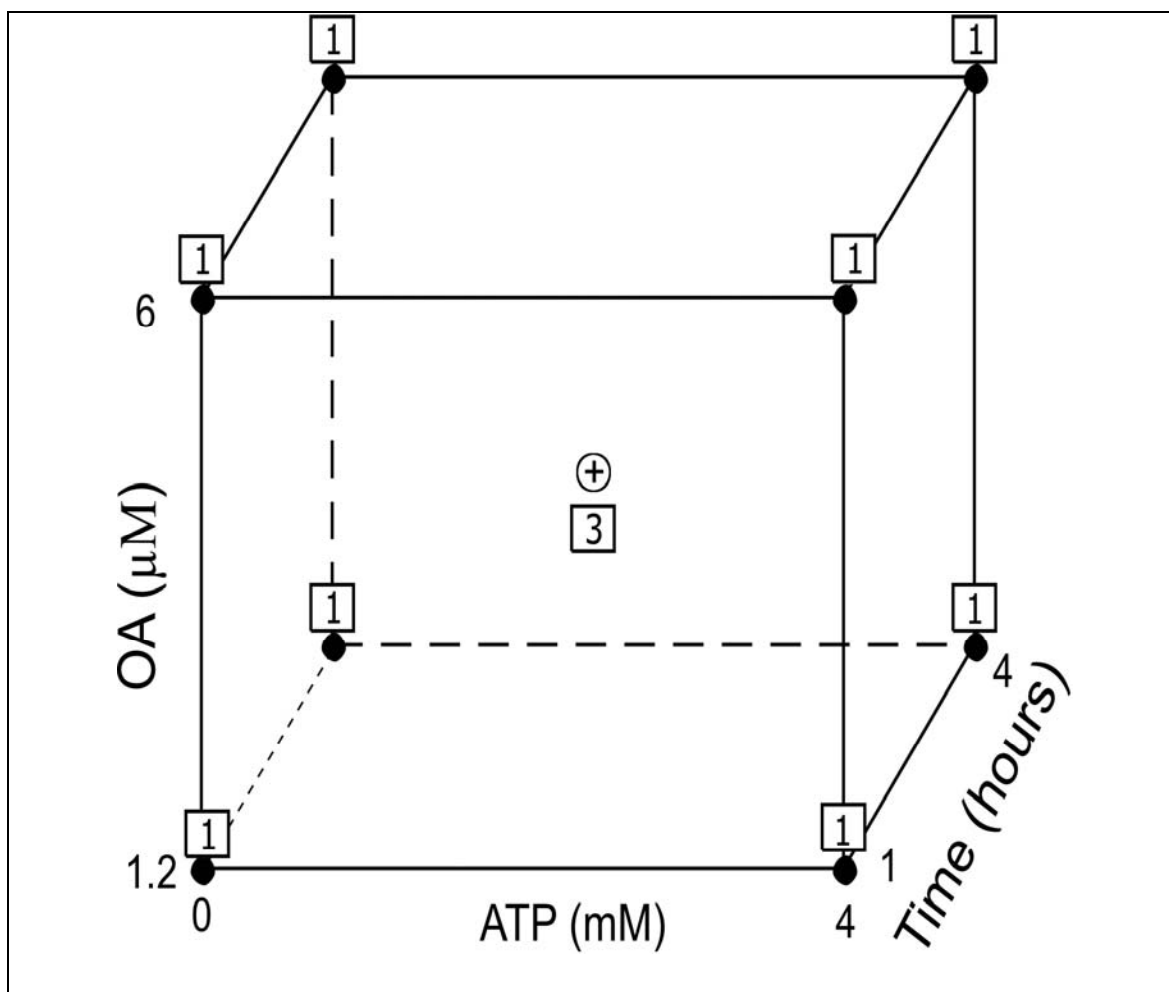


Figure 1.2. Factorial design, with three factors - OA concentration (μM), ATP concentration (mM) and time of incubation (hours) - for the study of cellular uptake of OA dissolved in water. Dots in the diagram represent the experimental runs. Numbers inside the small squares indicate the number of replicates of each design point.

2.6. Experiment 3: Effect of an emulsifier (albumin) on the uptake of okadaic acid dissolved in oil

A final experiment was conducted in order to test if the presence or absence of the albumin as an emulsifier had any effect on the absorption of OA by cells of the digestive gland of mussels. A new cell culture was obtained, as in sections 2.2 and 2.3, and four aliquots were obtained. OA was added to each aliquot in oil droplets to a final

concentration of 2340 nM. Additions to two out of the four aliquots were made with albumin as emulsifier (150 nM) and to the remaining ones without it. Samples were incubated for 3 hours at 18°C and OA was extracted as explained in section 2.4.

2.7. Toxin analysis

Okadaic acid was analyzed by LC/ESI-MS/MS using an Accela UHPLC system coupled to a triple quadrupole mass spectrometer TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a heated electrospray ionization source HESI-II.

Chromatographic conditions were adapted from those reported by Gerssen *et al.* (2009). Chromatographic separation was carried out in a reversed phase column Gemini-NX C18 (100 x 2.0 mm, 3 µm) from Phenomenex (Torrance, California, USA) maintained at 40 °C. Mobile phases A and B were, respectively, water and MeCN/water (90/10, v/v), both containing 6.7 mM NH₄OH (pH=11). The following linear gradient at a flow rate 400 µL min⁻¹ was used: start at 25%B, hold for 1 min, increase from 25%B to 95%B over 4 min, hold at 95%B for 3 min, return to initial conditions over 2 min and re-equilibrate for 2 min. The total run time was 12 minutes, including column re-equilibration. Injection volume was 5 µL.

The ion transfer tube temperature and the HESI-II vaporizer temperature were set at 360 °C and 110 °C, respectively. Nitrogen (>99.98%) was employed as sheath gas and auxiliary at 60 and 10 TSQ Quantum arbitrary gas pressure units, respectively. The mass spectrometer was operated in negative ionization mode with a spray voltage of 3500 V. Detection was carried out in the multiple reaction monitoring (MRM) mode using argon (>99.999%) as collision-induced-dissociation (CID) gas at a pressure of 1.5 mTorr. The transition 803.5>255.2 and 803.5>563.5 *m/z*, with a collision energies of 48 and 43 eV, were used for quantification and confirmation, respectively. Instrument control and data acquisition were performed with Xcalibur 2.1 software (Thermo Fisher Scientific).

Quantification was carried out by external calibration using certified reference solutions in methanol. Relevant matrix effects were not observed when assessed using the post-extraction addition method (spiking).

2.8. Statistical analysis

The statistical significance of the treatments in experiments 1 and 3 were checked by means of ANOVA, with Minitab 15 Statistical Package. The factorial plan used in experiment 2, was designed and analyzed using the same statistical software.

3. Results

3.1. Dissociation and cell culture viability

Between 75 and $91 \cdot 10^6$ isolated cells per gram of digestive gland were routinely obtained. Their initial viability was always over 78% (Table 1.1) and remained constant for at least the first 15 hours in culture.

Table 1.1. Dissociation yield and percentage of cell viability obtained for three samples. Viability was measured by trypan blue exclusion and dissociation yield is expressed in millions of cells per gram of digestive gland (DG). \pm SD = \pm Standard deviation.

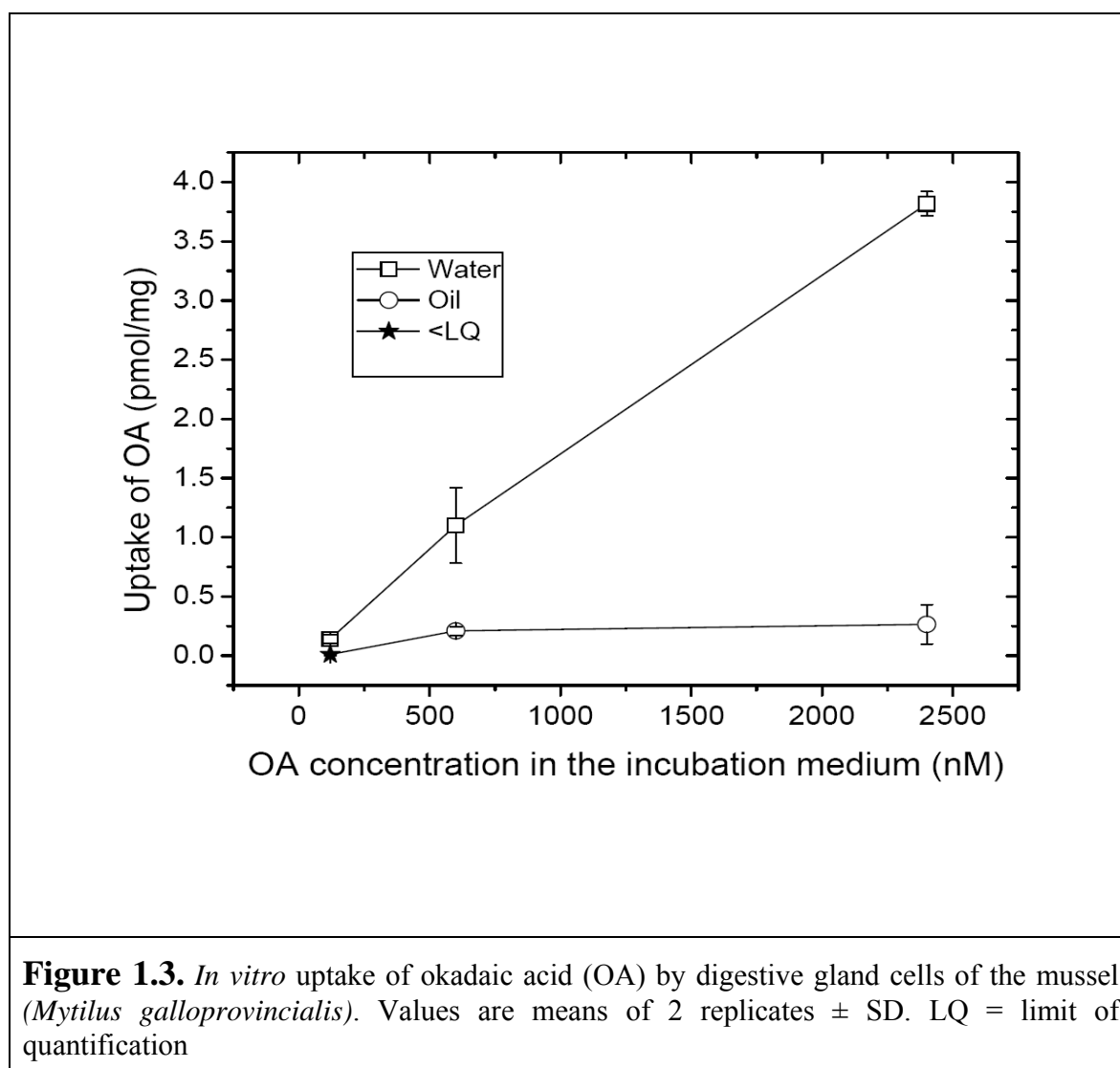
	Sample number			Standard deviation
	1	2	3	
Dissociation yield 10^6 cels/g DG	90.9	86.2	76.2	7.5
% viability by dye exclusión	81.2	78.2	84.3	3.05

3.2. Uptake of OA dissolved in water and oil

The uptake of OA by digestive gland tissue was faster when the toxin was supplied dissolved in water than when it was in oil droplets (Figure 1.3) ($p < 0.05$).

In the case of OA dissolved in water, the uptake by cells increased with the toxin supplied showing an almost linear relationship. However a very slight curvature at the highest concentration could be observed, which could indicate a tendency to saturation. This trend was supported by the results of the following experiment in which OA concentration was higher.

In the case of OA dissolved in oil droplets, when the concentration added to the cell culture was low (120 nM) OA in cells was below the limit of quantification (LQ). When OA concentrations added were higher, some of the toxin uptake by cells was observed and some saturation of the uptake seems to take place, but the dispersion between the observations was too high as to demonstrate this trend (Figure 1.3).



3.3. Effect of okadaic acid concentration, time and ATP on the OA uptake

Toxin concentration and incubation time had relevant effects on the OA absorption by cells ($p < 0.005$) (Table 1.2). There was also interaction between these two factors ($p < 0.005$) because, at the highest concentration of toxin in the culture, proportionally less toxin was absorbed than at the lowest one, at the end of a 4-hour exposure (Figure 1.4).

ATP did not have any significant effect, indicating that OA uptake is not an ATP-dependent process.

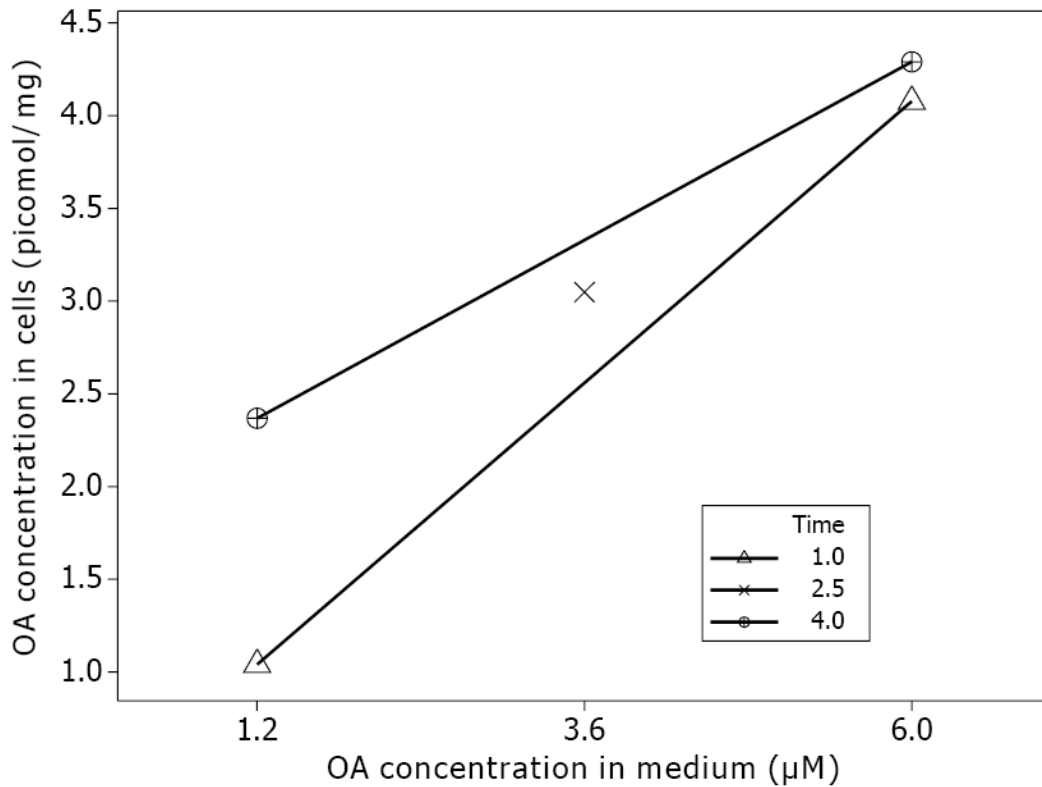


Figure 1.4. Interaction between OA concentration (µM) and incubation time (hours) on the OA (picomol/mg) absorbed by cells of the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*.

Table 1.2. Analysis of the factorial experiment reduced to the two statistically significant factors (ATP was omitted). The curvature of the response was checked by including the central points in the analysis. The upper part shows the magnitude of the effects, their corresponding coefficients and *T*s, and their probabilities; the lower part shows the analysis of variance (ANOVA) of the design indicating the degrees of freedom (d.f.), the mean square (MS), *F*-value and its probability (*p*).

Analysis of Variance	OA (pmol/mg)			
	Effect	Coefficient	<i>T</i>	<i>p</i>
Constant		2.9050	44.92	0.000
Concentration	2.4795	1.2397	19.17	0.000
Time	0.7704	0.3852	5.96	0.001
Time x Concentration	-0.5577	-0.2789	-4-31	0.005
Central points (curvature)		0.1431	1.16	0.292

3.4. Effect of addition of an emulsifier (albumin)

In the case of the toxin dissolved in oil, a very similar average uptake was found in presence or absence of albumin (0.409 ± 0.0705 and 0.414 ± 0.0197 pmol/mg, respectively; $p= 0.909$; Figure 1.5). The estimated values were again comparable with those obtained in the previous experiment (see point 3.2.).

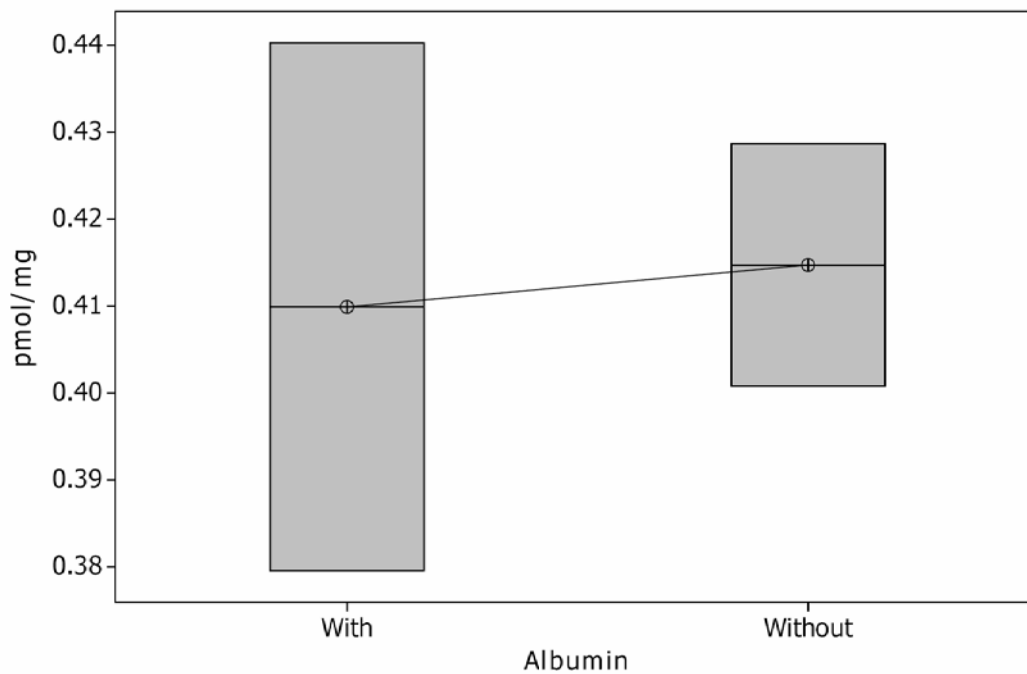


Figure 1.5. Box plot of OA (pmol/mg) absorbed by digestive cells of mussel *Mytilus galloprovincialis* after adding okadaic acid (OA) dissolved in oil in presence (with) and absence (without) of albumin as an emulsifier.

4. Discussion

The uptake of OA by the cells of digestive gland was higher when the toxin was dissolved in water than in oil. The aggregation of oil droplets was not responsible of the low absorption of toxin as the addition of an emulsifier did not increase the amount of OA absorbed. These results suggest that diffusion through the cell membrane, more than endocytosis, is the main way by which OA enters the digestive cells. Even when it has been suggested that the uptake of compounds with $\text{Log } P$ higher than 4 (as is the case of OA) are taken up by mollusks by endocytosis of the particles to which the compounds are adsorbed and not by diffusion (Smedes, 1994; Moore and Willows, 1998), this does not seem to happen with OA. The most likely reason is that the hydrophilicity of OA, that is an ionizable compound, is substantially higher than that estimated by its $\text{Log } P$ at pH above its pKa, and that the coefficient of distribution $\text{Log } D$ (which is a function of pH and pKa; $\text{Log } D = \text{Log } P + \text{pKa} - \text{pH}$) should be used to describe the hydrophilicity instead of the partition coefficient $\text{Log } P$. Unfortunately, there is a large variation between the existing estimates of the $\text{Log } P$ for OA. By means of predictions from the structure $\text{Log } P$ of 4.45 have been estimated (Fux, 2008) but also of 5.89 (Paz *et al.*, 2007). Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 gives a value of 4.513 ± 0.852 . Experimentally, Fux (2008) estimated $\text{Log } P$ s of 5.05, Takahashi *et al.* (2007) 3.4, both by chromatography. pKa has been estimated to be of 4.9 (Fux, 2008) and ACD/Labs Software V11.02 estimates a value of 3.87 ± 0.16 from the structure. If the highest values for $\text{Log } P$ and pKa were assumed, $\text{Log } D$ at neutral pH (which is near the usual pH range in the digestive system of bivalves, Langton (1977), Mathers (1974)) would be below 4 and consequently the absorption by the cells would take place from the dissolved phase. If intermediate values of $\text{Log } P$ and pKa or if the estimate based in the structure given by ACD/Labs Software were used to compute $\text{Log } D$, it would be between 1 and 2, which would made even more likely the uptake from the dissolved phase. The direct estimates of partition between octanol and buffer at pH 7.4 made by Nam *et al.* (1990) yield smaller $\text{Log } D$ values, 0.9-1.27, and those made by González *et al.* (2001) even smaller, 0.2, between octanol and water probably at pH 7.3 (they did not indicate the precise partitioning conditions). It has been observed that okadaic acid aggregates when dissolved in biological buffer (Nam *et al.*, 1990) and that can form dimers with potassium (Daranas *et al.*, 2007).

Both processes seem to make the pass of OA through membranes easier but we do not know how these processes could affect the adsorption of the toxin to food particles.

The uptake by diffusion from the dissolved phase is supported by the fact that in a previous study using mussels naturally contaminated with OA, we found that nearly 90% of the OA was in the cytosol of the digestive gland cells (Rossignoli and Blanco, 2010) and not in the lysosomes, as could be expected if the absorption would have taken place by phagocytosis or other endocytic process (Moore and Willows, 1998).

Notwithstanding, the possibility that a proportion of the OA enters the cell by the later mechanism cannot be ruled out. A study by Guéguen *et al.* (2010), using a methodology very close to that in Rossignoli and Blanco (2010), found that a large proportion of the OA absorbed was located in a subcellular fraction that included lysosomes. In natural conditions, it could be possible, that the proportion of OA absorbed by one or other mechanism depends on the efficiency of the extracellular step of the digestion, because OA could be included in particles from phytoplankton cells.

The uptake of OA dissolved in water by digestive gland tissue was dependent on time and concentration but it does not seem to be affected by ATP. Absorption of OA by the digestive gland neither seems to be related with the concentration in the medium in a perfectly linear way, as relatively fewer toxins was absorbed at the highest concentrations tested. This suggests that the involved uptake mechanism saturates and consequently that a simple diffusion might not be responsible for the absorption. Nevertheless, the actual mechanism could not be unequivocally identified with our data.

The relatively smaller incorporation of toxin at high concentration would point to a facilitated transport as uptake mechanism –not requiring ATP but showing saturation of the transporter- but it is possible that the diffusion of dimers of OA with potassium, as suggested by Daranas *et al.* (2007) or aggregates (Nam *et al.*, 1990) could explain the observed response. Additional work is required to determine if one of these two mechanisms is the responsible for the OA absorption to the cells of mussel digestive gland.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Consellería de Innovación e Industria through the collaboration agreement EPITOX. The work of Araceli Escudeiro Rossignoli was funded by a grant of the Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia, in the framework of the Programa de Recursos Humanos of the PGDIT 2006-2010. We thank G. Álvarez for their technical assistance and the Departments of Sampling and Biotoxins of the Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño de Galicia for providing the experimental mussels.

REFERENCES

- Bauder, A.G., Cembella, A.D., Bricelj, V.M., Quilliam, M.A. 2001. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. Mar. Ecol. Progr. Ser., 213: 39-52.
- Birmelin, C., Pipe, R.K., Goldfarb, P.S., Livingstone, D.R. 1999. Primary cell-culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: a time-course study of antioxidant- and biotransformation-enzyme activity and ultrastructural changes. Marine Biology, 135: 65-75.
- Blanco, J., Mariño, C., Martín, H., Acosta, C.P. 2007. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Toxicon, 50: 1011-1018.
- Cohen, P., Holmes, C.F., Tsukitani, Y. 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. Trends Biochem. Sci., 15: 98-102.
- Creppy, E.E., Traore, A., Baudrimont, I., Cascante, M., Carratu, M.R. 2002. Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid. Toxicology, 181-182: 433-439.
- Daranas, A.H., Cruz, P.G., Creus, A.H., Norte, M., Fernández, J.J. 2007. Self-assembly of okadaic acid as a pathway to the cell. Organic Letters, 9: 4191-4194.
- Della Loggia, R., Cabrini, M., del Negro, P., Honsell, G., Tubazo, A. 1993. Relationship between *Dinophysis* spp. in seawater and DSP toxins in mussels in the Northern Adriatic Sea. In: Smayda, T. J., Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier Science, New York, pp. 483-488.
- Edler, L., Hageltorn, M. 1990. Identification of the causative organism of a DSP-outbreak on the Swedish West Coast. In: Graneli, E. B., Sundstrom, L. E., Anderson, D. M. (Eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier Science, New York, pp. 345-349.
- Faucet, J., Maurice, M., Gagnaire, B., Renault, T., Burgeot, T. 2004. Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis*. Meth. Cell Sci., 25: 177-184.
- Fujiki, H., Suganama, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamanda, K., Murata, M., Yasumoto, T., Sugimura, T. 1988. Diarrhetic shellfish toxins, dinophysistoxin -1 is a potent tumor promoter on mouse skin. Japan. J. Cancer Res., 79: 1089-1093.
- Fux, E. 2008. Development and evaluation of passive sampling and LC-MS based techniques for the detection and monitoring of lipophilic marine toxins in mesocosm and

field studies. Dublin Institute of Technology. Dublin, The Marine Institute. School of Chemical and Pharmaceutical Sciences.

Gayoso, A.M., Dover, S., Morton, S., Busman, M., Moeller, P., Fulco, V.K., Maranda, L. 2002. Diarrhetic shellfish poisoning associated with *Prorocentrum lima* (*Dinophyceae*) in Patagonian Gulfs (Argentina). *J. Shellfish Res.*, 21: 461-463.

Guéguen, M., Duinker, A., Marcaillou, C., Aasen, J., Barillé, L., 2010. A first approach to localizing biotoxins in mussel digestive glands. ICMSS09, [online] <http://www.symposcience.org/exl-doc/colloque/ART-00002585.pdf> [accessed] 10-Jan-2011.

Gerssen, A., Mulder, P.P.J., McElhinney, M., Boer, J. 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. *J. Chromat. A*, 9: 1421 - 1430.

Giacobbe, M.G., Penna, A., Ceredi, A., Milandri, A., Poletti, R., Yang, X. 2000. Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (*Dinophyta*). *Phycologia*, 39: 177-182.

González, J.C., Vieytes, M.R., Vieites, J.M., Botana, L.M. 2001. Solubility of the diarrhetic shellfish toxin okadaic acid in supercritical CO₂. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 78: 77-81.

Heredia-Tapia, A., Arredondo-Vega, B.O., Núñez-Vázquez, E.J., Yasumoto, T., Yasuda, M., Ochoa, J.L. 2002. Isolation of *Prorocentrum lima* (syn. *Exuviaella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the gulf of California, México. *Toxicon*, 40: 1121-1127.

Hu, T., Doyle, J., Jackson, D.M., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C. 1992. Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1: 39-44.

Kat, M. 1983. *Dinophysis acuminata* blooms in the Dutch coastal area related to diarrhetic mussel poisoning in the Dutch Waddensea. *Sarsia*, 6: 81-84.

Koike, K., Sato, S., Yamaji, M., Nagahama, Y., Kotaki, Y., Ogata, T., Kodama, M. 1998. Occurrence of okadaic acid-producing *Prorocentrum lima* on the Sanriku coast, Northern Japan. *Toxicon*, 36: 2039-2042.

Langton, R.W., 1977. Digestive rhythms in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 41 (1): 53-58.

Lassus, P., Bardouil, M., Truquet, I., Truquet, P., Le Baut, C., Pierre, M.J. 1985. *Dinophysis acuminata* distribution and toxicity along the Southern Brittany Coast (France): correlation with hydrological parameters. In: Anderson, D. M., Cembella, A. , Hallegraeff, G. M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 159-164.

- Lawrence, J.E., Bauder, A.G., Quilliam, M.A., Cembella, A.D. 1998. *Prorocentrum lima*: a putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 78-79.
- Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.*, 1: 147-152.
- Mackenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Selwood, A., 2004. Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (Spatt): a New Monitoring Tool That Simulates the Biotoxin Contamination of Filter Feeding Bivalves. *Toxicon*, 44 (8): 901-918.
- Mathers, N.F., 1974. Digestion and pH variation in two species of oysters. *J. Mollusc. Studies*, 41 (1): 37.
- Mestrovic, V., Pavela Vrancic, A. 2003. Inhibition of alkaline phosphatase activity by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor. *Biochimie*, 85: 647-650.
- Moore, M.N., Willows, R.I. 1998. A model for cellular uptake and intracellular behaviour of particulate-bound micropollutants. *Mar. Environ. Res.*, 46: 509-514.
- Nam, K.Y., Hiro, M., Kimura, S., Fujiki, H., Imanishi, Y., 1990. Permeability of a non-TPA-type tumor promoter, okadaic acid, through lipid bilayer membrane. *Carcinogenesis*, 11 (7): 1171-1174.
- Paz, B., Daranas, A.H., Cruz, P.G., Franco, J.M., Pizarro, G., Souto, M.L., Norte, M., Fernández, J.J. 2007. Characterization of okadaic acid related toxins by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Toxicon*, 50: 225-235.
- Quilliam, M.A. 2003. Chemical method for lipophilic shellfish toxins. In: Hallegraef, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 211-245.
- Quilliam, M.A., Hardstaff, W R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Ross, N. W., Windust, A.J. 1996. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 289-292.
- Quilliam, M.A. 1995. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, 78: 555-570.

- Reguera, B., Bravo, I., Fraga, S. 1990. Distribution of *Dinophysis acuta* at the time of a DSP outbreak in the rias of Pontevedra and Vigo (Galicia, NW Spain). *ICES CM/Shellfish Committee*, 1990/L: 14.
- Rossignoli, A.E., Blanco, J. 2010. Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*: First evidences of lipoprotein binding to okadaic acid. *Toxicon*, 55: 221-226.
- Smedes, F. 1994. Sampling and partitioning of neutral organic contaminants in surface waters with regard to legislation, environmental quality and flux estimations. *J. Environ. Anal. Chem.*, 57: 215-229.
- Takahashi, E., Yu, Q., Eaglesham, G., Connell, D.W., Mcbroom, J., Costanzo, S., Shaw, G.R. 2007. Occurrence and seasonal variations of algal toxins in water, phytoplankton and shellfish from North Stradbroke Island, Queensland, Australia. *Mar. Environ. Res.*, 64: 429-442.
- Ten-Hage, L., Delaunay, N., Pichon, V., Coute, A., Puiseux-Dao, S., Turquet, J. 2000. Okadaic acid production from the marine benthic dinoflagellate *Prorocentrum arenarium* (*Dinophyceae*) isolated from europa island coral reef ecosystem (SW Indian Ocean). *Toxicon*, 38: 1043-1054.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G., Clardy, J. 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41: 1019-1025.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N. 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46: 1405-1411.

CAPÍTULO 2

DISTRIBUCIÓN CELULAR DEL ÁCIDO OKADAICO EN LA GLÁNDULA DIGESTIVA DEL MEJILLÓN *MYTILUS* *GALLOPROVINCIALIS*

Introducción

Una vez que los moluscos ingieren las toxinas de tipo DSP estas son acumuladas casi exclusivamente en la glándula digestiva (Blanco et al., 2007b). Sin embargo, la glándula digestiva es un órgano heterogéneo que incluye distintos tipos celulares con diferentes funciones con lo que por un lado, podrían acumular las toxinas de forma diferente y por otro, eliminarlas de la misma manera.

En el proceso de depuración de las toxinas pueden estar implicados varios órganos y tejidos de los organismos, cada uno de los cuales posee su propia tasa de depuración, de manera que un modelo ideal de cinética utilizaría un compartimento para cada uno de los órganos o tejidos (definido por la cantidad inicial de toxinas que contiene, su tasa de depuración y tasas de transferencia desde y hacia otros compartimentos). Por lo general la precisión de los modelos matemáticos de depuración desarrollados hasta la fecha para varios grupos de toxinas es buena (Silvert and Subba Rao, 1992; Douglas *et al.*, 1997; Blanco, 1995, 1997, 1999 y Moroño *et al.*, 1998a,b).

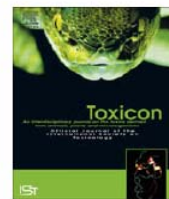
La cinética de eliminación de las toxinas de tipo DSP ha sido estudiada en varias ocasiones, y se ha llegado a la conclusión de que la mejor forma de describir dicho proceso es mediante un modelo de dos compartimentos, incluso cuando únicamente se considera la depuración desde la glándula digestiva. Así el modelo matemático de depuración de dos compartimentos desarrollado para este tipo de toxinas por Blanco *et al.* (1999), sugiere la presencia de la toxina en dos formas en la glándula digestiva, siendo una de ellas más difícil de eliminar que la otra. Una de las razones que podrían explicar este comportamiento diferencial de las toxinas podría ser que los dos tipos celulares (digestivo y secretor) presentes en la glándula digestiva tuvieran diferentes capacidades de acumulación. No obstante la existencia de un ligamiento entre la toxina y algún componente de la célula también podría explicar dicho comportamiento.

El estudio descrito en el presente capítulo, se diseñó con el fin de establecer la distribución a nivel celular del ácido okadaico (OA) y con ello poder determinar la importancia de los dos tipos celulares de la glándula digestiva del mejillón en la cinética de

depuración de dicha toxina (**Objetivo 2**). Para ello se estudió y estableció, en primer lugar, la distribución de la toxina en los dos tipos celulares de dicho órgano. A continuación los resultados obtenidos se integraron en el modelo de depuración de 2 compartimentos de Blanco *et al.* (1999) para comprobar si los dos tipos celulares se correspondían con cada uno de los compartimentos que explican la cinética de depuración de la glándula digestiva o si, por el contrario, habría que explicar la cinética con otro mecanismo como podría ser la existencia de ligamiento del OA a componentes celulares.

ARTÍCULO 2

Rossignoli, A.E., Blanco, J., 2008. Cellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Toxicon* 52: 957-959.



Short communication

Cellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

Araceli E. Rossignoli, Juan Blanco*

Centro de Investigaci3n Mar3nas (CIMA), Pedras de Cor3n, s/n. Apdo. 13, 36620 Vilanova de Arousa (Pontevedra), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2008

Received in revised form 1 September 2008

Accepted 16 September 2008

Available online 27 September 2008

Keywords:

Diarrhetic shellfish poisoning

Okadaic acid

Cellular distribution

Mussels

Digestive gland

Secretory cells

Digestive cells

Depuration

Kinetics

Models

ABSTRACT

The distribution of okadaic acid between the digestive and the secretory cells of the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* was studied for the main purpose of determining if they might be responsible for the two-compartment depuration kinetics found in previous studies. The two cell types did not accumulate okadaic acid to the same degree. However, the concentrations found in each cellular type were not consistent with those expected from the output of the two-compartment depuration model, suggesting that a mechanism other than the differential accumulation in cellular types is involved. Binding to some yet undetermined cellular components is suggested.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The mussel *Mytilus galloprovincialis* is the most important bivalve species of the European aquaculture industry. The toxins involved in Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP toxins) are responsible for many of the closures imposed on the mussel market. Hence, they are probably the main problem facing bivalve aquaculture in Europe, resulting in a large economic and social impact.

In order to find methods that will minimize the effect of the accumulation of these toxins, it is necessary to understand the mechanisms involved in accumulation and depuration processes. In this respect, several studies have been carried out to determine the kinetics of toxin accumulation and/or the environmental factors that regulate these processes (Sampayo et al., 1990; Blanco et al., 1999, 2005; Duinker et al., 2007), but very few studies have examined

the mechanisms involved (Svensson and Forlin, 2004), and the information currently available is still insufficient.

In a previous study on the elimination of okadaic acid from the digestive gland of the mussel *M. galloprovincialis*, Blanco et al. (1999) found that it followed a kind of kinetics that was well described by a two-compartment model. This suggested that the toxin was present in two forms in the digestive gland, one of them being more difficult to eliminate than the other. There are some possible explanations for this differential behavior of the toxins. One is the varying ability the different parts of the digestive gland to eliminate toxin and the other is the differential binding of the toxin to the cellular components.

The digestive gland is the organ in mussels that accumulates DSP toxins almost completely (Blanco et al., 2007). It is included in the digestive system complex of mollusks, which has been described in detail by many authors (Owen, 1970; Bayne, 1976; Morton, 1983; Morse and Zardius, 1997). It comprises mostly digestive tubules

* Corresponding author. Tel.: +34 986 500155; fax: +34 986 506788.
E-mail address: jblanco@cimacoron.org (J. Blanco).

which are made up of two cell types (Morton, 1983): digestive cells and secretory cells (Weinstein, 1995). Digestive cells are the largest (5–30 μm) and most abundant type. Some of their known functions include intracellular digestion, detoxification, xenobiotic biotransformation and antioxidant defense (Gosling, 2003). Secretory cells are smaller (15–20 μm) and less abundant than digestive cells. These cells are known to play an extensive role in protein synthesis but their exact function is unclear, although they might be involved in enzyme secretion for extracellular digestion (Weinstein, 1995).

Because of their functions, these cell types make good candidates for being considered the physical equivalent of the two mathematical compartments found during the depuration of okadaic acid (Blanco et al., 1999).

The aim of this study was to find out if the two cell types accumulated okadaic acid differentially and if they could be associated with the mathematical compartments found during the depuration process.

Two mussels that contained okadaic acid were obtained from a culture raft in Galicia 4 days after a toxic episode had started and they were maintained in the laboratory in running seawater until they were used (2 depuration days). The mussel, therefore, had been depurating while they were accumulating the toxin in the raft and additionally for 2 days in the lab.

Digestive glands were cut into small pieces of ca. 2×2 mm (Birmelin et al., 1999), which were washed with saline solution CMFS (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 12.5 mM KCl; pH 7.3, 1100 mOsm) (10 ml/digestive gland). The tissue was dissociated for 2 h and the resulting cell suspensions were withdrawn every 30 min. A two-step centrifugation procedure was used to remove CMFS from the withdrawn suspension and concentrate the cells: first at $100 \times g$, to harvest the large cell type or digestive cells, and during the second step, the supernatant was spun down again at $180 \times g$ to harvest the small cell type or secretory cells. Each of the final pellets was resuspended in 5 ml CMFS solution and an aliquot was withdrawn to calculate the biomass of the cells in each fraction, by weighing an aliquot in a precombusted Whatman GF/F filter. The obtained suspensions were observed under the light microscope founding that the morphology of the large majority of cells coincided with that of digestive and secretory cells. No haemocytes or any other cell type was detected. Finally, the okadaic acid in each fraction was extracted by centrifuging at $7700 \times g$ for 5 min, addition of 80% methanol and centrifugation at $48,000 \times g$ for 20 min.

The okadaic acid concentration was determined by HPLC–ESI/MS with a Thermo Deca XPplus mass spectrometer coupled to an HPLC Thermo Surveyor. Chromatographic separation was performed according to Quilliam (2003). The mass spectrometer was operated in negative mode and the identity of the okadaic acid was confirmed by a MS/MS spectrum (dependent scan). Quantification of the okadaic acid was carried out by comparing the resulting response with that of the okadaic acid reference materials (OA-b) obtained from IMB–NRC, Canada.

The two-compartment model described by Blanco et al. (1999) for the same toxins and mussel species, was used, with the values of the parameters that were estimated in

the same work. The model was formulated by the following system of equations:

$$d\text{Tox}_1/dt = -DR_1 \cdot \text{Tox}_1 - TR_{12} \cdot \text{Tox}_1$$

$$d\text{Tox}_2/dt = -DR_2 \cdot \text{Tox}_2 + TR_{12} \cdot \text{Tox}_1$$

$$\text{Tox} = \text{Tox}_1 + \text{Tox}_2$$

where Tox = toxin concentration; DR = depuration rate; TR = transfer rate. Subindices indicate compartments.

The relative contribution of the two digestive gland cell types studied to the biomass was found to be different, with the large and small cell fractions being 58% and 42% of the total suspension obtained, respectively.

The distribution of okadaic acid between the two cell types was not homogeneous. There was more okadaic acid in the large cell fraction, in part because of the fact that there was more biomass in this fraction, but also because the toxin concentration was found to be higher (Fig. 1). It would therefore seem that the two cell types do not have the same accumulation behavior.

While it is not possible to know whether this difference is due to differential absorption or differential elimination, the characteristic functions of each cell type would suggest that toxins must be absorbed by the digestive cells which might transfer part of the acquired toxin to the secretory cells. If the two cell types are, in fact, the two compartments that Blanco et al. (1999) proposed in their depuration model, as would appear to be likely in view of the different behavior they exhibit in the toxin accumulation process, then the first compartment (the one in which the toxins are absorbed from the digestive lumen) would represent the digestive cells, while the second compartment would be made up of the secretory cells.

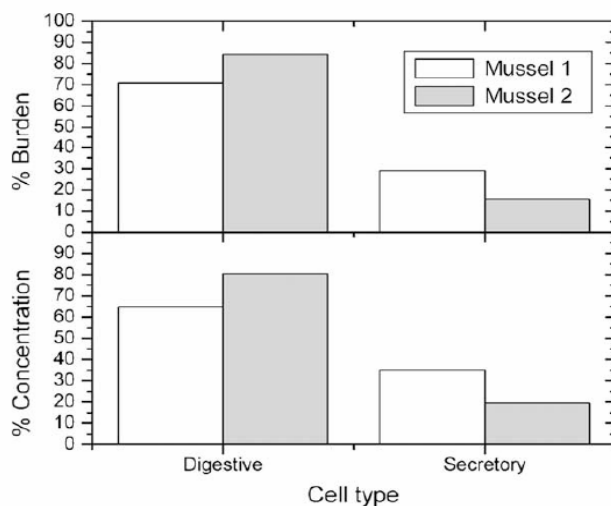


Fig. 1. Okadaic acid amount (burden) and concentration percentages (%) in each mussel and in each cellular type studied. Burden percentage shows the actual accumulation capability of the cellular types due to the combination of their sequestering power and their biomass, while concentration percentage indicates the sequestering power independently from the biomass.

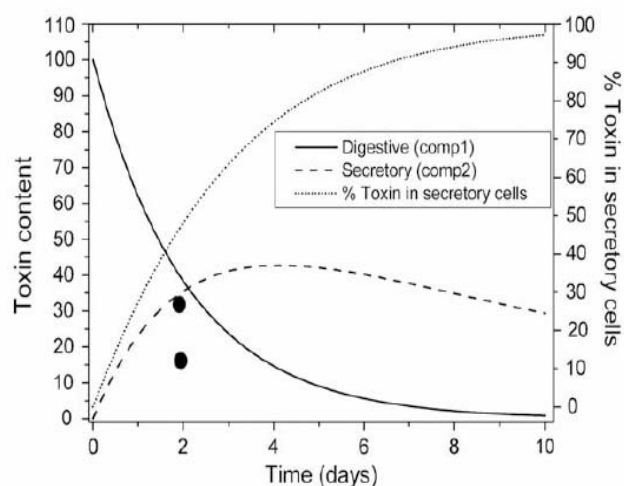


Fig. 2. Toxin content of each cell type and their relative contribution to the total toxin burden as predicted by the two-compartment model assuming that each cellular type is represented by one compartment. The parameters used were estimated in a previous experiment ($DR1 = 0.17 \text{ d}^{-1}$, $DR2 = 0.10 \text{ d}^{-1}$, $TR12 = 0.31 \text{ d}^{-1}$). According to the model, toxin content in digestive cells is highest when depuration process starts, since that point, part of the okadaic acid is lost in depuration and another part is transferred to secretory cells. Dots indicate the actual percentage of the toxin in secretory cells.

Notwithstanding, when the model was run, the output obtained (Fig. 2) showed that, the secretory cells would soon (after 2 depuration days) became the main site of toxin accumulation, which contradicts the results obtained. In fact, the average percentage of OA burden in the secretory cells was 24.5 ± 7.5 , much smaller than the predicted one that was above 50.

It should be concluded that, although the two cell types that make up the digestive gland do not accumulate okadaic acid to the same degree, they are not responsible for the two compartments found when the depuration process was mathematically described. Consequently, the second hypothesis put forth in the introduction – that is, the differential binding of okadaic acid to some cellular components – would seem to be highly probable and new studies should focus on this subject.

Acknowledgements

This work was funded by the Dirección Xeral de Investigación e Desenvolvemento, Consellería de Innovación, Industria e Comercio, through the project PGDIT04RMA 50107PR. The work of Araceli Escudeiro Rossignoli was funded by a grant of the Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia, in the framework of the Programa de Recursos Humanos of the PGDIT. We thank M.C.

Mariño, H. Martín and J. Domínguez for their technical assistance and the Departments of Sampling and Biotoxins of the Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño de Galicia for providing the experimental mussels.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

References

- Bayne, B.L., 1976. Physiology. In: Bayne, B.L. (Ed.), *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 121–206.
- Birmelin, C., Pipe, R.K., Goldfarb, P.S., Livingstone, D.R., 1999. Primary cell-culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: a time-course study of antioxidant- and biotransformation-enzyme activity and ultrastructural changes. *Mar. Biol.* 135 (1), 65–75.
- Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A., 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 176, 53–163.
- Blanco, J., Moroño, A., Fernández, M.L., 2005. Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: an overview. *Revista galega dos recursos mariños. Monografías* 1, 1–70. http://www.recmar-galicia.org/pdf/BlancoetalRGRMMonog1_2005.pdf (accessed 15.01.08).
- Blanco, J., Mariño, C., Martín, H., Acosta, C.P., 2007. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 50, 1011–1018.
- Duinker, A., Bergslien, M., Strand, Ø., Olseng, C.D., Svardal, A., 2007. The effect of size and age on depuration rates of diarrhetic shellfish toxins (DST) in mussels (*Mytilus edulis* L.). *Harmful Algae* 6 (2), 288–300.
- Gosling, E., 2003. *Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture*. Blackwell Publishing, pp. 115–117 (Chapter 4).
- Morse, M.P., Zardius, J.D., 1997. Bivalvia. In: Harrison, F.W., Kohn, A.J. (Eds.), *Mollusca II. Microscopic Anatomy of Invertebrates*, vol. 6A. Wiley-Liss, New York, pp. 7–118.
- Morton, B., 1983. Feeding and digestion in bivalvia. In: Saleuddin, A.S.M., Wilbur, K.M. (Eds.), *The Mollusca. Physiology, Part 2*, vol. 5. Academic Press, London, pp. 65–147.
- Owen, G., 1970. The fine structure of the digestive tubules of the marine bivalve *Cardium edule*. *Phil. Trans. R. Soc. (Ser. B)* 258, 245–260.
- Quilliam, M.A., 2003. Chemical method for lipophilic shellfish toxins. In: Hallegraef, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 211–245.
- Sampayo, M.A., Alvito, P., Franca, S., Sousa, I., 1990. Dinophysis spp. Toxicity and relation to accompanying species. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 215–220.
- Svensson, S., Forlin, L., 2004. Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (Diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquatic Toxicol.* 66 (4), 405–418.
- Weinstein, J.E., 1995. Fine structure of the digestive tubule of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish. Res.* 14, 97–103.

CAPÍTULO 3

DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DEL ÁCIDO OKADAICO EN LA GLÁNDULA DIGESTIVA DEL MEJILLÓN *MYTILUS* *GALLOPROVINCIALIS*. PRIMERAS EVIDENCIAS DE LIGAMIENTO A UNA LIPOPROTEÍNA

Introducción

Una vez comprobado que los dos tipos celulares presentes en la glándula digestiva del mejillón no son los compartimentos responsables de la cinética de depuración explicada en el modelo de Blanco *et al.* (1999) (capítulo 2) y con la finalidad de seguir indagando en el conocimiento de las bases de los procesos de incorporación y eliminación de las toxinas, se planteó este tercer trabajo.

Si las diferentes partes de la glándula digestiva no presentan variabilidad en sus capacidades para acumular el ácido okadaico (capítulo 2), la existencia de un ligamiento entre dicha toxina y algún componente celular parece ser la explicación más plausible al comportamiento diferencial que presentan las toxinas durante su depuración de la glándula digestiva.

Existen estudios realizados en la esponja marina *Halichondria okadai* en los que se han identificado algunas proteínas que ligan el ácido okadaico (OA) como las OABP1 (37 kDa) y OABP2 (3 proteínas de 22 kDa) (Sugiyama *et al.*, 2007). Esta última, según los autores, podría incluso estar implicada en el proceso de detoxificación del OA. En este mismo sentido, Nzoughet *et al.* (2008) observaron que los azaspirácidos (AZAs), otro grupo de toxinas lipofílicas, también podían unirse débilmente a una proteína con un peso molecular de 45 kDa y que además esta resultaba ser más abundante en los mejillones contaminados que en los mejillones libres de toxina.

El trabajo que constituye este capítulo tiene dos objetivos principales, por un lado el tratar de establecer la localización a nivel subcelular del OA (**Objetivo 2**) y por otro el determinar si efectivamente existe un ligamiento entre el OA y alguna molécula concreta (**Objetivo 3**).

Para la consecución de dichos objetivos se realizaron una serie de experimentos. En el primero de ellos se determinó en qué fracción de la célula (soluble o precipitable) era mayoritaria la toxina y, por tanto, si se encontraba ligada o no a algún componente celular. En el segundo de ellos, se filtraron las muestras a través de una serie de ultrafiltros de diferente tamaño de poro (10, 30, 300 y 1000 kDa) para delimitar el tamaño del receptor del

OA. Finalmente se trató de identificar el tipo de receptor del ácido okadaico por medio de su hidrólisis enzimática y la consiguiente liberación de la toxina.

ARTÍCULO 3

Rossignoli, A.E., Blanco, J., 2010. Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*: First evidences of lipoprotein binding to okadaic acid. *Toxicon* 55: 221-226



Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*: First evidences of lipoprotein binding to okadaic acid

Araceli E. Rossignoli*, Juan Blanco

Centro de Investigaci3n Mariaas (CIMA), Pedras de Cor3n, s/n. Apdo. 13, 36620 Vilanova de Arousa (Pontevedra), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 March 2009

Received in revised form 17 July 2009

Accepted 22 July 2009

Available online 29 July 2009

Keywords:

Diarrhetic shellfish poisoning

Okadaic acid

Subcellular distribution

Digestive gland

Lipoprotein

Accumulation

ABSTRACT

The subcellular distribution of okadaic acid, the main diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxin, in the cells of the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* was studied. By means of differential centrifugation, ultrafiltration and extraction with methanol, it was found that most okadaic acid was stored in the cytosol. Notwithstanding only a small proportion of the total toxin was found to be in free form, being most of it bound to a soluble cellular compound with a molecular mass which ranged from 30 to 300 kDa. A series of fractionations of samples digested with a protease, a lipase, and amylase suggested that the component to which okadaic acid is bound is a high density lipoprotein. A new fractionation after digestion with a protein lipase additionally supports the previous conclusion.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Molluscan bivalves exploitation is an important activity around the world. The appearance (existence) of toxic episodes due to any kind of toxins (specially diarrhetic shellfish poisoning (DSP)), involves serious economic and social repercussions for fisheries and aquaculture. DSP, even when is one of the less dangerous toxicity due to its low morbidity, is the one with most impact, through market closures in areas as Galicia which is one of the top five mussels producers of the world.

DSP episodes are directly linked with some species of *Dinophysis*: *Dinophysis fortii* (Della Loggia et al., 1993; Yasumoto et al., 1980), *Dinophysis acuta* (Reguera et al., 1990; Edler and Hageltorn, 1990), *Dinophysis acuminata* (Kat, 1983; Lassus et al., 1985), *Dinophysis sacculus* (Giacobbe et al., 2000), and with *Prorocentrum lima* (Lawrence et al., 1998). The typical syndrome includes diarrhoea,

vomiting and nausea. DSP toxins are nearly exclusively accumulated in the digestive gland of the mussels (Blanco et al., 2007), and though, okadaic acid (OA) is the main toxin (Murata et al., 1982), two dinophysistoxins (DTX 1 and DTX 2) and the esters of the main toxins with fatty acids, can also produce this toxicity. The structure of OA and DTXs differs in the number or position of the methyl group. All these toxins are lipophilic compounds and their solubility in organic solvents (dichloromethane, methanol, acetone or chloroform) is in general high but variable between compounds. These toxins act inhibiting serine/threonine protein phosphatases (PP1 and specially PP2A), enzymes which are responsible for catalyze the protein dephosphorylation process (Cembella et al., 1995).

Minimizing the impact of this kind of episodes on aquaculture requires minimizing the ingestion or accelerating the elimination of these toxins. Some results have been obtained within the first approach (Desbiens and Cembella, 1993; Franzosini et al., 2000; J3rgensen et al., 2008) but limited success has been obtained with the second (Blanco et al., 1999; Croci et al., 1994; Poletti et al., 1996; Svensson, 2003).

* Corresponding author. Tel.: +34 986 500155; fax: +34 986 506788.
E-mail address: ara@cimacoron.org (A.E. Rossignoli).

Finding new and more effective ways of accelerate toxin elimination requires the knowledge of the accumulation/elimination mechanisms.

In a previous study on the elimination of okadaic acid from the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, Blanco et al. (1999), found that it followed a kinetics that was well described by a two-compartment model. This suggested that the toxin was present in two forms in the digestive gland, one of them being more difficult to eliminate than the other. There were some possible explanations for this differential behavior of the toxins. One was the varying ability of the different parts of the digestive gland to eliminate toxin, which has been discarded in a previous study of our team (Rossignoli and Blanco, 2008), and the other is the differential binding of the toxin to cellular components. In this sense, Sugiyama et al. (2007), isolated okadaic acid from crude extract of the marine sponge *Halichondria okadai* and two okadaic acid binding proteins were characterized: OABP1 with approximately 37 kDa molecular weight in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis and OABP2 consisted of three 22 kDa proteins (OABP2.1, OABP2.2 and OABP2.3) revealed by HPLC analysis. OABP2 was not detected in the sponge *Halichondria japonica* or the dinoflagellate *Prorocentrum lima*, so they postulated that probably OABP2 might be involved in detoxifying okadaic acid. Also recently, Nzoughet et al. (2008), identified by isoelectric focusing, SEC and SDS-PAGE, a target protein for azaspiracin (AZA) in mussels with 45 kDa molecular weight and that was close to ovalbumin. This protein was also present in blank material but at substantially lower levels providing evidence to support the hypothesis that a protein is expressed in greater abundance in shellfish due to AZA contamination (Nzoughet et al., 2008).

The approach used was to check the localization of okadaic acid in the subcellular fractions of the digestive gland, and to identify the group of substances which bound the okadaic acid by means of selective enzymatic hydrolysis.

2. Material and methods

2.1. Biological material and reagents

Contaminated mussels (*M. galloprovincialis*) containing mainly OA, DTX 2 and acyl derivatives were obtained from a culture raft in Galicia after a *D. acuminata* outbreak. All mussels were stored at -20°C prior to extraction.

OA reference solution OA-b was obtained from IMB – NRC, Canada. Water was purified through a MilliQ-gradient system, fed with an Elix-10, both from Millipore. Acetonitrile and methanol of HPLC-grade were obtained from Rathburn and Labscan, respectively. Protease inhibitor cocktail (P2714), Pronase E from *Streptomyces griseus* (P5147), Pancreatic porcine lipase (L3126), Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* (A1602) and Lipoprotein lipase from *Pseudomonas* sp. (L9656) were obtained from Sigma-Aldrich.

2.2. Experiment 1. Subcellular fractionation with protease inhibitor cocktail

Digestive glands of 20 mussels were dissected, cut into small pieces of ca. 2×2 mm and homogenized for 3 min at 11,000 rpm (Ultraturrax IKA) with a buffer (1:5, w/v) which contained TRIS 0.1 M pH 7.8, ammonium formate 0.15 M and protease inhibitor cocktail (AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, Bestatine 130 μM , E-64 14 μM , Leupeptin 1 μM , Aprotinin 0.3 μM) (Huber et al., 2003).

A 600 μL aliquot of the homogenized tissue was taken as initial sample and the OA it contained was extracted with aqueous methanol 80% in a proportion of 4 mL MeOH/g of homogenate. The extract was clarified by centrifugation for 20 min at $48,000 \times g$ (Beckman Avanti J-25).

The remaining homogenate was centrifuged at $45,000 \times g$ for 1 h in order to separate soluble (or cytosolic) from precipitable fractions (Fig. 1). The state of the okadaic acid in the cytosolic fraction (supernatant) was examined by means of chromatographic analysis of the unprocessed supernatant, the MeOH 80% extract, and the fraction ultrafiltered through an Ultrafree-MC of 10 kDa of nominal pore size (Millipore) and extracted with MeOH 80% (1:5, v/v), in order to obtain estimates of the free, total and bound to large biomolecules or very small organules that could be present in the cytosolic fraction, respectively.

2.3. Experiment 2. Fractionation using ultrafilters with different pore

In a second experiment, performed in order to identify the size fraction of the substances/organules to which a large portion of the OA was bound, the cytosolic fraction obtained as in the first experiment was ultrafiltered using Pall Corporation NanoSEP OMEGA (10, 30 and 300 kDa) and Pall Corporation MicroSEP (1000 kDa) filters. The toxin was extracted with 80% methanol (1:5, v/v) from each of the obtained filtrates. The extracts were clarified by centrifugation for 20 min. at $48,000 \times g$ and analysed by HPLC–MS.

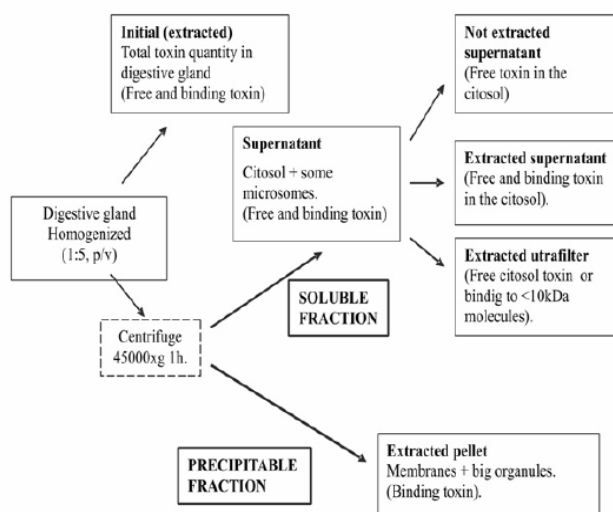


Fig. 1. Subcellular fractionation diagram.

2.4. Experiments 3 and 4. Subcellular fractionation after digestion with protease, lipase, amylase and lipoprotein lipase

The third experiment was aimed with the identification of the kind of biomolecule involved in the cytosolic binding of the OA. The approach chosen was to check if the digestion of the initial homogenate of digestive gland with enzymes that hydrolyse proteins, lipids or carbohydrates produced an increase in the proportion of free OA. The homogenates of the digestive gland were prepared as in the previous experiments with the exception of the use of a specific buffer for each enzymatic digestion. An aliquot of each homogenate was complemented with the corresponding enzyme and incubated at 37 °C for 24 h. The enzymes and buffers used were: Pronase E from *S. griseus* (Sigma-P5147) in ammonium bicarbonate 50 mM pH 7.4; Porcine lipase pancreatic (Sigma-L3126) in sodium phosphate 20 mM; Amyloglucosidase from *A. niger* (Sigma-A1602) in ammonium sulphate 3.2 M pH 4.5 and Lipoprotein lipase from *Pseudomonas* sp. (Sigma-L9656) in sodium phosphate 50 mM.

After incubation, subcellular fractionations were carried out in the same way as that in experiment 1 (Fig. 1) and the proportion of OA released by the digestion was evaluated by comparison of the OA proportion that passes a 30 kDa ultrafilter (NanoSEP OMEGA) in the digested sample with that in the undigested (buffer only) one.

In sight of the results of experiment 3, a new experiment, formally identical to the previous one but using a digestion with a lipoprotein lipase was carried out.

2.5. Toxin analysis

Okadaic acid concentration in each extract was determined by HPLC–ESI–MS with a Thermo LCQ–Deca XPplus ion trap mass spectrometer with electrospray ionization coupled to a Thermo Surveyor HPLC. Chromatographic separation was carried out using the method of Quilliam (2003) slightly modified to adapt it to a fused core column (HALO C8 50 × 2.1 mm 2.7 μm). The two mobile phases were as follows: A = H₂O:F (95:5) and B = CH₃CN:F (95:5), where F is 40 mM ammonium formate and 1 M formic acid in water. The gradient program was 5–100% B over 5 min, hold for 5 min and the re-equilibrate at the starting conditions for 5 min prior to the next injection. Flow rate was 400 μL/min and injection volume was 5 μL.

The mass spectrometer was operated in negative ionization mode and SIM (selected ion monitoring) for 803.5 m/z. Quantification of the okadaic acid was carried out by comparing the resulting response with that of the reference materials (OA-1b) obtained from IMB – NRC, Canada.

3. Results and discussion

3.1. Experiment 1. Subcellular fractionation with protease inhibitors

About 91% of the total OA in the digestive gland corresponded to the extracted supernatant, which means that this large percentage of the toxin is stored in the soluble

fraction of the cells, free or bound to biomolecules or microsomes.

When the raw supernatant was not extracted with methanol, only 28% of the total OA can be detected. This is therefore the proportion of OA that is free (or very weakly bound) in the cytosol. Approximately the same proportion, 32% pass through a 10 kDa ultrafilter, suggesting therefore that it is actually free OA. Notwithstanding binding to a biomolecules smaller than 10 kDa cannot be ruled out. The previous findings suggest that about 70% of the total OA contained in the digestive gland, is bound to a soluble receptor that is larger than 10 kDa (Fig. 2).

3.2. Experiment 2. Size fractionation with ultrafilters

Most OA seems to be bound to biomolecules larger than 30 but smaller than 300 kDa, as shown by the small percentage of the total OA that can be detected in the ultrafiltrate of the 30 and 10 kDa filters (near 30%), and the high percentage obtained from those of the filters with larger pore sizes (more than 85%, Fig. 3). The possibility of binding to microsomes – that could be present in the supernatant – can, therefore, be discarded.

3.3. Experiment 3. Subcellular fractionation after digestion with protease, lipase and amylase

When digestion with the protease was carried out, a small increase in the percentage of free OA (supernatant not extracted fraction) (35%) in relationship to its control (23%) was found (Fig. 4A). This suggested that a protein could be involved in binding okadaic acid. The differences found between ultrafiltered (through 30 kDa) supernatant digested (26%) and its respective control (14%) point also to some release of OA after digestion. Nevertheless, the OA

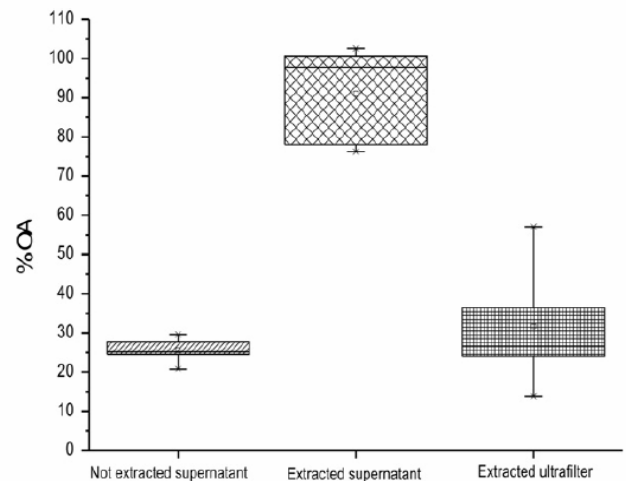


Fig. 2. Okadaic acid distribution in cytosol fraction (supernatant of the subcellular fractionation) in experiment 1 (with protease inhibitors). “Non-extracted supernatant” = raw supernatant; “extracted supernatant” = supernatant with the OA extracted by addition of MeOH (it is expected that all OA in the supernatant could be analysed after extraction); “extracted ultrafiltered” = 10 kDa ultrafiltrate of the supernatant extracted by addition of MeOH 80%.

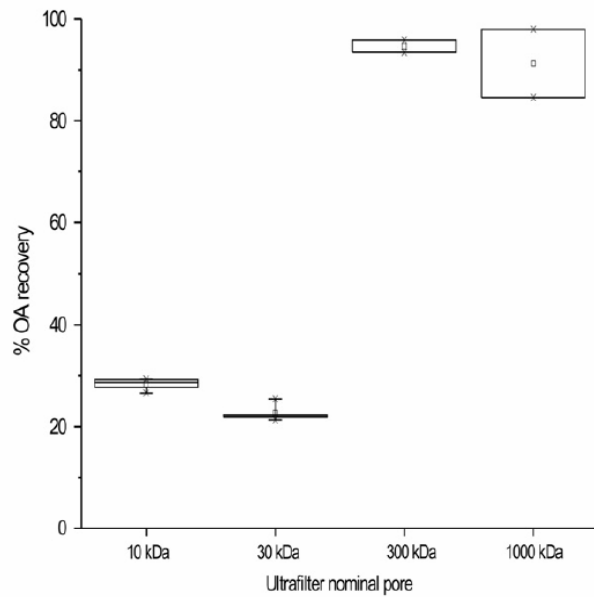


Fig. 3. Okadaic acid recoveries using 10, 30, 300 and 1000 kDa ultrafilters. Boxes indicate quartiles, small squares indicate mean, the extremes of the vertical lines indicate 10 and 90% percentiles, and asterisks indicate 1 and 99 percentiles.

percentages found in the ultrafiltered extracts were only slightly smaller than those found in the unfiltered ones, suggesting that most OA was still bound to a receptor that is larger than 30 kDa (Fig. 4A).

Mak et al. (2005) found that the OA percentage recovery from mussel digestive gland increased up to 2.5 times when a proteinase K digestive step was introduced in the extraction process but the authors attribute that increase to the reduction of matrix effects in the derivatization process.

After digestion with lipase the recovery of free OA (supernatant not extracted fraction) increased substantially (99%) in relationship to its control (26%) (Fig. 4B), suggesting the possible binding of the toxin to a lipidic component. This possibility is coherent with the fact that the okadaic acid in mussels is accumulated almost exclusively in the digestive gland (Blanco et al., 2007), an organ that has been considered as the main storage site for lipids in these bivalves (De Zwaan and Mathieu, 1992). Strikingly, only a small proportion of the total OA apparently released through the digestion with lipase, passed the 30 kDa ultrafilter (9%) (Fig. 4B). We initially considered two possibilities, the first one being the formation of lipidic droplets made from the compounds resulting from the partial digestion of the lipidic receptors; and the second being that the partial degradation weakens the strength of the toxin binding allowing it to be released during the chromatographic separation. The first possibility was discarded by checking that exposing the unfiltered supernatant to ultrasounds that would break the lipidic droplets, had no effect on the percentage of OA that passed the ultrafilter (data not shown). Consequently, the second possibility seems the most likely.

In the experiment of digestion with amylase, the use of the recommended buffer (ammonium sulphate) produced

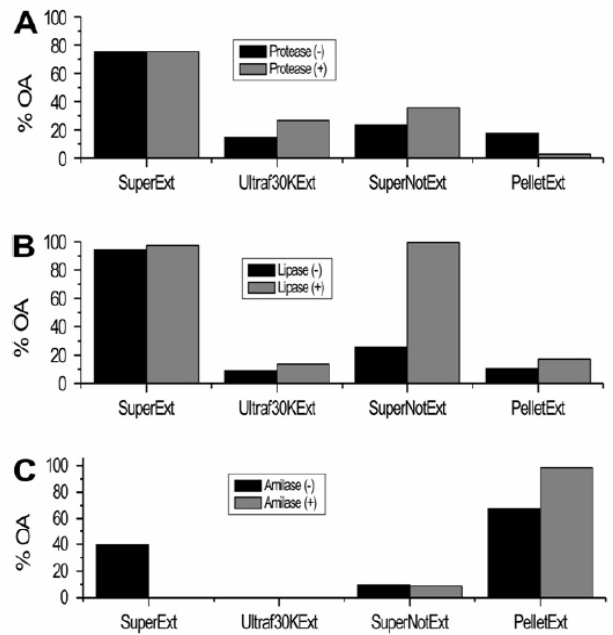


Fig. 4. Percentage of the initial okadaic acid obtained in each subcellular fraction after enzymatic digestion (A) with protease; (B) with lipase; (C) with amylase. SuperExt = supernatant extracted with MeOH; Ultraf30kExt = supernatant ultrafiltered through 30 kDa; SuperNotExt = supernatant not extracted fraction; PelletExt = precipitable fraction extracted with MeOH; + and – preceding each enzyme indicate the digested sample and the control (only the specific buffer), respectively.

that most okadaic acid precipitated from the solution (98% in buffer + enzyme and 67% in buffer alone) (Fig. 4C). This precipitation with ammonium sulphate additionally suggested that okadaic acid was bound to a protein. The digestion with amylase “per se” did not have any effect on the release of okadaic acid, as shown by the high percentage of OA found in the precipitable fraction when the homogenate was treated with amylase. We do not have any clear explanation for the differences found between amylase digestion and their control but the fact that most toxin precipitated discards polysaccharides as possible candidates for OA receptors.

As summary of the three treatments, the toxin release induced by the protease and lipase digestions and its precipitation due to ammonium sulphate present in the amylase buffer, suggest a high density lipoprotein as the most likely okadaic acid receptor. To confirm this point, we carried out a new experiment using the same approach but with a protein lipase as hydrolytic enzyme, in order to achieve a higher degree of toxin release if the receptor was, as it was thought, a lipoprotein.

3.4. Experiment 4. Subcellular fractionation after digestion with lipoprotein lipase

Even when the mussels used in this experiment were not the same that those in experiment 3, the percentage of okadaic acid obtained in the soluble fraction of the cell (supernatant extracted fraction) was again higher than in precipitable fraction (pellet fraction). Lipoprotein lipase

digestion produced an increase in the percentage of analyzable OA (free or weakly bound = not extracted supernatant) from 37% to 85%. A similar increase was observed in the OA that pass the 30 kDa ultrafilter (Fig. 5).

3.5. Intracellular OA storage

It seems clear that the digestion with the lipoprotein lipase had much more effect on the release of OA than the lipase and the protease individually. In the case of the protease digestion the percentage of OA released was not high and in the case of the lipase, most OA seemed to be still weakly bound to some parts of the receptors as it did not pass through the 30 kDa ultrafilter. Notwithstanding, the digestion with the lipoprotein lipase produced a high release of OA that pass the 30 kDa ultrafilter, strongly suggesting that OA is intracellularly stored in lipoproteins. The fact that these lipoproteins easily precipitate after treatment with ammonium sulphate indicates additionally that, with a high degree of certainty, the receptors are high density lipoproteins. Their size range is bracketed by the ultrafilters used in these experiments between 30 and 300 kDa.

New questions open about the role of these lipoproteins in the DSP toxins accumulation process. Even when sequestering of okadaic acid by lipoproteins cannot be ruled out, the fact that this group of components is strongly linked to the transport of lipophilic substances, makes that unlike. In humans high density lipoproteins (HDL), in association with ATP-binding cassette (ABC) transporters, are responsible to remove excess cholesterol from cells and transport it to liver and steroidogenic tissues for

metabolism and excretion (Jonas, 2002). In bivalves, a similar mechanism could be involved as the final part of the cellular excretion chain, the ABC proteins, has being associated to xenobiotic excretion. (Kington et al., 2007; Kurelec, 1992, 1995; Luedeking and Koehler 2004; Luedeking et al., 2005).

Additionally if, as in the case of the cholesterol transportation, esterification was involved in the toxin excretion, the slower depuration of dinophysistoxin 2, as compare to okadaic acid, would be explained by the smaller proportion of esters found in the first toxin.

Future investigations will be oriented in this sense to achieve a fast depuration method for DSP toxins in mussels.

Acknowledgements

This work was funded by the Dirección Xeral de Investigación e Desenvolvemento. Consellería de Innovación, Industria e Comercio, through the project PGI-DIT04RMA50107PR. The work of Araceli Escudeiro Rossignoli was funded by a grant of the Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia, in the framework of the Programa de Recursos Humanos of the PGDIT 2006–2010. We thank M.C. Mariño and H. Martín for their technical assistance and the Departments of Sampling and Biotoxins of the Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño de Galicia for providing the experimental mussels.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A., 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Marine Ecology Progress Series* 176, 153–163.
- Blanco, J., Mariño, C., Martín, H., Acosta, C.P., 2007. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 50, 1011–1018.
- Cembella, A.D., Milenkovic, L., Doucette, G., Fernandez, M., 1995. *In vitro* biochemical methods and mammalian bioassays for phycotoxins. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 177–179.
- Croci, L., Toti, L., De Medici, D., Cozzi, L., 1994. Diarrhetic shellfish poison in mussels: comparison of methods of detection and determination of the effectiveness of depuration. *International Journal of Food Microbiology* 24, 337–342.
- Della Loggia, R., Cabrini, M., del Negro, P., Honsell, G., Tubazo, A., 1993. Relationship between *Dinophysis* spp. in seawater and DSP toxins in mussels in the northern Adriatic Sea. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier Science, New York, pp. 483–488.
- Desbiens, M., Cembella, A.D., 1993. Minimization of PSP toxin accumulation in cultured blue mussels (*Mytilus edulis*) by vertical displacement in the water column. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier Science Publishers B.V, pp. 395–399.
- De Zwaan, A., Mathieu, M., 1992. Cellular biochemistry and endocrinology. In: Gosling, E. (Ed.), *The Mussel *Mytilus edulis*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 223–308.
- Eidler, L., Hageltorn, M., 1990. Identification of the causative organism of a DSP-outbreak on the Swedish West Coast. In: Granéli, E.B., Sundstrom, L.E., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier Science, New York, pp. 345–349.
- Franzosini, C., Poletti, R., Cettul, K., Della Loggia, R., Tubaro, A., Cabrini, M., Cattapan, P., Vascotto, E., Tomasi, F., 2000. Rallentata contaminazione da

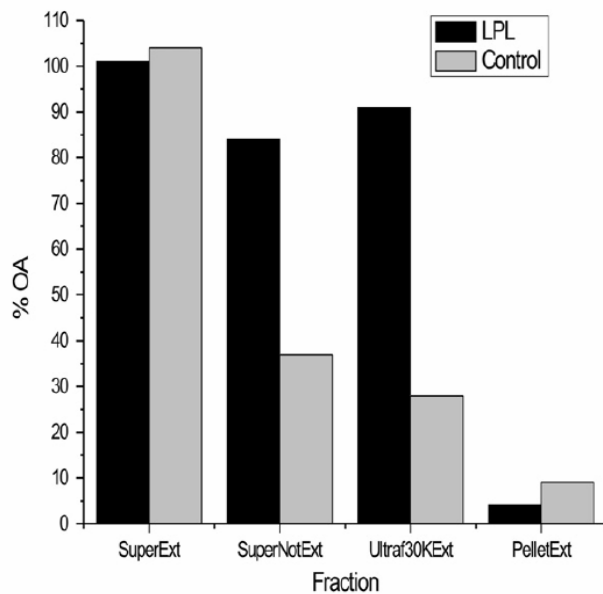


Fig. 5. Percentage of okadaic acid initial obtained in each fraction of the lipoprotein lipase digestion experiment. SuperExt = supernatant extracted with MeOH fraction; SuperNotExt = supernatant not extracted fraction; Ultraf30kExt = supernatant ultrafiltered through 30 kDa fraction; PelletExt = precipitable fraction extracted with MeOH.

- biotossine algali in mitili riposizionati in prossimità del fondale marino. In: Consorzio per l'AREA di ricerca – AREA Science Park 12, p. 56.
- Giacobbe, M.G., Penna, A., Ceredi, A., Milandri, A., Poletti, R., Yang, X., 2000. Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyta). *Phycologia* 39 (3), 177–182.
- Huber, L.A., Pfaller, K., Vietor, I., 2003. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circulation Research* 92 (2), 962–968.
- Jonas, A., 2002. Lipoprotein structure. In: Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier Science Publishers B.V., pp. 483–504 (Chapter 18).
- Jørgensen, K., Cold, U., Fischer, K., 2008. Accumulation and depuration of okadaic acid esters in the European green crab (*Carcinus maenas*) during a feeding study. *Toxicon* 51 (3), 468–472.
- Kat, M., 1983. *Dinophysis acuminata* blooms in the Dutch coastal area related to diarrhetic mussel poisoning in the Dutch Waddensea. *Sarsia* 6, 81–84.
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., Janvilisri, T., 2007. Atp-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquatic Toxicology* 85 (2), 124–132.
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology* 22, 23–43.
- Kurelec, B., 1995. Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. *Science of the Total Environment* 171, 197–204.
- Lassus, P., Bardouil, M., Truquet, I., Truquet, P., Le Baut, C., Pierre, M.J., 1985. *Dinophysis acuminata* distribution and toxicity along the Southern Brittany Coast (France): correlation with hydrological parameters. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 159–164.
- Lawrence, J.E., Bauder, A.G., Quilliam, M.A., Cembella, A.D., 1998. *Proocentrum lima*: a putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Spain, pp. 78–79.
- Luedeking, A., Koehler, A., 2004. Regulation of expression of multixenobiotic (MXR) genes by environmental factors in blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 69, 1–10.
- Luedeking, A., Van Noorden, C.J.F., Koehler, A., 2005. Identification and characterisation of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 286, 167–175.
- Mak, K.C.Y., Yu, H., Choi, M.C., Shen, X.Y., Lam, M.H.W., Martin, M., Wu, R.S.S., Wong, P.S., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2005. Okadaic acid, a causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning, in green-lipped mussels *Perna viridis* from Hong Kong fish culture zones: method development and monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 51, 1010–1017.
- Murata, M., Shimitami, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1982. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48, 549–552.
- Nzougheh, K.J., Hamilton, J.T.G., Floyd, S.D., Douglas, A., Nelson, J., Devine, L., Elliott, C.T., 2008. Azaspiracid: first evidence of protein binding in shellfish. *Toxicon* 51, 1255–1263.
- Poletti, R., Viviani, R., Casadei, C., Lucentini, L., Giannetti, L., Funari, E., Draisci, R., 1996. Decontamination dynamics of mussels naturally contaminated with diarrhetic toxins relocated to a basin of the Adriatic Sea. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 429–432.
- Quilliam, M.A., 2003. Chemical method for lipophilic shellfish toxins. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 211–245.
- Reguera, B., Bravo, I., Fraga, S., 1990. Distribution of *Dinophysis acuta* at the time of a DSP outbreak in the Rías of Pontevedra and Vigo (Galicia, Spain). In: *Int. Cons. Expl. Sea, C.M. 1990/L 14*, p. 12.
- Rossignoli, A., Blanco, J., 2008. Cellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Toxicon* 52 (8), 957–959.
- Sugiyama, N., Konoki, K., Tachibana, K., 2007. Isolation and characterization of okadaic acid binding proteins from the marine sponge *Halichondria okadaei*. *Biochemistry* 46, 11410–11420.
- Svensson, S., 2003. Depuration of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture* 218 (1), 277–291.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N., 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 43, 1405–1411.

CAPÍTULO 4

MICROENCAPSULACIÓN DEL ÁCIDO OKADAICO COMO UNA HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE LAS TOXINAS DSP EN LOS MOLUSCOS BIVALVOS

Introducción

Uno de los principales problemas que se presentan a la hora de realizar estudios de acumulación, absorción y eliminación de toxinas en los moluscos bivalvos es la dificultad de obtener una fuente adecuada de toxinas. Aunque son abundantes los cultivos de diferentes especies de fitoplancton que se usan para intoxicar a los bivalvos, estos no están fácilmente disponibles para las toxinas lipofílicas diarreogénicas (DSP). El cultivo de especies bentónicas del género *Prorocentrum* es relativamente sencillo y en él se suelen emplear medios de cultivo y condiciones estándar para algas fotosintéticas. Sin embargo el cultivo de especies del género *Dinophysis* (principal productor de toxinas DSP en Galicia) resulta mucho más complejo ya que requiere el empleo de ejemplares del ciliado *Mirionecta rubra* para alimentar al dinoflagelado y aportes de microalgas criptofitas del género *Teleaulax* para alimentar al ciliado (Park *et al.*, 2006).

Otro problema añadido del empleo de cultivos como fuentes de toxinas, es que resulta prácticamente imposible suministrarlas a los organismos de manera individual, bien sean libres o como derivados, ya que los cultivos contienen una mezcla complicada de toxinas del mismo grupo y en ocasiones incluso de varios grupos. Además muchos de estos compuestos pueden además ser biotransformados dando lugar a las toxinas libres o a nuevos derivados, (Hu *et al.*, 1992b; Marr *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 1998; revisado en Blanco *et al.*, 2005), lo cual dificulta, aún más, tanto el estudio de la cinética de las toxinas como el de las propias biotransformaciones que puedan tener lugar en el interior de los bivalvos.

Para poder abastecer a los bivalvos con algún tipo de alimento que contenga exclusivamente una toxina o algún derivado, en el presente capítulo se estudió la posibilidad y la eficacia de microencapsular ácido okadaico (OA) (asociado a los **Objetivos 4 y 5**). Para ello se introdujeron modificaciones en el método de coacervación compleja usado por Planas *et al.* (1990) que emplea microcápsulas de gelatina-acacia. Hasta el momento dichas microcápsulas han sido usadas principalmente para incorporar lípidos en experimentos de nutrición con larvas y semilla de moluscos (Knauer and Southgate, 1997; Novoa *et al.*, 2002), larvas de peces (Planas *et al.*, 1990; Alarcón and Martínez, 1998) y crustáceos (Southgate and Lou, 1995; Wong, 1998).

Adicionalmente, en el presente estudio se evaluó la eficiencia de encapsulación del OA, la capacidad de las microcápsulas para retener las toxinas a lo largo del tiempo cuando son suspendidas en agua de mar y la capacidad de absorción de las toxinas microencapsuladas por parte de los mejillones.

ARTÍCULO 4

Rossignoli, A.E., Fernández, D., Acosta, C.P., Blanco, J., 2011. Microencapsulation of okadaic acid as a tool for studying the accumulation of DSP toxins in mussels. *Marine Environmental Research* 71: 91-93.



Short communication

Microencapsulation of okadaic acid as a tool for studying the accumulation of DSP toxins in mussels

Araceli E. Rossignoli, David Fernández, Carmen P. Acosta, Juan Blanco*

Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA), Pedras de Corón, s/n. Apdo. 13, 36620 Vilanova de Arousa, Pontevedra, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2010

Received in revised form

12 November 2010

Accepted 17 November 2010

Keywords:

Microcapsules

Okadaic acid

Absorption efficiency

Biotransformation

Mussels

ABSTRACT

The possibility and effectiveness of microencapsulation of okadaic acid (OA) in gelatin-acacia microcapsules has been studied. The encapsulation efficiency was higher than 33%. The microcapsules were shown to be very stable, not leaching more than 9% of the encapsulated OA in a 20-h period. OA from the microcapsules was absorbed by the mussels very efficiently, accumulating -after 3 days of feeding and one of depuration- 65% of the OA in microcapsules and 22% of the total OA used at the beginning of the microencapsulation process. These efficiencies and the possibility of encapsulating single DSP toxins and derivatives constitute a valuable tool for the study of the accumulation and biotransformation of DSP toxins in bivalves.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) is a syndrome caused by some polyether compounds -okadaic acid (OA), analogs and derivatives that produce diarrhoea, nausea, vomiting, headache, chills and moderate to severe abdominal pain in humans (Yasumoto et al., 1978). The responsible toxins are produced by several species of dinoflagellates belonging to the genus *Dinophysis* and *Prorocentrum* (Yasumoto et al., 1980; Murakami et al., 1982; reviewed in Blanco et al., 2005) and are accumulated by shellfish that feed on these species. DSP toxicity probably has the highest impact on bivalve aquaculture, as it is frequently found in areas in which that activity is intense, such as Galicia (Spain) or southern Chile.

Mitigating the consequences of these blooms requires understanding the mechanisms involved in the absorption, elimination and transformation of this group of toxins by the bivalves. Experimental approaches are hampered by the difficulty of obtaining cultures of DSP-producing organisms and even when those are obtained, the cells usually contain a complex mixture of toxins and toxin derivatives that makes interpretation of the results difficult.

In order to supply the bivalves with food containing individual toxins or derivatives, we have studied the possibility and the effectiveness of microencapsulation of okadaic acid in gelatin-acacia microcapsules.

To obtain okadaic acid, naturally contaminated mussels were dissected, weighed and their digestive glands homogenized in

methanol (in a proportion of 1 g of tissue to 4 mL of extraction solvent), with an Ultraturrax T 25 Basic (IKA). The obtained homogenate was centrifuged at 48000 g for 20 min to clarify the solution (Beckman Avanti J-25). The extract was diluted to 50% methanol and subjected to liquid-liquid partitions with hexane and dichloromethane. The absence of conjugated forms (acyl derivatives or diol-esters) in the extract was checked by means of alkaline hydrolysis, that transforms them to free OA. The dichloromethane fraction was evaporated to dryness and redissolved in 0.5 mL of olive oil. Aliquots of 0.25 mL were used to quantify OA in the extract and to be microencapsulated respectively.

Gelatin-acacia microencapsulation was based on the complex coacervation method used by Planas et al. (1990) but with slight modifications (Fig. 1). Once the microcapsules had been produced they were washed by allowing them to decant, removing supernatant water, adding new water and shaking the suspension gently. This operation was repeated each day during the experiment in order to avoid lump formation.

The encapsulation efficiency was quantified by the proportion of OA that was successfully encapsulated. OA contained in the microcapsules was quantified by extraction of approx. 1 g of microcapsules with methanol 100% (1:4, v/v) and clarification by centrifugation for 20 min at 48000 g.

The capability of the microcapsules to retain the toxins when they are suspended in seawater was also studied. Microcapsules were placed in seawater and samples of this water were taken at different times (0, 1, 2, 3, 4 and 20 h). An initial blank of the seawater

* Corresponding author. Tel.: +34 886206364; fax: +34 886206372.
E-mail address: juan.blanco@cimacoron.org (J. Blanco).

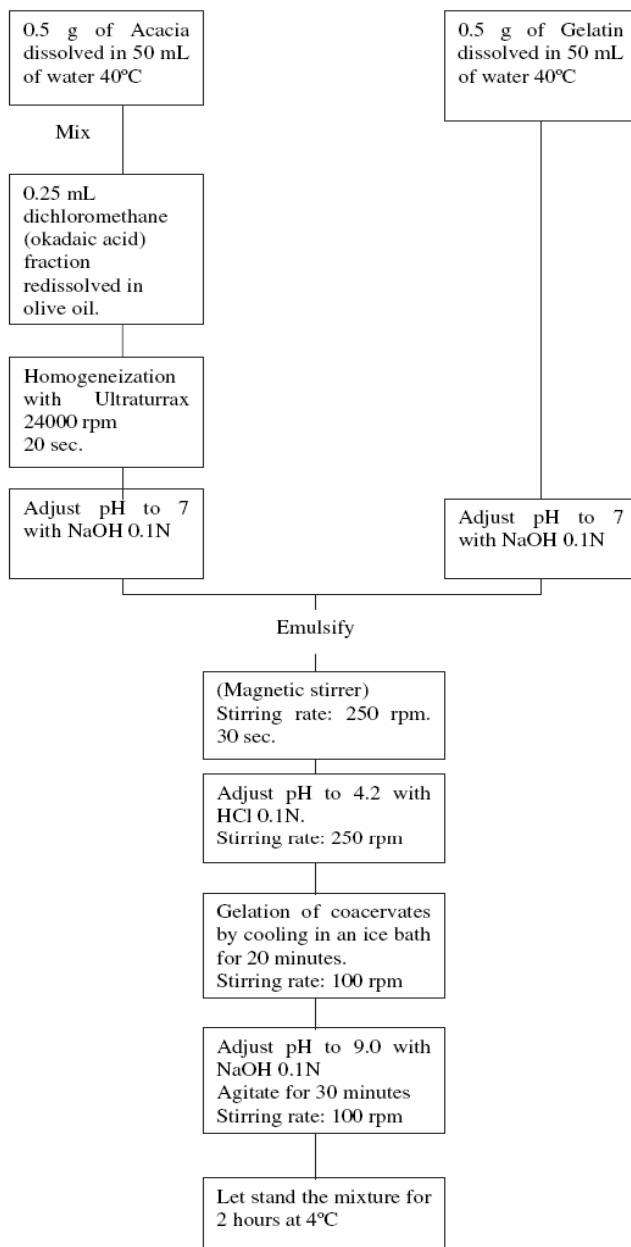


Fig. 1. Schematic diagram of the preparation of okadaic acid gelatin-acacia coacervate microcapsules (Partially from Planas et al., 1990).

was also analyzed. OA was extracted from the water by liquid–liquid partition with dichloromethane, evaporation of the organic fraction, and resuspension in 100% methanol.

Finally, we have shown that the toxins from microcapsules can be absorbed by mussels and they can be traced after being fed. OA-containing microcapsules were fed to two groups of six mussels obtained from the same batch which contained low levels of toxins (Table 1). The mussels were placed in a beaker and were fed with a diet constituted by 10 mL of the microcapsules suspension (approximately 1 g of microcapsules) plus 25 mL of a culture of the microalgae *Tetraselmis* sp. (3×10^6 cels·mL⁻¹) plus 0.05 g of clay. The food was supplied twice a day during 3 days. After the third day of feeding, mussels were maintained without food for an additional

Table 1

Content of okadaic acid (OA) and their conjugated forms (CF) in the digestive gland of mussels and feces at the beginning and the end of the experiment.

	Type of Toxin	Toxin in Day 1 (TO) (μg)	Toxin Day 4 (TF) (μg)	Toxin increase (μg)
Mussels	OA	0.4750	0.7802	0.3052
	CF + OA	1.0973	2.9545	1.8572
Feces	OA	Not sampled	0.1663	–
	CF + OA	Not sampled	1.3706	–

DG = digestive gland; Day 1 = the first day that the mussels were fed. Day 4 = the day after the last feeding.

day, in order to remove most undigested food from the digestive system before analysis. This step was needed because very likely not all microcapsules are digested and, if they are not removed from the gut, the toxin they contain would be measured jointly with the absorbed one thus making it impossible to discriminate the absorbed from the ingested toxin. Furthermore, feces were collected from the bottom of the beaker every day and pooled the last day of the experiment. At the end, the digestive glands were homogenized in methanol (100%) in a proportion of 1:4, w:v, with an Ultraturrax T 25 Basic (IKA) and the homogenate obtained was centrifuged at 48000 g for 20 min to clarify the solution. This extract was analyzed to quantify free OA. In order to quantify the total amount of toxin (OA and its conjugated forms (CF)) the methanolic extracts were subjected to an alkaline hydrolysis (after Vale and Sampayo, 1999, but using a temperature of 80 °C). The extracts were desalted and partially cleaned with polymeric reverse-phase SPE cartridges Strata X (60 mg/3 mL) (Phenomenex). Feces were subjected to the same procedure, with the exception that the proportion of methanol added to extract the toxins was 4 mL of methanol per mL of feces, instead of per gram as in digestive glands.

OA concentration in each extract was determined by HPLC-ESI-MS with a Thermo LCQ-Deca XPplus ion trap mass spectrometer with electrospray ionization coupled to a Thermo Surveyor HPLC. The chromatographic separation was carried out using the method of Quilliam (2003) slightly modified to adapt it to a fused core column (HALO C8 50 × 2.1 mm 2.7 μm). The two mobile phases were: A = H₂O: F (95:5) and B = CH₃CN: F (95:5), where F was 40 mM ammonium formate and 1 M formic acid in water. The gradient program went from 5% to 100% B over 5 min, hold for 5 min and then re-equilibrate at the starting conditions for 5 min prior to the next injection. Flow rate was 400 μL min⁻¹ and injection volume 5 μL. The mass spectrometer was operated in negative ionization mode and SIM (selected ion monitoring) for 803.5 m/z. Quantification of the OA was carried out by comparing the resulting response with that of the reference materials (OA-1b) obtained from IMB - NRC, Canada. The presence of matrix effect was checked by serial dilutions of the samples and corrected when needed by using the results obtained with the largest dilution.

Some modifications to the microencapsulation technique of Planas et al. (1990) were made in order to adapt the microcapsule size to the requirements of mussels. In this sense we have used a pH of 7 for the step of mixture of colloids and of 4.2 for the emulsification, obtaining microcapsules with a diameter about 50 μm. Also a homogenization with Ultraturrax at 24000 rpm (instead of the sonication of the original technique) was introduced to favor a correct mixture between the OA-olive oil and the acacia solution.

The efficiencies of encapsulation of the oils (olive and cod liver oil) were always high and similar to the ones obtained by Planas et al. (1990) encapsulating cod liver oil (50–85%) or by Knauer and Southgate (1997) encapsulating lipids (ca. 80%). However the encapsulating efficiency of OA was lower, ranging from 33 to 53%. This difference is probably due the partially hydrophilic nature of

OA, (its partition coefficient between water and olive oil which is roughly 0.3, as we have estimated in a preliminary experiment in which ca. 30% of okadaic acid remained in water after a 1:1 water:olive oil liquid–liquid partition).

The stability of the microcapsules in seawater was good, as the OA they contain did not leach substantially. Only about 8.5% of the toxin contained in the microcapsules was lost as soon as they were suspended in seawater (0 h), probably due to an insufficient washing, and no significant loss (c.a. 0.5%) could be detected after that time. Planas et al. (1990) found a similar leaching percentage for cod liver oil but during an 8-h period notwithstanding, with no noticeable loss at 0 h.

Mussels fed well on microcapsule suspensions. At the end of each 24 h feeding cycle no suspension in the water was apparent and no pseudofeces detected, indicating that all the food supplied was ingested. At the end of the experiment the six mussels had increased their total toxin content (OA free + OA Conjugated forms) in the digestive gland (DG) by 1.857 μg (Table 1). This accumulation by the mussels represents 63% of the microencapsulated toxin and 22% of the initial toxin amount. A large proportion of the toxin is therefore lost but enough of it was retained by mussel as to consider the technique useful to study toxin accumulation and biotransformation. In feces, only a small percentage of free OA was found and most was found as conjugated forms. From this proportion of free OA an absorption efficiency higher than 88% could be estimated (assuming that the free okadaic acid is not transformed in the gut, and that consequently the free OA found in feces comes from the non-absorbed toxin plus the first absorbed and then excreted free toxin).

It can be concluded that microencapsulation is a viable way of supplying toxic food for studies of accumulation and biotransformation of biotoxins in bivalves. Mussels feed well on gelatin-acacia microcapsules if they are mixed with microalgae. The microencapsulated toxins can be readily absorbed allowing a substantial increase in toxin concentrations of the mussels in a few days.

It seems clear that this technique is more feasible for studying the biotransformation and the mechanisms involved in accumulation than using *Dinophysis* or *Prorocentrum* cultures and also than the study of naturally intoxicated populations. In all cases because the complexity of the toxin mixture could be controlled and simplified. In the case of *Dinophysis* cultures, additionally because the AO producing species in this genus have complex nutritional requirements. *Dinophysis acuminata*, for example, requires (as far as we know presently) a partially photosynthetic ciliate (*Myrionecta rubra*) as prey. The ciliate must obtain the chloroplasts from a cryptophyte (usually *Teleaulax*) (Park et al., 2006). Culturing this species requires consequently three steps (one for each species) that should be carefully synchronized. That is an expensive and time consuming process, which is additionally prone to fail due to contamination of the final *Dinophysis* culture with the cryptophyte. In relation to *Prorocentrum*, using microcapsules has advantages because the

species in this genus are inefficiently digested by mussels, and (and perhaps because of), at least some of them produce a number of bioactive compounds (Cruz et al., 2008; Napolitano et al., 2009, 2010). Microcapsules can be used to supply mussels with individual DSP toxins derivatives that have lower polarity than okadaic acid, such as 7-O-acyl derivatives or diol-esters, but its use with more polar derivatives, such as “DTX4” and “DTX5”, should be additionally evaluated.

Acknowledgements

This work was funded by the Consellería de Innovación e Industria through the collaboration agreement EPITOX. The work of Araceli Escudeiro Rossignoli was funded by a grant of the Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia, in the framework of the Programa de Recursos Humanos of the PGDIT 2006–2010. We thank H. Martín for their technical assistance and the Departments of Sampling and Biotoxins of the Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia for providing the experimental mussels.

References

- Blanco, J., Morofio, A., Fernández, M.L., 2005. Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: an overview. *Revista Galega dos Recursos Mariños (Monog.)* 1, 1–70. http://www.recomar-galicia.org/pdf/BlancoetalRGRMMonog1_2005.pdf [Online].
- Cruz, P.G., Fernández, J.J., Norte, M., Daranas, A.H., 2008. Belizeanic acid: a potent protein phosphatase 1 inhibitor belonging to the okadaic acid class, with an unusual skeleton. *Chemistry, a European Journal* 14, 6948–6956.
- Knauer, J., Southgate, P.C., 1997. Assimilation of gelatin-acacia microencapsulated lipid by Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Aquaculture* 153, 291–300.
- Murakami, Y., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1982. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48 (1), 69–72.
- Napolitano, J.G., Norte, M., Padron, J.M., Fernández, J.J., Daranas, A.H., 2009. Belizeanolide, a cytotoxic macrolide from the dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum*. *Angewandte Chemie-International Edition* 48, 796–799.
- Napolitano, J.G., Norte, M., Fernández, J.J., Daranas, A.H., 2010. Corozalic acid: a key okadaic acid biosynthetic precursor with phosphatase inhibition activity. *Chemistry, a European Journal* 16 (38), 11576–11579.
- 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*. *Aquatic Microbial Ecology* 45 (2), 101–106.
- Planas, M., Fernández-Reiriz, M.J., Ferreiro, M.J., Labarta, U., 1990. Effect of selected variables on the preparation of gelatin-acacia microcapsules for aquaculture. *Aquacultural Engineering* 9 (5), 329–341.
- Quilliam, M.A., 2003. Chemical method for lipophilic shellfish toxins. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on harmful marine microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 211–245.
- Vale, P., Sampayo, M.A., 1999. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon* 37 (8), 1109–1121.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 44, 1249–1255.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarza, T., Fujita, N., 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46 (11), 1405–1411.

CAPÍTULO 5

VÍAS DE DEPURACIÓN DEL ÁCIDO OKADAICO EN LA GLÁNDULA DIGESTIVA DEL MEJILLÓN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

5.1. Introducción

Como ya se ha ido explicando a lo largo de la presente tesis, el grupo de toxinas causantes del síndrome de intoxicación diarreica (DSP) aun no siendo las más graves, ya que hasta la fecha no se han registrado intoxicaciones letales, sí son las que mayor número de cierres de explotación de polígonos mejilloneros causan a lo largo del año. Este motivo conlleva que el impacto que dichas toxinas tienen en la acuicultura europea, tanto a nivel económico como social, sea muy elevado.

Las toxinas DSP, una vez ingeridas por los mejillones, se acumulan casi exclusivamente en la glándula digestiva (Blanco *et al.*, 2007b) y pueden ser transformadas o bien durante el proceso de digestión extracelular o, una vez absorbidas por las células, por digestión intracelular y metabolización.

Hasta la fecha no se conoce cuál es el mecanismo de depuración de estas toxinas aunque son varios los procesos y vías que, con bastante probabilidad, pueden estar implicados: excreción desde las células de la glándula digestiva a heces (bien directamente (fase 0 de eliminación de xenobióticos) o a través de esférulas de excreción (transporte vesicular); excreción (a través del riñón) al flujo exhalante; degradación de las toxinas (o transformación en compuestos no tóxicos) o alguna combinación de varios de ellos.

En el caso de la excreción directa a través de la membrana de las células de la glándula digestiva, los productos de desecho que se eliminarían por el digestivo, podrían hacerlo tanto en forma sólida como disuelta, por lo que podrían eliminarse o con las heces o en líquidos junto con ellas.

Respecto a las esférulas de excreción no se sabe nada acerca de su implicación en la depuración de las toxinas que, de existir, probablemente implica el arrastre de parte del citoplasma que circunda a la partícula no digerida y que se incluye en la esférula. En cualquier caso los productos de este tipo de excreción se eliminarían con las heces.

En el caso de la excreción por el riñón, los tóxicos saldrían con el flujo exhalante, y, por último, en caso de degradación de las toxinas o de transformación en otros productos no nocivos, los tóxicos no saldrían del organismo sino que se

destruirían y, por tanto dichos procesos podrían ser detectados por medio de un balance de masas.

En estudios previos de nuestro equipo hemos podido observar como las heces constituyen una vía clara de eliminación de las toxinas DSP. Al analizar el contenido en toxinas de las mismas nos encontramos con que la mayor parte estaban constituidas por formas conjugadas (CF) del ácido okadaico (OA) y solo un pequeño porcentaje lo estaba por OA libre (capítulo 4). Estas observaciones sugieren que o bien el OA libre se pierde de las heces por disolución en el agua o bien la eliminación de estas toxinas se produce mayoritariamente como algún tipo de CF.

Para tratar de identificar la vía principal de eliminación de las toxinas DSP, así como la implicación de las CF en este proceso, se abordaron una serie de experimentos enfocados a: 1) determinar si la toxina se conserva como tal o desaparece, por medio de balance de masas a lo largo de 6 días, 2) evaluar la cantidad de toxina (OA y CF) que se pierde por cada una de las dos principales vías de excreción en los mejillones (flujo exhalante y heces), 3) cuantificar la importancia de la redisolución de OA y CF en la concentración de toxinas de las heces; y 4) evaluar si el aporte de materiales no digeribles, que debe incrementar la producción de esférulas de excreción, tiene efecto sobre la eliminación del OA.

5.2. Material y Métodos

5.2.1. Experimento 1. Depuración de las toxinas DSP como material disuelto

El material biológico que se empleó estaba formado por un lote de mejillones recolectados por el INTECMAR de un cultivo en batea, que habían acumulado toxinas DSP tras un episodio tóxico de *Dinophysis acuminata*.

Los mejillones se mantuvieron en un tanque en el laboratorio con aireación permanente durante 2 días, previos al experimento, con el fin de que se aclimataran a las nuevas condiciones experimentales y que eliminaran el material no digerido del digestivo.

Se colocó un mejillón tóxico en una bandeja con 10 litros de agua y un difusor de aire para suministrarle oxígeno. Se situaron 2 tubos a una distancia aproximada de 1 a 2 mm de los sifones inhalante y exhalante, por los cuales se aspiró el agua entrante y saliente con una bomba peristáltica (Figura 5.1). Una vez que el mejillón se había aclimatado a las condiciones experimentales (aproximadamente a las 3 horas), se recolectó un litro de agua de cada sifón. El experimento se realizó por triplicado.



Figura 5.1. Captación del agua de los sifones exhalante e inhalante de los mejillones.

Las muestras de agua recolectadas fueron evaporadas mediante ebullición hasta 100 mL y una parte importante de las sales que contenían, fueron eliminadas mediante precipitación. Para la extracción del OA de las muestras del agua se realizaron 2 particiones con diclorometano (1:1, v:v). Los extractos obtenidos se evaporaron con nitrógeno y las toxinas se redisolviéron en 5 mL de metanol 100%. Finalmente se realizó a cada muestra una extracción en fase sólida con cartuchos poliméricos de fase reversa Strata X (Phenomenex), con el fin de eliminar los restos de sales que pudieran quedar.

5.2.2. Experimento 2. Balance de masas del ácido okadaico a lo largo de 6 días

Al igual que en el experimento 1, el material biológico que se empleó estaba formado por un lote de mejillones recolectados por el INTECMAR de un cultivo en batea tras la aparición de un nuevo episodio tóxico de *Dinophysis acuminata*.

De la misma manera que antes, los mejillones se mantuvieron en un tanque en el laboratorio con aireación permanente durante 2 días, previos al experimento.

A partir de una submuestra de 20 individuos se cuantificó la carga inicial de toxina (T0) que contenían dichos mejillones.

A continuación, se colocaron otros 20 mejillones del mismo lote repartidos en 2 vasos de precipitados con 4 L de agua de mar cada uno (10 mejillones/vaso) y dotados de un difusor de aire para suministrarles oxígeno. Se dejaron durante 6 días depurando, sin suministro de alimento y a medida que los mejillones iban expulsando heces, estas se iban recolectando y mezclando con las anteriores. Transcurridos 7 días (TF) se cuantificó el contenido tóxico en OA y CF de los mejillones de cada vaso así como de la mezcla final de heces recolectada.

Para la cuantificación del OA en los mejillones, se extrajeron las glándulas digestivas y se homogeneizaron con metanol 100% (1:4, p:v), se aclaró el extracto mediante 20 minutos de centrifugación a 48000 g y se llevó a cabo el análisis por HPLC-MS. Para determinar la cantidad total de toxina (OA + CF) los extractos metanólicos fueron sometidos a un proceso de hidrólisis alcalina según el procedimiento de Vale and Sampayo (1999) ligeramente modificado. Brevemente, el método consistió en agregar 125 µL de NaOH 2.5N a un 1 mL de extracto, calentarlo a 76 °C durante 40 min en un vial cerrado y finalmente acidificar ligeramente el extracto agregando 125 µL de HCl 2.5N. A continuación dichos extractos se purificaron mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos Strata X (Phenomenex) poliméricos de fase reversa con el fin de eliminar las sales.

Las heces fueron extraídas de la misma manera pero variando la proporción de metanol añadido (1mL heces: 4 mL metanol).

5.2.3. Experimento 3. Depuración de toxinas DSP a través de las heces

Para llevar a cabo este estudio se utilizó un nuevo lote de mejillones recolectados por el INTECMAR del mismo lugar que el empleado en el experimento 1.

En primer lugar se cuantificó, a partir de una submuestra inicial de 10 mejillones del lote, la carga inicial de toxina (T0) que contenían.

Se colocaron otros 60 mejillones del mismo lote en una bandeja de 10 litros de agua de mar filtrada y dotada de un difusor de aire para suministrarles oxígeno. Se dejaron durante 3 horas depurando sin suministro de alimento y a medida que los mejillones iban expulsando heces, estas se iban recolectando. Al finalizar el período de 3 horas (TF), el experimento se detuvo. El contenido tóxico (OA y CF) se cuantificó en una submuestra de 10 individuos y en el pool final de heces recolectado.

Para la extracción del OA y CF tanto de mejillones como de heces, se empleó el protocolo ya descrito en el punto 2.2.

5.2.4. Experimento 4. Pérdidas de toxinas de las heces por redisolución al agua circundante

De nuevo el material biológico empleado en este experimento tenía la misma procedencia que el empleado en los experimentos 1 y 3.

Se colocaron 60 mejillones en una bandeja con las mismas condiciones que en el experimento 3 y se fueron recolectando las heces que se iban formando a lo largo de un período de tiempo de 3 horas. Una vez finalizado el tiempo y recogidas todas las heces, se les retiró el agua sobrante que había quedado en el recipiente donde se habían ido recolectando y se analizó en ella el contenido de toxinas DSP (OA y CF). Esta agua se consideró el tiempo 0 horas.

Las heces recolectadas se colocaron en un vaso de precipitados con 3 mL de agua de mar. A los 30 minutos, 1 hora, 2 y 20, el agua se sustituyó por otra nueva y su contenido en OA y CF fue analizado. A las 20 horas, momento en el que finalizó el experimento (TF), se analizó también el contenido en toxinas de las heces (ver experimento 2).

Para el análisis del OA en agua, se concentró una alícuota de la misma, ligeramente acidificada (pH 3), en un cartucho (SPE) polimérico Strata X 60 mg/ 3mL de fase reversa (Phenomenex) preacondicionado con metanol y agua, seguido de un lavado con 3 mL de agua acidificada (pH 3) y 3 mL de metanol 50% acidificado (pH 3). La toxina retenida se eluyó con metanol 100%. Para determinar el contenido total de

toxina (OA + CF) en agua se realizó, de nuevo, una hidrólisis alcalina de la misma forma que la descrita para mejillones y heces (punto 2.2.).

5.2.5. Experimento 5. Velocidad de depuración de toxinas DSP en mejillones alimentados con partículas no digeribles o de baja digestibilidad.

Los mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) empleados en estos experimentos fueron recolectados por el INTECMAR de la Ría de Muros en mayo del 2009.

Del pool de mejillones inicial se obtuvo una submuestra aleatoria de 10 individuos, que se utilizó para cuantificar el contenido de toxinas en la población al inicio del experimento (T0).

Se introdujeron 100 mejillones en cada uno de los tres tanques de 35 litros utilizados en el estudio. Todos ellos estaban dotados de un sistema de aireación y de recirculación de agua. A cada uno de estos tres tanques se les añadió diariamente y repartido en dos dosis (una por la mañana y otra al mediodía) alimento que estaba constituido por 1 litro de un cultivo de la microalga *Tetraselmis* sp. (3×10^6 cels mL⁻¹) sin suplementar en un caso (control), con un suplemento 50 g de resina Diaion HP-20 (SUPELCO) triturada para reducir su tamaño de partícula, en otro caso, y, en un tercero, con un suplemento de homogeneizado de patatas fritas Lays Light, igualmente trituradas, para aportar Olestra (Olean, Procter & Gamble), un poliéster de ácidos grasos con sacarosa, poco digerible usado como sustituto de las grasas. Para evitar pérdidas de alimento, el circuito de agua se cerró durante 3 horas inmediatamente después de administrar cada una de las dos dosis de alimento diarias. Esta alimentación se mantuvo a lo largo de 4 días. Una vez transcurridos estos, se le extrajo la vianda a 10 mejillones de cada tanque para cuantificar el contenido final de OA libre y de toxina total (OA+CF). Las muestras se congelaron a - 80°C hasta su posterior análisis. Las extracciones se realizaron de la misma forma que en el experimento 2.

5.2.6. Análisis por HPLC-MS

La concentración de toxina presente en cada uno de los extractos obtenidos en los experimentos realizados, fue determinada por HPLC-ESI-MS con un espectrómetro de masas de trampa iónica Thermo LCQ-Deca XPplus con ionización por electrospray

acoplado a un HPLC Thermo Surveyor. La separación cromatográfica se realizó según el método de Quilliam (2003) ligeramente modificado para adaptarlo a una columna de núcleo fundido (HALO C8 50x2.1mm 2.7 μm) con agua:F (95:5) como fase móvil A y CH_3CN : F (95:5) como fase móvil B, siendo F una solución 40 mM formiato de amonio y 1M ácido fórmico en agua. El programa de elución establecido consistió en un gradiente desde el 5 % al 100 % de B en 5 min, se mantuvo durante 5 minutos al 100% y posteriormente se reequilibró a las condiciones iniciales durante 5 minutos antes de la siguiente inyección. El flujo empleado fue de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$ y el volumen de la inyección 5 μL .

Se trabajó con ionización negativa y en modo SIM (selected ion monitoring) monitorizando la relación masa/carga de 803.5. La cuantificación del ácido okadaico se realizó mediante comparación de la respuesta de las muestras con los materiales de referencia (OA-1b) obtenidos del IMB - NRC, Canadá.

La presencia de efectos matriz se comprobó mediante diluciones seriadas de las muestras y se corrigió, cuando fue necesario, usando la dilución más alta.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Excreción de toxinas disueltas

Solo se detectaron trazas de OA en el agua procedente del sifón exhalante, tras realizar una concentración de la muestra de 2000 veces. No se detectaron CF en ningún momento. La media del total de toxina excretada por esta vía debe ser inferior a 0.001 μg , lo que supone menos del 0.07% del total de toxina presente en las heces.

5.3.2. Balance de masas del OA

Al finalizar el experimento los mejillones habían depurado, aproximadamente, 40.35 μg (48.3%) de su contenido tóxico inicial (OA+CF). A pesar de que tanto las cantidades de OA como de CF habían disminuido a lo largo del periodo de depuración, el porcentaje de CF encontradas en los mejillones aumentó ligeramente desde un 33.5% (T0) a un 35.7% (TF) y el de OA libre disminuyó desde un 66.4% (T0) a un 64.3% (TF) (Tabla 5.1).

En las heces el contenido total de toxinas DSP encontrado fue de 39.13 μg , lo que supone, aproximadamente, el 97% del total depurado por los mejillones. Toda la toxina depurada por las heces se encontró en forma de CF, situándose los niveles de OA en todos los casos por debajo del límite de detección (<LOD) (Tabla 5.1).

	Tipo de Toxina	μg Toxina T0 (%)	μg Toxina TF (%)	μg Toxina depurada (%)
Mejillones (GD)	OA	55.86 (66.4)	28.12 (64.3)	27.74 (68.7)
	CF	28.21 (33.5)	15.60 (35.7)	12.61 (31.2)
	CF + OA	84.07 (100)	43.72 (100)	40.35 (48.3)
Heces	OA	No muestreada	<LOD	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 97% del total depurado por los mejillones </div>
	CF	No muestreada	39.13 (100)	
	CF + OA	No muestreada	39.13 (100)	

Tabla 5.1: Contenido y porcentajes de ácido okadaico (OA) y sus formas conjugadas (CF) en la glándula digestiva de los mejillones y en las heces al comienzo y final del experimento. GD = glándula digestiva; T0 = comienzo del experimento; TF = final del experimento; LOD: Límite de detección.

5.3.3. Depuración de toxinas DSP a través de las heces

Tras 3 horas de depuración los mejillones habían perdido, aproximadamente, 1.42 μg (0.99%) de su contenido inicial de toxinas DSP (OA + CF).

En las heces la cantidad total de toxinas DSP encontrado fue de 1.414 μg , lo que supone, aproximadamente, el 99.5% del total depurado por los mejillones. Además el 94.3% del total encontrado en heces estaba constituido por CF y solo el 4.7% lo estaba por OA. Al analizar directamente el contenido en CF de las heces, conseguimos identificar hasta 9 acil-ésteres de OA - C14:0, C15:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:1, C18:2, C18:4, C20:5 (Figura 5.2) pero ningún diol/triol éster o híbridos diol/triol éster.

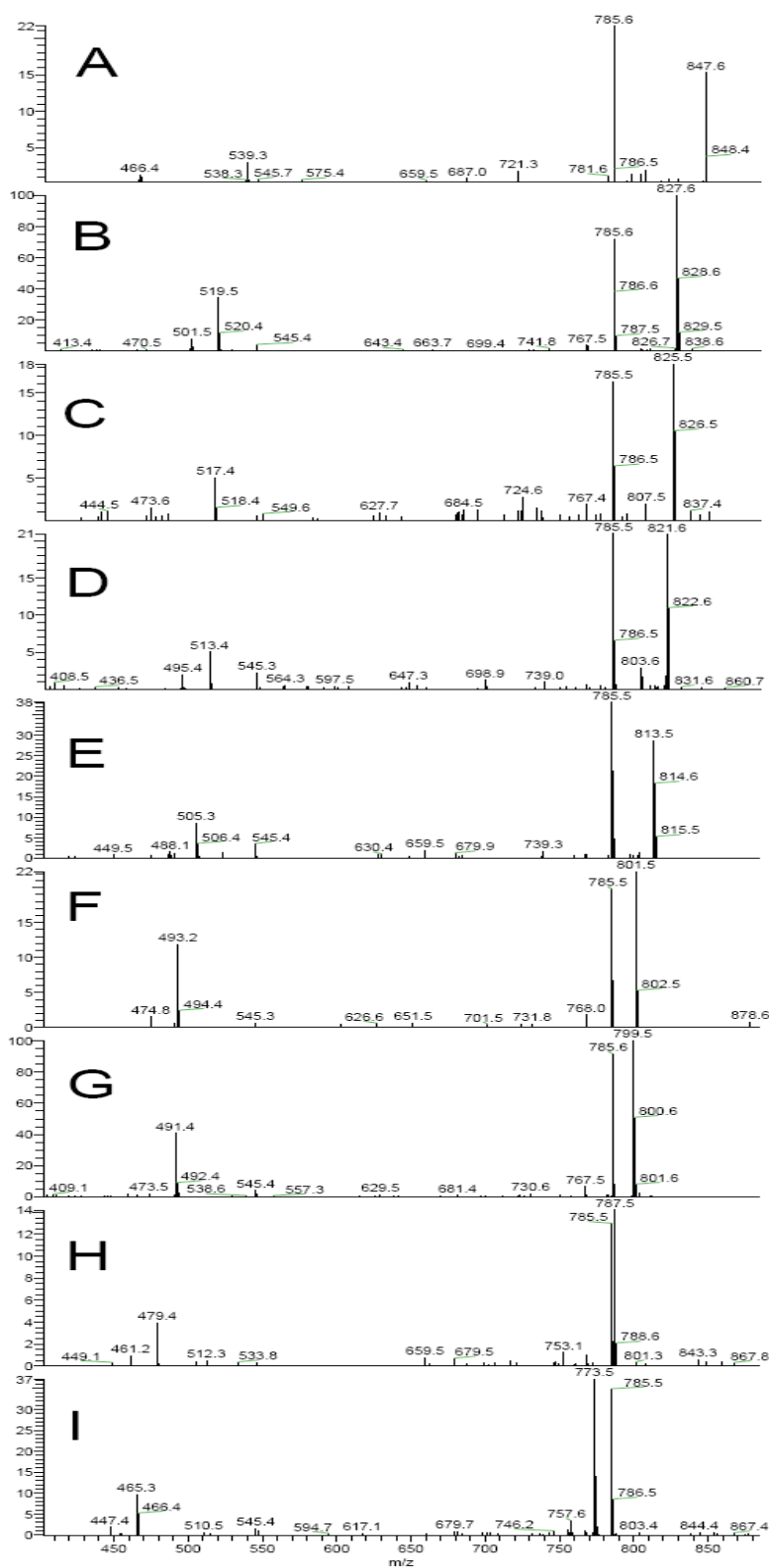


Figura 5.2. Espectros MS2 de las $[M]^-$ de los acil-esteres-OA encontrados en las heces. (A) 20:5-OA (m/z 1087.7), (B) 18:1-OA (m/z 1067.7), (C) 18:2-OA (m/z 1065.7), (D) 18:4-OA (m/z 1061.7), (E) 17:0-OA (m/z 1055.7), (F) 16:0-OA (m/z 1041.7), (G) 16:1-OA (m/z 1039.7), (H) 15:0-OA (m/z 1027.7), (I) 14:0-OA (m/z 1013.7).

5.3.4. Pérdidas de toxinas de las heces por redisolución

No existieron pérdidas significativas de toxina desde las heces por redisolución al agua circundante. No se detectaron ni OA ni CF en el agua hasta transcurridas 20 horas desde la introducción de las heces en el agua. A partir de ese momento, aproximadamente el 3% del contenido total de toxina de las heces (OA + CF) se detectó en el agua como OA libre (45% del total de OA libre en las heces). No se encontraron CF en el agua en ningún momento del experimento.

5.3.5. Velocidad de depuración de toxinas DSP en mejillones alimentados con partículas no digeribles o de baja digestibilidad

Durante los 5 días que duró el experimento, 4 de alimentación y uno de depuración, el contenido total de toxina disminuyó en todos los mejillones analizados. En el tanque control fue donde los porcentajes de depuración observados fueron más bajos (23.5%) con una tasa de depuración de aproximadamente 0.05 día^{-1} . Las diferencias con respecto a los dos tanques tratados fueron importantes, especialmente en el caso de los mejillones alimentados con la resina Diaion HP20 que llegaron a perder hasta casi un 61.5% de su contenido tóxico. En el caso de los mejillones alimentados a base de homogeneizado de patatas fritas Lays-Light, los porcentajes de depuración estuvieron próximos al 40% (Figura 5.3).

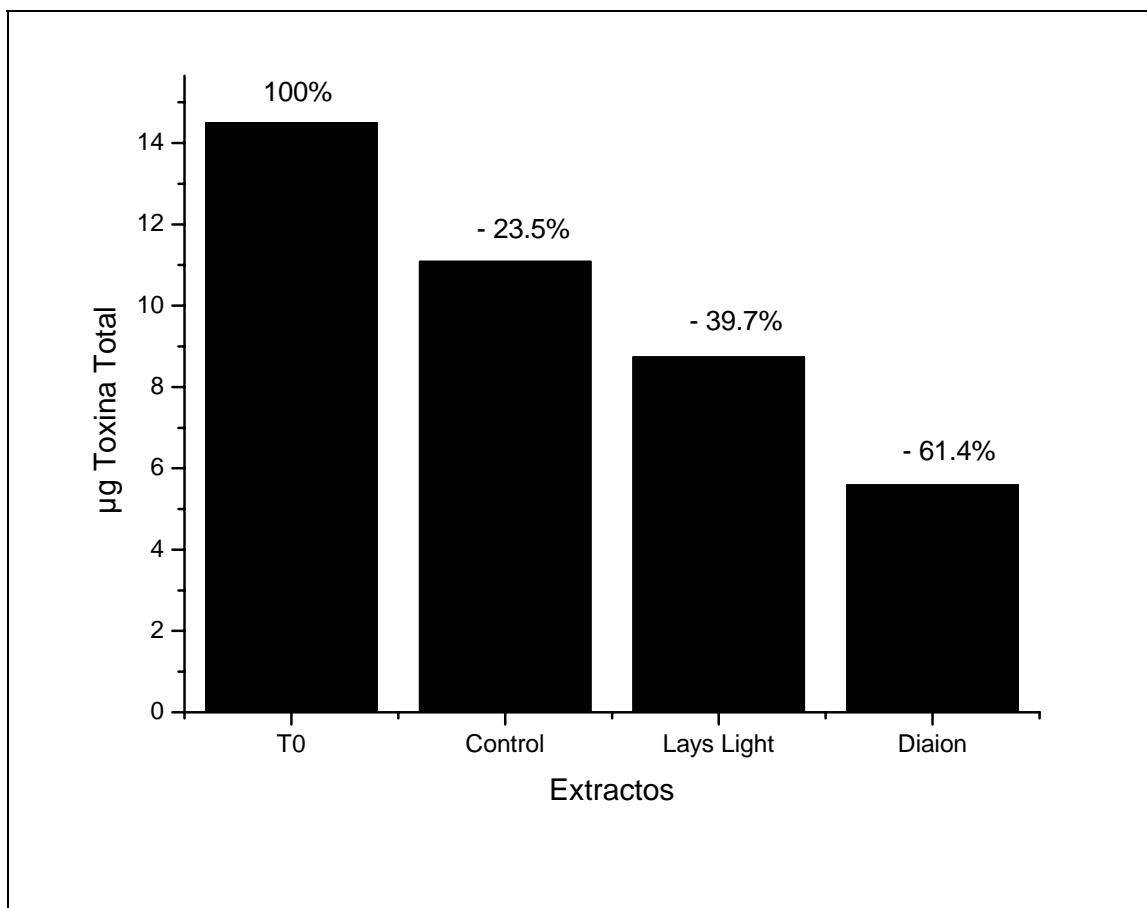


Figura 5.3. Cantidades totales de toxina (OA + CF) y porcentajes de depuración obtenidos en cada uno de los extractos analizados. T0: Extracto inicial; Control: Tanque de mejillones sin tratamiento; Lays Light: Tanque de mejillones alimentados con Lays light que contenían Olestra; Diaion: Tanque de mejillones alimentados con Diaion HP20.

5.4. DISCUSIÓN

5.4.1. Principal vía de depuración de las toxinas DSP

Las tasas de depuración obtenidas en este estudio fueron las esperables de acuerdo a los valores obtenidos previamente en la misma zona (revisado en Blanco *et al.*, 2005).

Debido a que la práctica totalidad de la toxina depurada por los mejillones se detectó en las heces, este mecanismo parece constituir la principal, y prácticamente única vía de depuración de las toxinas DSP de la glándula digestiva de los mejillones.

La existencia de una ruta alternativa de excreción a través del riñón y con salida en forma disuelta a través del sifón exhalante queda prácticamente descartada, ya que solo después de realizar una gran concentración de la muestra, se consiguió detectar algo de toxina en el agua, pero que en ningún caso supuso más de un 0.07 % del total depurado por las heces.

La posibilidad de que las bajas detecciones en el agua se debieran a la existencia de degradación de las toxinas queda descartada debido a los buenos ajustes obtenidos tanto en el balance de masas realizado a lo largo de 6 días como en la evaluación de las pérdidas por heces en 3 horas.

5.4.2. Perfil tóxico de las heces

La mayor parte de las toxinas depuradas a través de las heces estaban compuestas por CF, lo que indica que estas deben constituir la principal forma estructural de depuración en el caso de la toxicidad de tipo DSP.

La baja proporción en la que el OA libre pasó de las heces al agua circundante a lo largo del tiempo, es suficiente para descartar la posibilidad de que la elevada proporción de CF detectadas en las heces se debiera a que la mayoría del OA libre depurado hubiera pasado rápidamente al agua.

Al igual que en estudios previos de nuestro laboratorio (capítulo 6) la gran mayoría de las CF detectadas en heces estaban constituidas por derivados acilados (DTX3). A pesar de ello, hubo un pequeño porcentaje de las mismas que no pudo ser detectado y que probablemente estuviera constituido por derivados todavía más apolares. Torgersen *et al.* (2008b) encontraron que cuando comparaban las tasas medias de depuración de los esteres del grupo del OA medidos directamente con las estimadas tras someter a las muestras a hidrólisis alcalina (Lindegarth *et al.*, 2009), las cantidades obtenidas tampoco eran las mismas. Este hecho también sugiere la posibilidad de que otros derivados del OA estén presentes en las muestras lo que complicaría aún más, si cabe, el perfil tóxico de las mismas.

A medida que avanza el proceso de depuración, la contribución del OA al total de toxina presente en los individuos disminuye mientras que la de CF aumenta. Al igual que en el caso de las heces, las CF detectadas en mejillón estaban compuestas básicamente por derivados acilados (DTX3), no pudiendo ser identificados a lo largo del estudio ningún otro tipo de derivado del OA (ni más ni menos polar). Según los datos obtenidos en este estudio, un incremento de las tasas de depuración con la consecuente disminución de la concentración total de toxina, parece llevar asociado un incremento en los porcentajes de CF. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Vale and Sampayo (1999), quienes encontraron que era a medida que incrementaban los niveles de intoxicación cuando también se producía un aumento en los porcentajes de formas conjugadas del OA (a las que probablemente los diol-éster procedentes del plancton contribuyan en gran medida). Los mayores porcentajes de CF asociados a elevadas tasas de depuración obtenidos en este estudio indican que la esterificación del OA, que tiene lugar en las células digestivas de los mejillones (capítulo 6), parece constituir un importante mecanismo enzimático implicado en la detoxificación.

Las CF cuantificadas indirectamente mediante hidrólisis alcalina en los mejillones, no representaron en ningún momento más del 36% del contenido tóxico de los mismos lo que indica que no tienden a acumularse permanentemente en el individuo a lo largo del proceso de depuración. Estos porcentajes son similares a los obtenidos por otros autores para la misma especie (Fernández *et al.*, 1996; Mountfort *et al.*, 1999; Suzuki and Yasumoto, 2000; Suzuki and Mitsuya, 2001; Vale and Sampayo, 2002a,b; McNabb and Holland, 2003; Vale, 2004; Jørgensen *et al.*, 2005; Vale, 2006b; Torgersen *et al.*, 2008b), pero menores a los encontrados en mejillones portugueses en los que, en ocasiones, los ésteres apolares han llegado a suponer entre un 70 y un 90% del contenido tóxico total (Vale and Sampayo, 1999). Las variaciones en la contribución de las CF al contenido tóxico total se deben principalmente al balance que se establece entre las tasas de acilación y de depuración de los compuestos DTX3. Dichas tasas pueden llegar a ser extremadamente variables tanto entre toxinas como entre especies.

Los porcentajes de CF encontrados en este estudio se podrían explicar si las tasas de eliminación de los derivados DTX3 fueran ligeramente superiores a las de su formación (acilación) de tal forma que la eliminación de estos compuestos se produjera a medida que se van formando en los bivalvos. En el caso por ejemplo de la ostra *Ostrea edulis*, las mayores tasas de acilación que presenta respecto a los mejillones

Mytilus galloprovincialis, con los que comparte tasas de depuración de compuestos DTX3 muy similares, son probablemente las responsables de que, como encontraron Torgersen *et al.* (2008b), dichos derivados se acumulen de forma más notoria en la primera de las especies mencionadas.

Hasta la fecha no existen estudios en los que se comparen las tasas de formación y depuración de los compuestos DTX3 en los mejillones. Las tasas de acilación que se han publicado para el mejillón *Mytilus galloprovincialis* han sido siempre bajas (Fernández *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 1999, 2005; Moroño *et al.*, 2003). Respecto a las tasas de depuración de las toxinas DTX3 existe mayor discrepancia ya que en ocasiones resultaron ser menores a las del OA parental (Torgersen *et al.*, 2008b) y en otras al revés (Vale, 2004, 2006a).

Varios transportadores del tipo MRP (proteínas relacionadas con la resistencia a multidroga), pertenecientes a la superfamilia de los transportadores ABC, han sido identificados en *Mytilus edulis* (Luedeking *et al.*, 2005) y *M. galloprovincialis* (Kurelec, 1992). Estos compuestos son los responsables del transporte de una gran variedad de componentes a través de las membranas biológicas y su función en organismos acuáticos se relaciona con la protección contra los efectos negativos que provoca la exposición a componentes orgánicos tóxicos (Waldmann *et al.*, 1995; McFadzen *et al.*, 2000). Si realmente juegan un papel fundamental en el mecanismo de defensa reduciendo la acumulación de compuestos tóxicos en las células, nos encontraremos que cuanto más activos se encuentren dichos compuestos MRP, mayor será la cantidad de OA que puedan transportar fuera de las células del mejillón y por tanto mayor serán también los porcentajes de ésteres que encontraremos en los individuos.

5.4.3. Vías alternativas de eliminación. Esférulas de excreción.

El inducir la formación de esférulas de excreción mediante el uso de sustancias no digeribles, puede suponer una alternativa a los métodos de depuración naturales de las toxinas. Dichas esférulas se eliminarían de las células mediante mecanismos de exocitosis y luego al exterior por las heces, con lo que su eliminación podría realizarse de manera más rápida y eficaz con respecto a los mecanismos convencionales de difusión y no requeriría el paso a través de la membrana.

En este estudio observamos como los dos tipos de alimento no digeribles empleados como posibles acelerantes del proceso depurativo mostraron tener efectos positivos, favorecieron una más rápida eliminación de las toxinas de los mejillones. En el caso de la alimentación con Lays Light que contiene Olestra, los porcentajes de depuración duplicaron a los obtenidos en el tanque control. Se conoce que este compuesto es sólo parcialmente digerible por los mejillones y que las sustancias lipofílicas tiene afinidad por él, ya que afecta al transporte de determinados compuestos como el antraceno (Moore *et al.*, 1997). Además Moser and McLachlan (1999) demostraron que la eficiencia de excreción mediante las heces, en humanos, de toda una serie de contaminantes lipofílicos (PCDD/Fs, PCBs, HCB), era mayor en los individuos a los que se les había suministrado una dieta rica en Olestra que en otros que habían ingerido la misma dieta sin este compuesto. No obstante la condición del Olestra de sustancia no fácilmente biodegradable, no lo hace especialmente recomendable para su uso a gran escala.

Por su parte la resina de adsorción Diaion HP20, resultó ser mucho más efectiva, ya que prácticamente triplicó la depuración obtenida en los mejillones control. Este tipo de resina poliaromática ya ha sido empleada en numerosas ocasiones como muestreador pasivo (SPATT) para adsorber las toxinas del agua con resultados satisfactorios (Mackenzie *et al.*, 2004; Fux *et al.*, 2008, 2009; Pizarro *et al.*, 2008, 2009; Rundberget *et al.*, 2009; Mackenzie, 2010).

A pesar de que ambos tratamientos parecen ser efectivos para incrementar la velocidad de depuración de las toxinas DSP en los mejillones, la implicación del mecanismo concreto (formación de esférulas de excreción) no pudo ser constatada en este estudio y necesitará investigaciones futuras. La excreción extracelular mediante esférulas ya ha sido reportada para la eliminación de metales en el berberecho *Cerastoderma edule* (Owen, 1955).

CAPÍTULO 6

ESTERIFICACIÓN DEL ÁCIDO OKADAICO EN EL MEJILLÓN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Introducción

Como ya se indicó en la introducción de esta tesis (Apartado 4.2.), el grupo del ácido okadaico (OA) y las dinofisitoxinas (DTXs) incluye numerosos derivados tales como diol-ésteres (Hu *et al.*, 1992b; Norte *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 2003a; Suárez-Gómez *et al.*, 2005), acil-derivados (ésteres con ácidos grasos “DTX3”) (Yasumoto *et al.*, 1985; Marr *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1999; MacKenzie *et al.*, 2002; Vale and Sampayo, 2002a,b; Jørgensen *et al.*, 2005; Torgersen *et al.*, 2008b; Vale, 2010) y ésteres híbridos (Torgersen *et al.*, 2008a).

De estos compuestos los únicos que hasta la fecha no han sido detectados en el fitoplancton (salvo cantidades traza en muestras de plancton (Vale, 2010)) han sido las dinofisitoxinas 3 (DTX3) y los ésteres híbridos, por lo que se cree que se originan en la propia glándula digestiva de los bivalvos mediante esterificación (Lee *et al.*, 1989; Torgersen *et al.*, 2008a). Aunque actualmente el significado metabólico de esta biotransformación se desconoce, la aparición de estas formas estructurales como componentes mayoritarios de las heces (en ocasiones únicos) de los mejillones (capítulo 5), parecen relacionarla directamente con el proceso de depuración de las toxinas en los bivalvos.

Recientemente, se sugirió la posibilidad de que las bacterias estuvieran involucradas en el proceso de esterificación (Vale, 2010). Si así fuera, necesariamente la síntesis de los compuestos acilados debería producirse en el lumen del digestivo y no dentro de las propias células digestivas con lo que la transformación afectaría principalmente a la capacidad de absorción de las toxinas, ya que al tratarse los ésteres de compuestos más apolares que el OA libre difundirían más fácilmente a través de las membranas. Sin embargo y como ya se explicó en el párrafo anterior, la aparición de estos compuestos como mayoritarios en la heces, aun cuando el OA libre lo era en la glándula digestiva del mejillón (capítulo 5), parecen vincular más directamente al proceso de esterificación con la depuración de las toxinas que con la absorción de las mismas por parte de las células digestivas.

La esterificación de xenobióticos con ácidos grasos en invertebrados aunque en pocas ocasiones, ya ha sido descrita, siendo los orgánulos asociados a la fracción microsómica los principales implicados en este tipo de biotransformación (Connat and

Diehl, 1986; Duedendorfer and Maroy, 1986; Janer *et al.*, 2004, 2005; Labadie *et al.*, 2007).

La síntesis de ésteres de xenobióticos puede estar catalizada por una amplia variedad de enzimas con actividad aciltransferasa y esterasa (Dodds, 1995). La enzima acil-CoA: colesterol aciltransferasa (ACAT), responsable de la esterificación del colesterol en humanos, ha sido localizada principalmente en el retículo endoplasmático rugoso (Chang *et al.*, 1995, Khelef *et al.*, 1998) y en una fracción paranuclear asociada con las membranas del retículo endoplásmico y cerca de la denominada red trans-golgi (TGN) que está relacionada con el compartimiento endocítico (Khelef *et al.*, 2000). En los moluscos, la actividad aciltransferasa ha sido descrita en el aparato de Golgi y vesículas relacionadas en la oreja de mar (Kataoka and Yamamoto, 1985), y en fracciones microsómicas aisladas de la glándula digestiva de la ostra *Crassostrea virginica* (Janer *et al.*, 2004) y del mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Janer *et al.*, 2005). También se ha demostrado *in vivo* que estas enzimas desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de los estrógenos en *M. edulis* (Labadie *et al.*, 2007).

El presente capítulo incluye un trabajo con dos objetivos (asociados a los **Objetivos 4 y 5**). El primero de ellos comprobar si las bacterias son las principales responsables de la acilación del OA y el segundo determinar si dentro de las células existe actividad de Acil-CoA:OA aciltransferasa y si es así, en qué parte de la misma reside. Para ello se realizó un primer estudio en el que se emplearon dos lotes de mejillones, uno de los cuales se sometió a un tratamiento con antibióticos y el otro no. Ambos lotes se intoxicaron de la misma manera, con microcápsulas que contenían OA durante una semana tras la cual, se cuantificó la cantidad de formas conjugadas de OA formadas. En el segundo estudio se probó la trans-esterificación *in vitro* del palmitoil-CoA al OA en diversas fracciones subcelulares de la glándula digestiva del mejillón.

ARTÍCULO 5

Rossignoli, A.E., Fernández, D., Regueiro, J., Mariño, C., Blanco, J., 2011. Esterification of okadaic acid in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 57: 712-720.



Esterification of okadaic acid in the mussel *Mytilus galloprovincialis*

Araceli E. Rossignoli, David Fernández, Jorge Regueiro, Carmen Mariño, Juan Blanco*

Centro de Investigacións Mariñas (CIMA), Pedras de Corón, s/n. Apdo. 13, 36620 Vilanova de Arousa (Pontevedra), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2010

Received in revised form 2 February 2011

Accepted 8 February 2011

Available online 15 February 2011

Keywords:

Acyltransferase activity

Acyl-CoA:OA acyltransferase

Acylation

Esterification

Bacteria

Endoplasmic reticulum

Microsomes

Okadaic acid

Palmitoyl-OA

fatty acids

Depuration

Detoxification

ABSTRACT

Okadaic acid and other toxins of the diarrhetic shellfish poisoning (DSP) group are transformed mainly to their acyl-derivatives in bivalves. Some recent studies suggest that bacteria present in the bivalve gut could contribute substantially to the acylation of the toxins. By feeding microcapsules containing okadaic acid to mussels we have shown unequivocally that the ingested okadaic acid is nearly completely transformed to its fatty acid esters (acyl-derivatives). Treating mussels with antibiotics did not have any significant effect on the acylation of the supplied okadaic acid, suggesting that bacteria do not play any significant role in this process. The microsomal and mitochondrial subcellular fractions of the cells of the digestive gland have been shown to have contain enzymes that are able to transfer a fatty acid molecule from Coenzyme A to okadaic acid (so, that have Acyl-CoA:OA acyltransferase activity). This activity was related to that of the enzyme Cytochrome C reductase (NADPH), a marker of endoplasmic reticulum, suggesting that this organelle is the main responsible for the acylation process. Acylation of DSP toxins seems to be a key step in the depuration of these toxins from mussels, as these compounds are found in feces as acyl-derivatives. This is probably true for most bivalves. The proportion of acyl-derivatives accumulated can point to the key process of the depuration: acylation or excretion of acylated derivatives. In the mussels *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis* and in *Donax trunculus*, the first process seems to be the most important, but in most bivalve species it seems to be the second one. Other aspects of the relationship between depuration and acylation are also discussed.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) is a severe gastrointestinal illness caused by the consumption of shellfish that have accumulated toxins from some phytoplankton species. The principal toxins responsible for DSP in humans are the lipophilic polyether compounds okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1 (DTX1), dinophysistoxin-2 (DTX2) (Yasumoto et al., 1985; Hu et al., 1992a) and their acyl-derivatives generically known as DTX3 (Vale and Sampayo, 2002b; García et al., 2005, 2006) (Fig. 1). DSP toxins are potent serine/threonine protein phosphatase inhibitors (Cohen et al., 1990; Mestrovic and Pavela-Vrancic, 2003) that are

involved in several physiological processes, including cell cycle regulation and modulation of intracellular protein metabolism. They have been shown to be potent tumor promoters on mouse skin (Fujiki and Suganama, 1993).

DSP toxins are produced by some species of *Dinophysis* (Della Loggia et al., 1993; Yasumoto et al., 1980; Reguera et al., 1990; Edler and Hageltorn, 1990; Kat, 1983; Lassus et al., 1985; Giacobbe et al., 2000; Lee et al., 1989) and *Prorocentrum* (Lawrence et al., 1998; Heredia-Tapia et al., 2002; Gayoso et al., 2002; Bauder et al., 2001; Koike et al., 1998; Quilliam et al., 1996). Additionally to the main toxins, a number of toxin derivatives have been found in these species, as "DTX4" (Hu et al., 1995b), "DTX5" (Hu et al., 1995a) (Cruz et al., 2006) (Paz et al., 2007), DTX6 (Suárez-Gómez et al., 2001) and diol-esters (Fernández et al., 2003; Hu and Marr, 1992b; Norte et al., 1994; Suárez-Gómez et al., 2005) (Fig. 1).

* Corresponding author. Tel.: +34 886206364; fax: +34 886206372.
E-mail address: juan.blanco@cimacoron.org (J. Blanco).

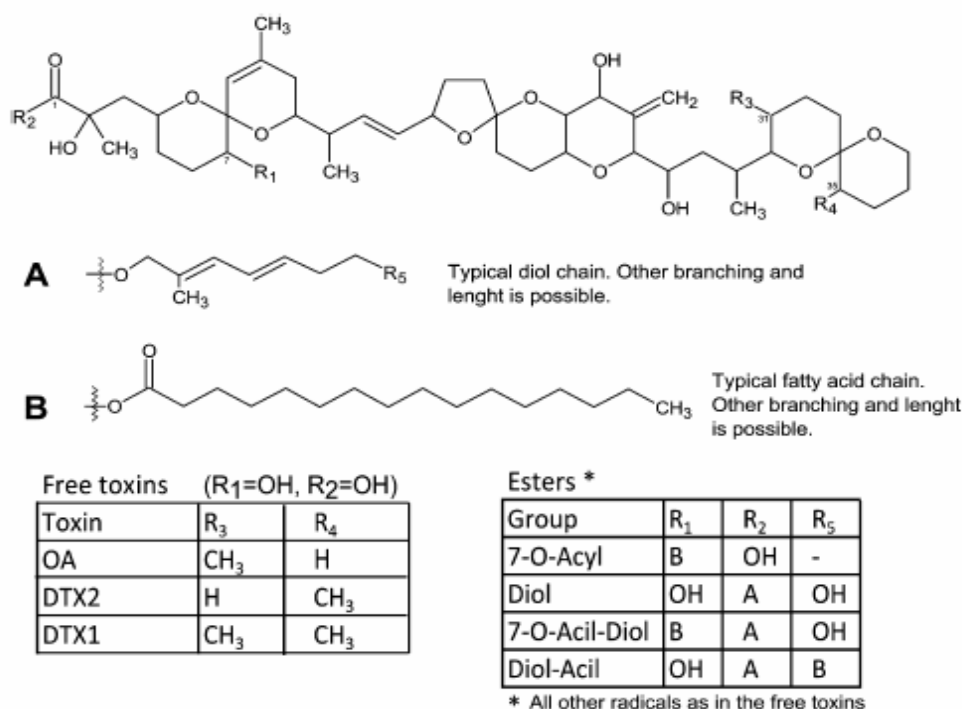


Fig. 1. Structures of okadaic acid group toxins.

When these compounds enter bivalves they undergo a series of transformations, mainly hydrolysis and acylation, that give, at least, free toxins (from diol-esters and DTX4-DTX5-DTX6) and fatty acids esters, as "DTX3" (Fig. 1) (Yasumoto et al., 1985; Marr et al., 1992; Fernández et al., 1996; Suzuki et al., 1999; MacKenzie et al., 2002; Vale and Sampayo, 2002a, 2002b; Jørgensen et al., 2005; Torgersen et al., 2008b; Vale, 2010) or hybrid esters (Torgersen et al., 2008a) (esters of fatty acids with diol-esters).

Of the two processes—hydrolysis and acylation—known to take place in bivalves, the first seems to be related to digestion (extra or intracellular). The second, notwithstanding, has not been unequivocally associated to any particular process and consequently its metabolic meaning is not known. Recently, Vale (2010) hypothesized that, at least in some bivalves, acylation of okadaic acid and related compounds could be produced by bacteria acting in the gut lumen of the bivalves during digestion. If that were true, the acylation could affect the absorption of the toxins, as the generated esters are less polar than the free toxins should pass the membranes more easily, but the process would probably not be directly involved in the depuration of the toxins. Notwithstanding, in a series of unpublished experiments (preliminary and focused on a different subject), we have found that, even when free OA was found in considerable amounts in the digestive gland of mussels, in feces, nearly all the detected OA was found in the esterified form, thus suggesting that acylation could be an important step in the depuration of DSP toxins from the bivalves.

The esterification of some xenobiotics with fatty acids as a part of their elimination mechanism has been described in some invertebrates. This is the case of steroids in the

bivalves *Mytilus edulis* (Labadie et al., 2007), *Mytilus galloprovincialis* (Janer et al., 2005), *Crassostrea virginica* (Janer et al., 2004), in the gastropod *Ilyanassa obsoleta* (Gooding and LeBlanc, 2001)—where it was the major pathway of testosterone metabolism—or in arthropods (Duedendorfer and Maroy, 1986; Connat and Diehl, 1986).

The synthesis of esters of xenobiotics is catalyzed by a wide variety of enzymes with acyltransferase capability (Dodds, 1995). In mollusks, this kind of activity has been described in the Golgi apparatus and associated vesicles in the abalone (Kataoka and Yamamoto, 1985) and in microsomal fractions isolated from the digestive gland of two bivalves (the oyster *C. virginica* (Janer et al., 2004) and the mussel *M. galloprovincialis* (Janer et al., 2005)) and therefore associated mainly with the endoplasmic reticulum (ER) and/or Golgi apparatus. In humans, the enzyme acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT), responsible for the esterification of cholesterol, has been localized in the ER (Chang et al., 1995; Khelef et al., 1998); in a paranuclear fraction associated with the membranes of the ER and near the so-called trans-golgi network (TGN), an endocytic compartment, (Khelef et al., 2000).

Taking into account all this information we hypothesized that, in mussels, OA esterification is an important step in the depuration of this toxin and that this process takes place inside the cells of the digestive gland by the action of acyltransferases associated to the ER. Consequently, we have focused this work on the identification of the place and the mechanism of acylation of OA in mussels. In order to know if this process is carried out by bacteria in the lumen of the digestive tube, the effect of a treatment with antibiotics was assessed. In order to know if mussel cells have the

enzymatic machinery required to perform the acylation of the toxins, an assay to prove activity of acyl-CoA:OA acyltransferase has been carried out, using the "a priori" most likely subcellular fractions with such an activity.

2. Material and methods

2.1. Biological material and chemicals

Uncontaminated mussels (*M. galloprovincialis*) were obtained from a culture raft in Galicia, Palmitoyl-CoA (P9716), ATP (A7699), protease inhibitor cocktail (P2714) and Cytochrome C Reductase (NADPH) assay kit (CY0100) were obtained from Sigma–Aldrich. Water was purified through a MilliQ-gradient system, fed with an Elix Advantage 10, both from Millipore. Acetonitrile and methanol of HPLC-grade were obtained from Rathburn and Labscan, respectively. Okadaic acid was purchased from Calbiochem and Wako. Penicillin and streptomycin sulfate were obtained from Biomedical Inc.

2.2. Experiment 1. Effect of antibiotics on the acylation of OA

2.2.1. Experimental conditions

10 five-mussel groups were placed in trays containing 2.5 L of filtered autoclaved seawater that was aerated continuously and replaced every day. Five out of the ten trays were treated with antibiotics (1000 Units/L Penicillin and 0.1 mg/mL Streptomycin sulfate) for 7 days and the other 5 trays received no treatment.

After that period, mussels were fed with gelatin-acacia microcapsules containing okadaic acid (Rossignoli et al., 2011). The supplied diet was constituted by approximately 2 g of microcapsules plus 25 mL of a culture of *Tetraselmis* sp. (3×10^6 cells mL⁻¹) plus 0.1 g of clay. The food was supplied twice a day for 10 days.

All mussels in one tray of each treatment were sacrificed and analyzed every two days between day 3 and day 11 after the start of feeding with microcapsules. Feces were collected from the bottom of each tray every day, pooled (for each tray) at the end of the experiment and analyzed at the same time than mussels of their corresponding tray (to obtain one sample per tray).

2.2.2. Extraction and toxin analysis

Mussels were dissected and the toxins from digestive gland (where practically all DSP toxins are stored—Blanco et al., 2007) were extracted and analyzed. Toxins were also extracted and analyzed from collected feces.

The digestive glands were homogenized in methanol (100%), in a proportion of 1:4, w:v, with an Ultraturax T25 Basic (IKA). The homogenate obtained was centrifuged at 48 000g for 20 min to clarify the solution. The supernatant was analyzed to quantify free OA. In order to quantify the total amount of toxin (OA and its conjugated forms (CF)) the extracts were subjected to alkaline hydrolysis following, with small modifications, the procedure of Vale and Sampayo (1999). The procedure consisted in adding 125 µL of NaOH 2.5 N to a 1 mL of extract, keeping it at 76 °C in a tightly closed vial for 40 min, and finally turning the

extract to slightly acid conditions by adding 125 µL of HCl 2.5 N. Feces were subjected to the same procedure.

OA concentration in each extract was determined by HPLC-ESI-MS with a Thermo LCQ-Deca XP plus ion trap mass spectrometer with electrospray ionization coupled to a Thermo HPLC Surveyor system. The technique of Gerssen et al. (2009), slightly modified, was used. A Gemini NX column (C18 100 × 2 mm, 3 µm) was used under alkaline conditions (pH 11) with water as mobile phase A and acetonitrile/water as mobile phase B (90:10, v:v). Both mobile phases contained 6.7 mM ammonium hydroxide. The gradient program went from 25% to 95% B over 5 min, held for 3 min and then re-equilibrated at the starting conditions for 3.5 min prior to the next injection. Flow rate was 400 µL min⁻¹ and injection volume 5 µL.

The mass spectrometer was operated in negative ionization mode and SIM (selected ion monitoring) targeting the 803.5 m/z [M – H]⁻¹ ion. Quantification of OA was carried out by comparing the response in the sample with that of reference materials (OA-1c) obtained from IMB – NRC, Canadá.

The presence of matrix effect was checked and corrected, when it was needed, by standard addition method (spiking).

2.3. Experiment 2. Acyl-CoA:OA transferase activity of mussel digestive gland cells

2.3.1. Isolation of microsomal and mitochondrial fractions of digestive glands cells

Digestive glands of 7 mussels were dissected, pooled, weighed, cut into small pieces of approximately 2 × 2 mm and homogenized by five strokes, at moderate speed, in a Potter-Elvehjem glass Teflon homogenizer, in five volumes (w/v) of a cold buffer which contained TRIS 10 mM, 150 mM KCl, 0.5 M sucrose and protease inhibitor cocktail, pH 7.6. Two aliquots were obtained, that were subsequently processed independently.

The subcellular fractions of each aliquot were separated by differential centrifugation successively at 755g (10 min) for nuclei and cell debris, 11 000g (15 min) for lysosomes, and 20 500g (15 min) for mitochondria. The last supernatant was ultrafiltered through an Ultrafree-MC of 100 kDa of nominal pore size (Millipore) at 13 000g (1 h) in order to obtain a concentrated microsomal fraction.

2.3.2. Acyl-CoA:OA acyltransferase activity assay

All obtained fractions were checked for activity of the ER marker Cytochrome C reductase (NADPH), with an assay kit (Sigma–Aldrich) following the supplier's instructions.

The assay for the esterification of okadaic acid was based on the method described by Janer et al. (2004) with slight modifications. Microsomal and mitochondrial fractions were incubated at 37 °C for 60 min with 19 µM OA, 100 µM palmitoyl-CoA and 10 mM ATP, in 100 mM sodium acetate buffer at pH 6.0. The reaction was stopped by the addition of 1 mL of methanol to the assayed volume (250 µL). The samples were vortexed immediately and centrifuged for 20 min at 48 000g. Blank samples, using heat-inactivated microsomal and mitochondrial fractions (100 °C for 5 min), were also tested. All tests were carried out in duplicate (one for each aliquot).

2.3.3. Toxins analysis

Palmitoyl-OA in each extract was quantified by HPLC-ESI-MS with a Thermo TSQ Quantum Access triple quadrupole mass spectrometer coupled to a Thermo Accela ultra high pressure HPLC. The chromatographic separation was carried out using the method of Gerssen et al. (2009), slightly modified, as in Experiment 1. The mass spectrometer was operated in negative ionization MRM mode. Transitions 803.5 → 255.1 and 803.5 → 563.5 *m/z* for OA and 1041.7 → 255.1 and 1041.7 → 785.5 for palmitoyl-OA (C16:0) were recorded using 48 eV collision energy for obtaining the 255.1 fragment and 43 eV for the other.

OA reference material was as in Experiment 1. A C16:0-OA (palmitoyl-OA) “in house” reference solution for qualitative analysis was obtained from digestive glands of toxic mussels by means of purification on Sephadex LH-20, followed by semipreparative reverse phase HPLC in a Luna C18 300 × 10 mm 5 μm column (Phenomenex). An aliquot of this standard was subjected to alkaline hydrolysis as in Experiment 1, and the concentration of the OA released was then quantified using an OA standard. No detectable palmitoyl-OA could be detected after hydrolysis, hence the efficiency of the process was assumed to be 100%. As the response obtained in the mass spectrometer is higher for okadaic acid than for palmitoyl-OA, the concentration of the latter was computed indirectly through quantification of the OA obtained after hydrolysis and by correcting the concentration with the dilution produced by the hydrolysis process (addition of NaOH and HCl). All extracts were also analyzed directly, using the “in house” palmitoyl-OA reference solution yielding very similar results but with slightly higher variability due to the fact that the mass spectrometer is less sensitive for palmitoyl-OA than for free OA.

3. Results

3.1. Acylation of OA in antibiotic-treated and non-treated mussels

At the end of the experiment, the mussels reached a total toxin concentration of 0.5 and 0.54 μg OA g⁻¹ of digestive gland in the control and the antibiotic-treated tanks, respectively. Of the total accumulated toxins (OA + CF), initially only a small amount was found as CF in the digestive gland but both the amount and the proportion of these toxins increased progressively until the end of the experiment (Fig. 2). The antibiotic-treated and non-treated mussels showed similar results (*p* = 0.963).

Feces contained mainly conjugated forms of OA, and only a small percentage of free OA (also found in several preliminary unpublished experiments). That was true both, for the control and for the mussels treated with antibiotics (Fig. 3). As it was found in mussels, no statistically significant differences in CF content were found between the feces from the control and those from the antibiotic-treated mussels (*p* = 0.825).

Nine acyl-derivatives were unequivocally detected as part of the CF: C14:0, C15:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:1, C18:2, C18:4, C20:5 (Fig. 4). Nevertheless, these are not the only compounds involved, as the amount of OA that could

be recovered from the outflow of a chromatographic run is about 70% of the injected.

3.2. Acyl-CoA:OA acyltransferase activity

Two out of the four tested subcellular fractions—mitochondrial and microsomal—showed activity of the ER marker cytochrome C reductase (NADPH), suggesting that the fragments of the ER are distributed between these two fractions. The heat-inactivated microsomal and mitochondrial fractions used as blank showed no activity of the marker enzyme (values of the assay were slightly negative) suggesting that the treatment was successful in inactivating the enzymes in the fraction.

In the two fractions (two duplicates of each of them), the incubation of OA with palmitoyl-CoA yielded palmitoyl-OA, in an amount that was proportional to the measured Cytochrome C reductase (NADPH) activity (Fig. 5). On the other hand, in the heat-inactivated fractions, no detectable amount of palmitoyl-OA was produced, indicating that its production is dependent on the enzymatic machinery present in the fraction. The production of palmitoyl-OA (in the two studied fractions together) was at least 700 times higher in the raw than in the heat-inactivated fraction, as it was between 703 and 1050 times the LOD, and the production in the heat-inactivated fractions were below the LOD.

4. Discussion

4.1. Effect of bacteria in acyl-OA formation

Bacteria do not seem to contribute substantially to the acylation of OA as no significant difference in CF production between non-treated and antibiotic-treated mussels was found. Unless the putatively esterifying bacteria was completely resistant to the supplied antibiotics, the lack of differences indicates that transformation should take place inside the digestive gland after the toxins are absorbed. In that case, the possibility that bacteria could play a key role in acylation of OA in bivalves, as suggested by Vale (2010), would not be real, at least for the blue mussel *M. galloprovincialis*.

4.2. Okadaic acid forms in feces

Most okadaic acid is eliminated from mussels as CF. Even when OA was only supplied in free form, in feces, only a small proportion of free OA was found, being detected mostly as CF. Most of those CF are 7-O-acyl-esters but the precise contribution of the particular acyl-esters found to the total amount of conjugated forms of OA cannot be established as no reference materials are available to quantify those compounds. The most frequently found in bivalves (Yasumoto et al., 1985; Marr et al., 1992; Wright, 1995; Hallegraef et al., 1995; Suzuki et al., 1999; EU/SANCO, 2001; Vale, 2006a; Torgersen et al., 2008c) were analyzed but it seems likely, in sight of the recovery of OA from the chromatographic runs, that other derivatives of OA more apolar than the 7-O-acyl-esters could also be present (as could be 7-O-Acyl and diol hybrid esters (Torgersen et al., 2008c)).

Nevertheless, these findings make clear that an apolar metabolism, similar to that described for steroids in other

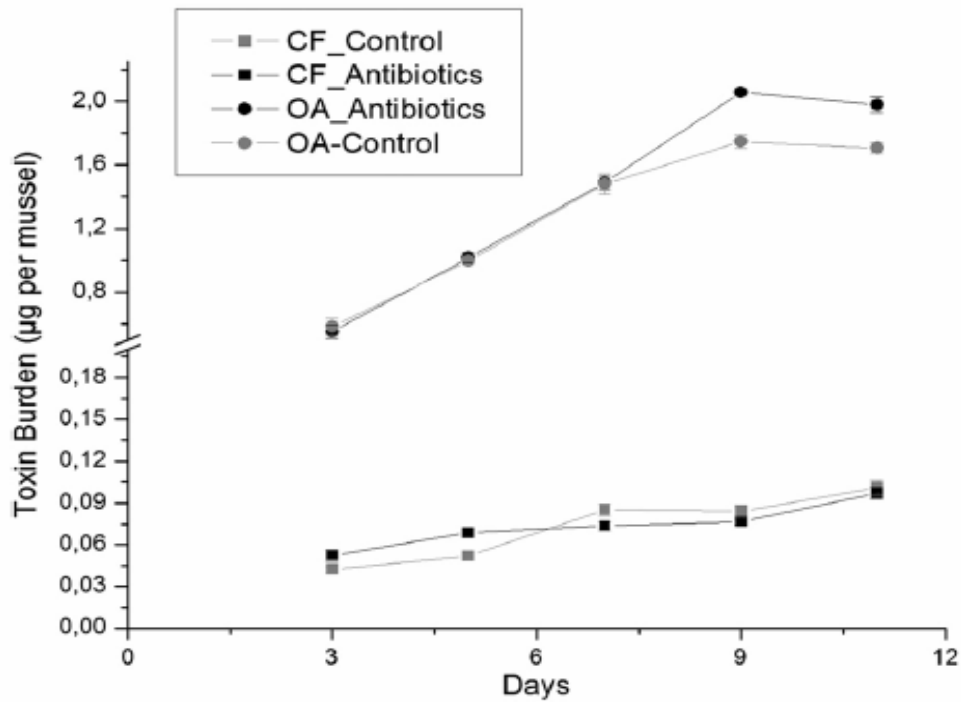


Fig. 2. Toxin amount, in free and conjugated form, found in mussels treated and not treated (control) with antibiotics.

species of mollusks (Labadie et al., 2007; Janer et al., 2005, 2004), in which esterification is the main transformation, is the most important mechanism involved in the depuration of DSP toxins in mussels and probably a key mechanism in other bivalves.

4.3. Acyl-CoA:OA acyltransferase activity

There is acyl-CoA:OA transferase activity at least in the two subcellular fractions that showed activity of the marker enzyme for ER. The existence of a clear relationship

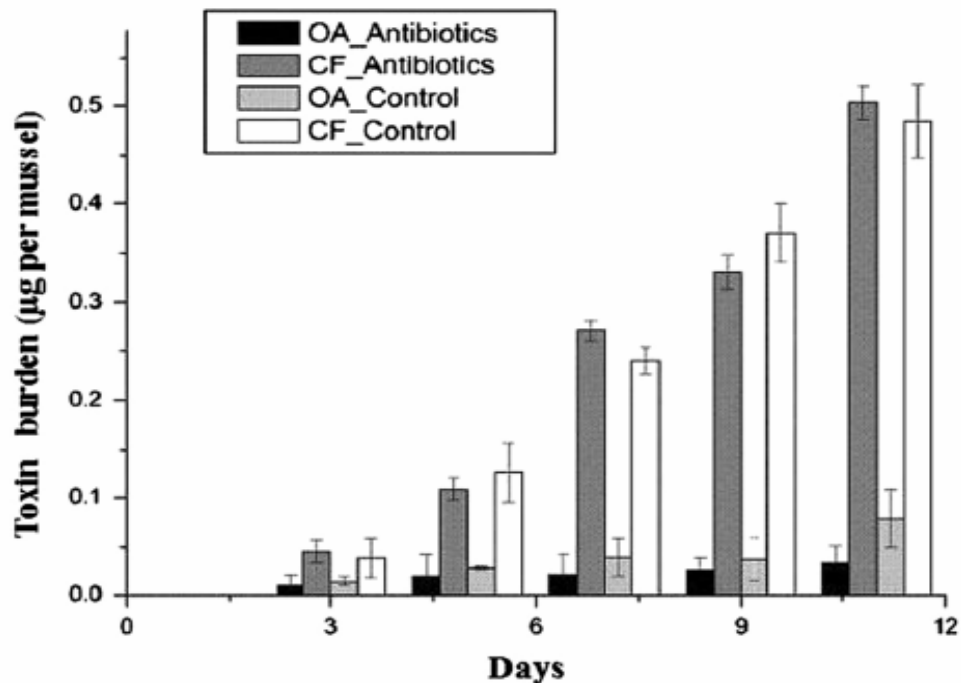


Fig. 3. Toxin amount, in free and conjugated form, found in feces of mussels treated and not treated (control) with antibiotics.

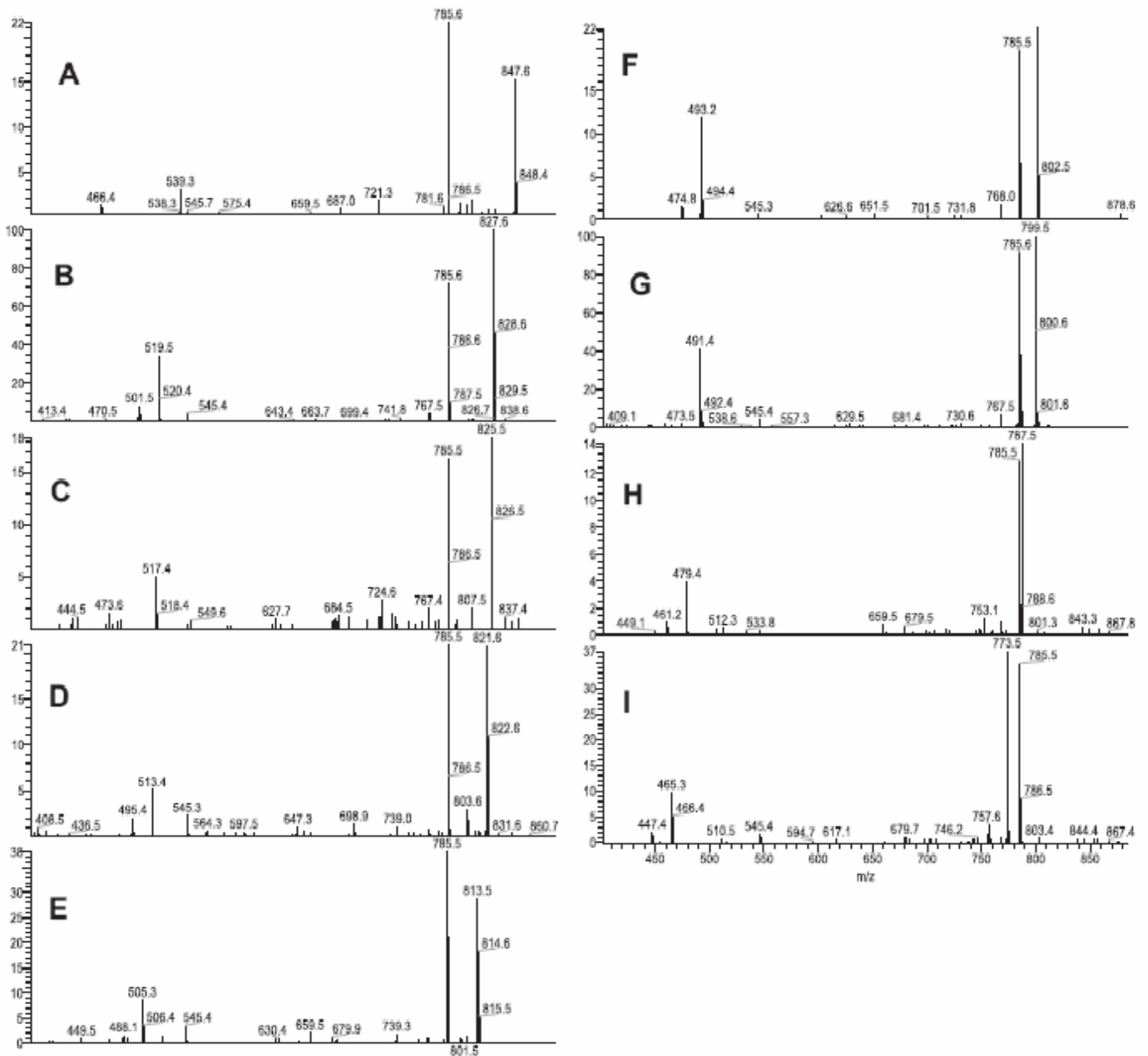


Fig. 4. MS² fragmentation spectra of acyl-esters of OA [M – H][–] found in feces. Numbers preceding OA indicate the fatty acid carbon chain. (A) 20:5-OA (*m/z* 1087.7), (B) 18:1-OA (*m/z* 1067.7), (C) 18:2-OA (*m/z* 1065.7), (D) 18:4-OA (*m/z* 1061.7), (E) 17:0-OA (*m/z* 1055.7), (F) 16:0-OA (*m/z* 1041.7), (G) 16:1-OA (*m/z* 1039.7), (H) 15:0-OA (*m/z* 1027.7), (I) 14:0-OA (*m/z* 1013.7).

between the activity of the ER marker and the yield of palmitoyl-OA of the incubation of each fraction, strongly suggest that ER is the main responsible for OA acylation. This finding agrees with the location of acyltransferase activity on xenobiotics in some invertebrates (Kataoka and Yamamoto, 1985; Janer et al., 2004, 2005).

The acyltransferase activity found in this study for OA seem to be less intense than that found for estrogens both, in the mussel *M. galloprovincialis* (Janer et al., 2005) and in the oyster *C. virginica* (Janer et al., 2004). Even when the

4.4. Acylation, acyl-derivatives accumulation and DSP toxins depuration

Acylation and depuration of DSP-type toxins seem to be strongly related. The fact that nearly all of the okadaic acid found in feces was in acylated form suggests that this is the form in which it is excreted from the cells. Depuration of OA, therefore, should take place in two steps: acylation followed by excretion of the acylated forms. The velocity of the whole depuration process should depend on the

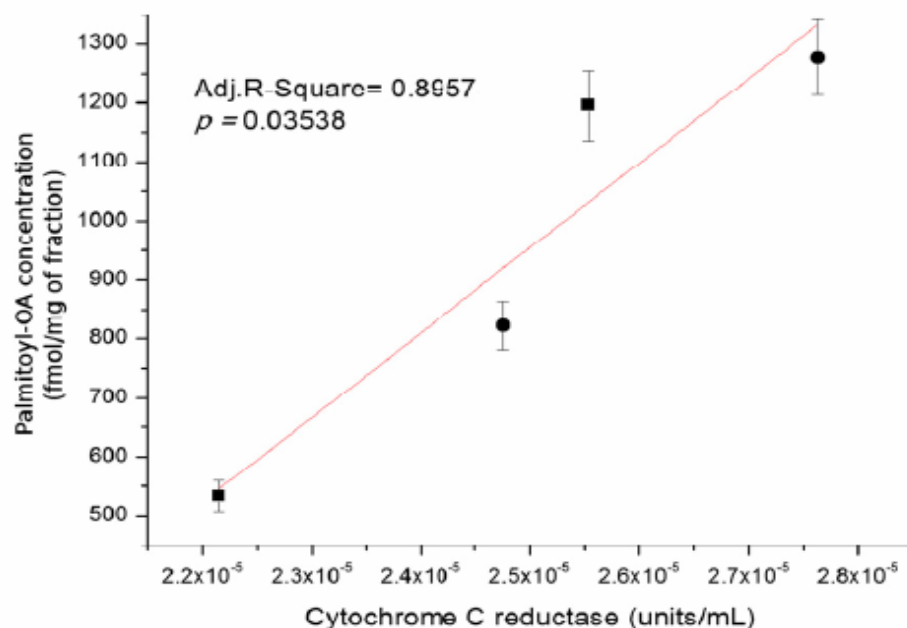


Fig. 5. Linear regression analysis of Cytochrome C reductase (NADPH) activity on palmitoyl-OA concentration (fmol mg^{-1}) obtained for two subcellular fractions of the two pooled samples of digestive gland studied. Squares and circles indicate the microsomal and mitochondrial fractions, respectively.

et al., 2008b; Lindegarh et al., 2009; Suzuki and Mitsuya, 2001). In those cases, depuration would be mostly regulated by the excretion rate of acyl-derivatives, in which probably high density lipoproteins are involved (Rossignoli and Blanco, 2010).

On the other hand, when the excretion rate of acyl-derivatives exceeds the acylation rate, free toxins will represent a considerable proportion of the whole toxin, as happens in *M. galloprovincialis* (Vale, 2006a and this work), *M. edulis* (Torgersen et al., 2008b; Lindegarh et al., 2009) and *Donax trunculus* (Vale, 2006a). In that case, acylation rate would regulate the whole process of depuration. This may open new possibilities to accelerate depuration of DSP toxins from these species by increasing acylation.

It is difficult to know if particular esters (toxin and fatty acid combinations), accumulate in the cells due to a more efficient formation or to a less efficient elimination than other. Nevertheless, our experiment suggests that, for okadaic acid in mussels, all esters are excreted at similar velocities, because the ester profile of feces is very similar to that in the mussels and if some of them were more easily excreted they would be over-represented in feces. In that case acylation would be the responsible process of the observed profile. The observations made by Torgersen et al. (2008b) seem to support this conclusion both for the mussel *M. edulis* and the flat oyster *Ostrea edulis*, but their data should be taken with caution as was obtained from very short time-series and did not take account of the acylation process in the estimation of depuration.

It seems that the acylation rate of the different DSP toxins could be different in some species. In a previous work of this team (Fernández et al., 1998), the acylation rate of OA and DTX2 by mussels was estimated by means of

a dynamic model, finding that the rate for OA was approximately twice that for DTX2. As far as we know, there is no other study on comparative acylation of those toxins, but it has been found that, in all bivalves studied, DTX2 esters are always found in smaller proportion (relative to the free form) than OA esters (Vale, 2004, 2006b), and this suggests that DTX2 is, in general, less efficiently acylated. The incidence of the smaller acylation in depuration, as could be expected, would vary with the process limiting the depuration in each bivalve. In those that do not accumulate large proportions of esters and in which, therefore, acylation would limit the depuration, as in the mussels *M. galloprovincialis* and *M. edulis*, the less acylated toxin (DTX2) depurates more slowly (Fernández et al., 1998; Vale, 2004). In the species that accumulate large proportions of esters, in which the excretion of those compounds would regulate the depuration process, as is the case of the cockle and several clams, the depuration rates of OA and DTX2 are similar (Vale, 2004, 2006b). That observation would suggest that the excretion of acyl-derivatives is not dependent on the particular toxin. Notwithstanding, (Torgersen et al., 2008b) making individual estimations of depuration of acyl-derivatives of OA, DTX1 and DTX2 (with the limitations commented above), found that OA and DTX2 esters depurate at similar rates but that those corresponding to DTX1 depurate more slowly, thus raising the possibility that the toxin itself, and not only its capability of acylation could affect the depuration rate.

Acknowledgments

This work was funded by the Consellería de Innovación e Industria through the collaboration agreement EPITOX.

The work of Araceli Escudeiro Rossignoli was funded by a grant of the Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia, in the framework of the Programa de Recursos Humanos of the PGDIT 2006–2010. We thank H. Martín and G. Álvarez for their technical assistance and the Departments of Sampling and Biotoxins of the Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia for providing the experimental mussels.

Declarations

None declared.

Funding source

The study was funded by the Consellería de Innovación e Industria and the Consellería do Mar, both from the Xunta de Galicia. Those institutions encourage the publication of the results obtained.

Conflict of interest

No competing interest.

References

- Bauder, A.G., Cembella, A.D., Bricelj, V.M., Quilliam, M.A., 2001. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 213, 39–52.
- Blanco, J., Marino, C., Martín, H., Acosta, C.P., 2007. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 50 (8), 1011–1018.
- Chang, C.C.Y., Chen, J., Thomas, M.A., Cheng, D., Priore, V.A.D., Newton, R.S., Pape, M.E., Chang, T.Y., 1995. Regulation and immunolocalization of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase in mammalian cells as studied with specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 270, 29532–29540.
- Cohen, P., Holmes, C.F., Tsukitani, Y., 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* 15, 98–102.
- Connat, J.L., Diehl, P.A., 1986. Probable occurrence of ecdysteroid fatty acid esters in different classes of arthropods. *Insect Biochem.* 16.
- Cruz, P.G., Daranas, A.H., Fernández, J.J., Souto, M.L., Norte, M., 2006. DTX5c, a new OA sulphate ester derivative from cultures of *Prorocentrum belizeanum*. *Toxicon* 47, 920–924.
- Della Loggia, R., Cabrini, M., del Negro, P., Honsell, G., Tubaro, A., 1993. Relationship between *Dinophysis* spp. in seawater and DSP toxins in mussels in the Northern Adriatic Sea. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier Science, New York, pp. 483–488.
- Dodds, P., 1995. Xenobiotic lipids: the inclusion of xenobiotic compounds in pathways of lipid biosynthesis. *Prog. Lip. Res.* 34, 219–247.
- Duedendorfer, A., Maroy, P., 1986. Ecdysteroid conjugation by tissues of adult females of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* 16, 109–113.
- Edler, L., Hagelton, M., 1990. Identification of the causative organism of a DSP-outbreak on the Swedish West Coast. In: Graneli, E.B., Sundstrom, L.E., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier Science, New York, pp. 345–349.
- EU/SANCO, 2001. Report of the Meeting of the Working Group on Toxicology of DSP and AZP. European Union/Directorate General for Health and Consumer Affairs (EU/SANCO). Brussels.
- Fernández, J.J., Suárez-Gómez, B., Souto, M.L., Norte, M., 2003. Identification of new okadaic acid derivatives from laboratory cultures of *Prorocentrum lima*. *J. Nat. Prod.* 66, 1294–1296.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A., 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. *Toxicon* 34, 381–387.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A., Cacho, E., Martínez, A., Blanco, J., 1998. Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 442–449.
- Fujiki, H., Suganama, M., 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv. Can. Res.* 61, 143–194.
- García, C., Schonstedt, V., Santelices, J.P., Lagos, N., 2006. High amount of dinophysistoxin-3 in *Mytilus chilensis* collected in Seno de Reloncaví, Chile, during massive human intoxication associated with outbreak of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Toxicol. Sci.* 31, 305–314.
- García, C., Truan, D., Lagos, M., Santelices, J.P., Diaz, J.C., Lagos, N., 2005. Metabolic transformation of dinophysistoxin-3 into dinophysistoxin-1 causes human intoxication by consumption of o-acyl-derivates dinophysistoxins contaminated shellfish. *J. Toxicol. Sci.* 30, 287–296.
- Gayoso, A.M., Dover, S., Morton, S., Busman, M., Moeller, P., Fulco, V.K., Maranda, L., 2002. Diarrhetic shellfish poisoning associated with *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in Patagonian Gulfs (Argentina). *J. Shellfish Res.* 21, 461–463.
- Gerssen, A., Mulder, P.P.J., McElhinney, M., Boer, J., 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. *J. Chromatogr. A* 9, 1421–1430.
- Giacobbe, M.G., Penna, A., Ceredi, A., Milandri, A., Poletti, R., Yang, X., 2000. Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyta). *Phycologia* 39, 177–182.
- Gooding, M.P., LeBlanc, G.A., 2001. Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Gen. Comp. Endocr.* 122, 172–180.
- Hallegraef, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D., 1995. Manual on harmful marine microalgae. In: UNESCO (Ed.), *IOC Manuals and Guides*, p. 551. Paris.
- Heredia-Tapia, A., Arredondo-Vega, B.O., Nunez-Vázquez, E.J., Yasumoto, T., Yasuda, M., Ochoa, J.L., 2002. Isolation of *Prorocentrum lima* (syn. *Exuviaella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, Mexico. *Toxicon* 40, 1121–1127.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., McLachlan, J.L., Wright, J.L.C., 1995a. Two new water-soluble DSP toxin derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products. *Tetrahedron Lett.* 36, 9273–9276.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., Wright, J., 1995b. Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 5, 597–599.
- Hu, T., Doyle, J., Jackson, D.M., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1992a. Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1, 39–44.
- Hu, T., Marr, J., deFreitas, A.S.W., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, L.C., Pleasance, S., 1992b. New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. *J. Nat. Prod.* 55, 1631–1637.
- Janer, G., Lavado, R., Thibaut, R., Porte, C., 2005. Effects of 17 β -estradiol exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: a possible regulating role for steroid acyltransferases. *Aquat. Toxicol.* 75, 32–42.
- Janer, G., Mesia-Vela, S., Porte, C., Kauffman, F.C., 2004. Esterification of vertebrate-type steroids in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Steroids* 69, 129–136.
- Jørgensen, K., Scanlon, S., Jensen, L.B., 2005. Diarrhetic shellfish poisoning toxin esters in Danish blue mussels and surf clams. *Food Addit. Contam.* 22, 743–751.
- Kat, M., 1983. *Dinophysis acuminata* blooms in the Dutch coastal area related to diarrhetic mussel poisoning in the Dutch Waddensea. *Sarsia* 6, 81–84.
- Kataoka, S., Yamamoto, T.Y., 1985. Acyltransferase and acid hydrolase activities of the abalone photoreceptor cell. *Cell. Tissue Res.* 241, 59–65.
- Khelef, N., Buton, X., Beatini, N., Wang, H., Meiner, V., Chang, T.Y., Farese, R.V., Maxfield, F.R., Tabas, I., 1998. Immunolocalization of acyl-coenzyme A:cholesterol O-acyltransferase in macrophages. *J. Biol. Chem.* 273, 11218–11224.
- Khelef, N., Soe, T.T., Quehenberger, O., Beatini, N., Tabas, I., Maxfield, R., 2000. Enrichment of acyl coenzyme A:cholesterol O-acyltransferase near trans-golgi network and endocytic recycling compartment. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. *J. Am. Heart Assoc.* 20, 1769–1776.
- Koike, K., Sato, S., Yamaji, M., Nagahama, Y., Kotaki, Y., Ogata, T., Kodama, M., 1998. Occurrence of okadaic acid-producing *Prorocentrum lima* on the Sanriku coast, Northern Japan. *Toxicon* 36, 2039–2042.
- Labadie, P., Peck, M., Minier, C., Hill, E.M., 2007. Identification of the steroid fatty acid ester conjugates formed in vivo in *Mytilus edulis* as a result of exposure to estrogens. *Steroids* 72, 41–49.
- Lassus, P., Bardouil, M., Truquet, I., Truquet, P., Le Baut, C., Pierre, M.J., 1985. *Dinophysis acuminata* distribution and toxicity along the Southern Brittany coast (France): correlation with hydrological parameters. In: Anderson, D.M., Cembella, A., Hallegraef, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 159–164.

- Lawrence, J.E., Bauder, A.G., Quilliam, M.A., Cembella, A.D., 1998. *Proocentrum lima*: a putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 78–79.
- Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T., 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1, 147–152.
- Lindegarth, S., Torgersen, T., Lundve, B., Sandvik, M., 2009. Differential retention of okadaic acid (OA) group toxins and pectenotoxins (PTX) in the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.) and European flat oyster, *Ostrea edulis* (L.). *J. Shellfish Res.* 28, 313–323.
- MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T., 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and greenshell mussels (*Perna canaliculus*) revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* 40, 1321–1330.
- Marr, J.C., Hu, T., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Wright, J.L.C., 1992. Detection of new 7-O-acyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography–mass spectrometry. *Toxicon* 30, 1621–1630.
- Mestrovic, V., Pavela-Vrancic, A., 2003. Inhibition of alkaline phosphatase activity by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor. *Biochimie* 85, 647–650.
- Norte, M., Padilla, M., Fernández, J.J., Souto, M.L., 1994. Structural determination and biosynthetic origin of two ester derivatives of okadaic acid isolated from *Proocentrum lima*. *Tetrahedron Lett.* 50, 9175–9180.
- Paz, B., Daranas, A.H., Cruz, P.G., Franco, J.M., Napolitano, J.G., Norte, M., Fernández, J.J., 2007. Identification and characterization of DTX-5C and 7-hydroxymethyl-2-methylene-octa-4,7-dienyl okadaate from *Proocentrum belizeanum* cultures by LC-MS. *Toxicon* 50, 470–478.
- Quilliam, M.A., Hardstaff, W.R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Ross, N.W., Windust, A.J., 1996. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Proocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO, Paris, pp. 289–292.
- Reguera, B., Bravo, I., Fraga, S., 1990. Distribution of *Dinophysis acuta* at the Time of a DSP Outbreak in the Rias of Pontevedra and Vigo. ICES CM/Shellfish Committee, Galicia, NW Spain. 1990/L: 14.
- Rossignoli, A.E., Blanco, J., 2010. Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*: first evidences of lipoprotein binding to okadaic acid. *Toxicon* 55, 221–226.
- Rossignoli, A.E., Fernández, D., Acosta, C.P., Blanco, J., 2011. Microencapsulation of okadaic acid as a tool for studying the accumulation of DSP toxins in mussels. *Mar. Environ. Res.* 71, 91–93. doi:10.1016/j.marenvres.2010.11.003.
- Suárez-Gómez, B., Souto, M.L., Cruz, P.G., Fernández, J.J., Norte, M., 2005. New targets in diarrhetic shellfish poisoning control. *J. Nat. Prod.* 68, 596–599.
- Suárez-Gómez, B., Souto, M.L., Norte, M., Fernández, J.J., 2001. Isolation and structural determination of DTX-6, a new okadaic acid derivative. *J. Nat. Prod.* 64, 1363–1364.
- Suzuki, T., Mitsuya, T., 2001. Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 39, 905–908.
- Suzuki, T., Ota, H., Yamasaki, M., 1999. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon* 37, 187–198.
- Torgersen, T., Miles, C., Rundberget, T., Wilkins, A., 2008a. New esters of okadaic acid in seawater and blue mussels (*Mytilus edulis*). *Agric. Food Chem.* 56, 9628–9635.
- Torgersen, T., Sandvik, M., Lundve, B., Lindegarth, S., 2008b. Profiles and levels of fatty acid esters of okadaic acid group toxins and pectenotoxins during toxin depuration. Part II: blue mussels (*Mytilus edulis*) and flat oyster (*Ostrea edulis*). *Toxicon* 52, 418–427.
- Torgersen, T., Wilkins, A.L., Rundberget, T., Miles, C.O., 2008c. Characterization of fatty acid esters of okadaic acid and related toxins in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Norway. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 1127–1136.
- Vale, P., 2010. Profiles of fatty acids and 7-O-acyl okadaic acid esters in bivalves: can bacteria be involved in acylesterification of okadaic acid? *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 151, 18–24.
- Vale, P., 2006a. Detailed profiles of 7-O-acyl esters in plankton and shellfish from the Portuguese coast. *J. Chromatogr. A* 1128, 181–188.
- Vale, P., 2006b. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins, part II: offshore bivalve species. *Toxicon* 47, 163–173.
- Vale, P., 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis Acuta*. *Toxicon* 44, 123–134.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M., 2002a. Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the northwest coast determined by LC-MS—a widespread phenomenon. *Toxicon* 40, 33–42.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M., 2002b. First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon* 40, 989–996.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M., 2000. Dinophysistoxin-2: a rare diarrhoeic toxin associated with *Dinophysis acuta*. *Toxicon* 38, 1599–1606.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M., 1999. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon* 37, 1109–1121.
- Wright, J.L.C., 1995. Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. *Food Res. Int.* 28, 347–358.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G., Clardy, J., 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41, 1019–1025.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N., 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46, 1405–1411.

CONCLUSIONES GENERALES

Sobre el objetivo 1. Conocer cuáles son los principales mecanismos de entrada del ácido okadaico en las células de la glándula digestiva.

1.- Las mayores tasas de absorción del ácido okadaico por parte de las células de la glándula digestiva del mejillón se producen cuando la toxina esta disuelta en agua, siendo dichas tasas sustancialmente menores cuando se encuentra en gotas de aceite.

2.- El hecho de que el transporte del ácido okadaico no requiera ATP y tienda a saturarse a altas concentraciones de la toxina, sugiere que la difusión simple no es el mecanismo responsable de la absorción.

3.- La difusión facilitada u otras vías de entrada alternativas basadas en mecanismos de difusión de dímeros de ácido okadaico con potasio o de agregados de la toxina disueltos en tampones biológicos podrían ser los mecanismos responsables del transporte.

Sobre el objetivo 2. Conocer si existe compartimentalización de las toxinas DSP a nivel celular (en los diferentes tipos celulares) y a nivel subcelular (en los diferentes orgánulos).

4.- La cinética de dos compartimentos que se detecta en la depuración de las toxinas DSP del mejillón, no se debe a los dos tipos celulares presentes en la glándula digestiva, si bien la capacidad de acumulación de las células digestivas es notablemente superior a la de las células secretoras.

5.- El ácido okadaico se distribuye preferencialmente en la fracción soluble de la célula.

Sobre el objetivo 3. Determinar si las toxinas DSP son secuestradas por medio de ligamiento a algún componente celular.

6.- El ácido okadaico se une a un receptor celular formando un complejo con un tamaño estimado entre 30 y 300 kDa.

7.- La naturaleza química más probable de dicho receptor es la de una lipoproteína de alta densidad.

Sobre el objetivo 4. Determinar si las toxinas DSP son degradadas y transformadas en el interior de las células o excretadas directamente.

8.- La principal forma estructural de depuración de las toxinas DSP es como acyl-ester, aunque es probable que existan otras formas conjugadas más apolares que todavía no han sido detectadas.

9.- Se descarta que la acilación de dichas toxinas se produzca por acción bacteriana en el lumen de los túbulos digestivos de la glándula digestiva de mejillón.

10.- Las toxinas DSP son transformadas en el interior de las células digestivas para posteriormente ser eliminadas.

Sobre el objetivo 5. Establecer las principales vías de excreción así como sus mecanismos asociados.

11.- La principal vía de depuración de las toxinas DSP es a través de las heces.

12.- La depuración de las toxinas DSP como materia disuelta a través de los sifones es prácticamente inexistente

13.- La actividad acyl-transferasa, responsable de la esterificación del OA, se localiza en los microsomas (retículo endoplasmático o aparato de Golgi) de las células de la glándula digestiva de mejillón.

REFERENCIAS

Akasaka, K., Ohrui, H., Meguro, H., Yasumoto, T. 1996. Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins in scallops and mussels by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 729: 381-386.

Alarcón, L.F.J., Martínez, D.M.I. 1998. Fisiología de la Digestión en Larvas de Peces Marinos y sus Aplicaciones al Cultivo Larvario en Masa. *Revista AquaTIC*.

Amzil, Z., Pouchus, Y.F., Le Boterf, J., Roussakis, C., Verbist, J.-F., Marcaillou-LeBaut, C., Masselin, P. 1992. Short-time cytotoxicity of mussel extracts: a new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon* 30: 1419-1425.

Anderson, D.M., Kulis, D.M., Sullivan, J.J., Hall, S., Lee, C. 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Marine Biology* 10: 511-524.

Anderson, D.M., Sullivan, J.J., Reguera, B. 1989. Paralytic shellfish poisoning in Northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon* 27: 665-674.

Arévalo, F.F., Bermúdez, M., Salgado, C. 1998. ASP toxicity in scallops: individual variability and tissue distribution. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful microalgae*, Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 499-502.

Arévalo, F., Bermúdez, F., Domonte, M., Pérez, M., Salgado, C., Vaázquez, M., Valcárcel, J.A. 1995. Biotoxinas PSP y DSP en las Rías Gallegas: Control y evolución durante los años 1993 y 1994. En: Matamoros, E., Delgado, M. (Eds.), *IV Reunión Ibérica sobre Fitoplancton tóxico y Biotoxinas*, Generalitat de Catalunya, Barcelona, pp. 39-51.

Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos (APROMAR) 2009. La acuicultura marina de peces en España. 23 de agosto de 2010. <<http://www.apromar.es/Informes/informe%202009/Informe-APROMAR-2009.pdf>>.

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.

Aune, T., Yasumoto, T., Engeland, E. 1991. Light and scanning electron microscopic studies on effects of marine algal toxins toward freshly prepared hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 34: 1-9.

Bates, S.S., Bird, C.J., de Freitas, A.S.W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L.A., Johnson, G.R., McCulloch, A.W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Smith, J.C., Subba Rao, D.V., Todd, E.C.D., Walter, J.A., Wright, J.L.C. 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canadá. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences* 46: 1203-1215.

Bates, H.A., Kostriken, R., Rapoport, H. 1978. The occurrence of saxitoxin and other toxins in various dinoflagellates. *Toxicon* 16: 595-601.

Berenguer, J.A., González, L., Jiménez, I., Legarda, T.M., Olmedo, J.B., Burdaspal, P.A. 1993. The effect of commercial processing on the paralytic shellfish poison (PSP)

content of naturally-contaminated *Acanthocardia tuberculatum* L. *Food Additives and Contaminants* 10: 217-230.

Berven, G., Sætre, F., Halvorsen, K., Seglen, P.O. 2001. Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionality of rat liver and intestinal cells. *Toxicon* 39: 349-362.

Bialojan, C., Takai, A. 1988. Inhibitory effect of a marine sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochemical Journal* 256: 283-290.

Blanco, J., Álvarez, G., Uribe, E. 2007a. Identification of pectenotoxins in plankton, filter feeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. *Toxicon* 49: 710-716.

Blanco, J., Mariño, C., Martín, H., Acosta, C.P. 2007b. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 50: 1011-1018.

Blanco, J., Moroño, A., Fernández, M.L. 2005. Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: an overview. *Revista Galega dos Recursos Mariños (Monog.)* 1: 70.

Blanco-Pérez, J. 2001. Episodios nocivos por fitoplancton. En: Maeda-Martínez, A.N. (Ed.), *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Editorial Limusa, México, pp. 285-324.

Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A. 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Marine Ecology Progress Series* 176: 153-163.

Blanco, J., Moroño, A., Franco, J., Reyero, M.I. 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Marine Ecology Progress Series* 158: 165-175.

Blanco, J. 1995. A model of the effect of cyst germination on the development of the *Gymnodinium catenatum* populations on the west coast of the Iberian Peninsula. En: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C. (Eds.), *Harmful marine algal blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp.

Botana, L.M. Rodríguez, M., Vieites, J.M., Leira, F. 1996. Process based on the inhibition of phosphatases for detecting and quantifying diarrhetic shellfish poison. España, patente de invención, WO/1996/040983. 1996-12-19.

Bricelj, V.M., Cembella, A.D. 1995. Fate of gonyautoxins in surfclams, *Spisula solidissima*, grazing upon toxigenic *Alexandrium*. En: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C. (Eds.), *Harmful marine algal blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, pp. 413-418.

Campos, M.J., Fraga, S., Mariño, J., Sánchez, F.J. 1982. Red tide monitoring program on NW Spain. Report of 1977-1981.

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. *Toxicology in Vitro* 24: 611-619.

Carmody, E.P., James, K.J., Kelly, S.S. 1996. Dinophysistoxin-2: the predominant diarrhetic shellfish toxin in Ireland. *Toxicon* 34: 351-359.

Carmody, E.P., James, K.J., Kelly, S.S. 1995. Diarrhetic shellfish poisoning: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay methods for dinophysistoxin-2 determination. *Journal of AOAC International* 78: 1403-1408.

Cembella, A.D., Quilliam, M.A., Lewis, N.I., Bauder, A.G., Wright, J.L.C. 1998. Identifying the planktonic origin and distribution on spirolides in coastal Nova Scotian waters En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 481-484.

Cembella, A.D., Shumway, S.E., Lewis, N.I. 1993. Anatomical distribution and spatio-temporal variation in paralytic shellfish toxin composition in two bivalve species from the Gulf of Maine. *Journal of Shellfish Research* 12: 389-403.

Chang, C.C.Y., Chen, J., Thomas, M.A., Cheng, D., Priore, V.A.D., Newton, R.S., Pape, M.E., Chang, T.Y. 1995. Regulation and immunolocalization of acyl-coenzyme A: Cholesterol acyltransferase in mammalian cells as studied with specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry* 270: 29532-29540.

Chen, D.Z.X., Boland, M.P., Smillie, M.A., Klix, H., Ptak, K., Anderson, R.J., Holmes, C.F.B. 1993. Identification of protein-phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment. *Toxicon* 31: 1407-1414.

Cohen, P., Holmes, C.F., Tsukitani, Y. 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends in Biochemical Sciences* 15: 98-102.

Cohen, P. 1989. The structure and regulation of protein-phosphatases. *Annual Review in Biochemistry* 58: 453-508.

Comisión Europea 2011. Reglamento (UE) N° 15/2011 de la Comisión del 10 de enero de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos *Diario Oficial de la Unión Europea* L 6/3.

Comisión Europea 2005. Reglamento (CE) no 2074/2005 de la Comisión de 5 de diciembre de 2005. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 338/27.

Comisión Europea 2004. Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 139/55.

Connat, J.L., Diehl, P.A. 1986. Probable occurrence of ecdysteoid fatty acid eters in different classes of arthropods. *Insect biochemistry* 16: 91-97.

Consello Regulador do Mexillón de Galicia 2007. 23 de agosto de 2010. <http://www.mexillondegalicia.org/denominacion_de_orixe_protexida/sector.php>.

Cordier, S., Monfort, C., Miossec, L., Richardson, S., Belin, C. 2000. Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish

poisoning toxins along the coasts of France. *Environmental Research Section A* 84: 145-150.

Croci, L., Toti, L., De Medici, D., Cozzi, L. 1994. Diarrhetic shellfish poison in mussels: comparison of methods of detection and determination of the effectiveness of depuration. *International Journal of Food Microbiology* 24: 337-342.

Cruz, P.G., Fernández, J.J., Norte, M., Daranas, A.H. 2008. Belizeanic acid: a potent protein phosphatase 1 inhibitor belonging to the okadaic acid class, with an unusual skeleton. *Chemical European Journal* 14: 6948-6956.

Cruz, P.G., Daranas, A.H., Fernández, J.J., Norte, M. 2007. 19-*epi*-Okadaic acid, a novel protein phosphatase inhibitor with enhanced selectivity. *Organic Letters* 9: 3045-3048.

Daiguji, M., Satake, M., James, K.J., Bishops, A., MacKenzie, L., Naoki, H., Yasumoto, T. 1998. Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-*epi*-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. *Chemistry Letters of the Chemical Society of Japan* 29: 653-654.

Daranas, A.H., Cruz, P.G., Creus, A.H., Norte, M., Fernández, J.J. 2007. Self-assembly of okadaic acid as a pathway to the cell. *Organic Letters* 9: 4191-4194.

De Fouw, J.C., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. 2001. Ciguatera fish poisoning: a review. Bilthoven - the Netherlands RIVM. National Institute of Public Health and the Environment.

Desbiens, M., Cembella, A. 1993. Growth of the blue mussel *Mytilus edulis* on toxic *Alexandrium fundyense* and effects of gut passage on dinoflagellate cells. En: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier Science, New York, New York, USA., pp. 395-399.

Dickey, R.W., Granade, H.R., Bencsath, F.A. 1993. Improved analytical methodology for the derivatization and HPLC-fluorometric determination of okadaic acid in phytoplankton and shellfish. En: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier Science, New York (USA), pp. 495-499.

Diogène, J., Fessard, V., Ammar, M., Dubreuil, A., Puiseux-Dao, S. 1995. Evaluation of cytotoxic responses to a maitotoxin extract and okadaic acid. En: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou- Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Paris, pp. 285-290.

Dodds, P. 1995. Xenobiotic Lipids: The inclusion of xenobiotic compounds in pathways of lipid biosynthesis. *Progress in Lipid Research* 34: 219-247.

Doucette, G.J., McGovern, E.R., Babinchak, J.A. 1999. Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (*Dinophyceae*). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *Journal of Phycology* 35: 1447-1454.

Doucette, G.J., Anderson, D.M. 1993. Intracellular distribution of saxitoxin in *Alexandrium fundyense*. En: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 863-868.

Douglas, D.J., Kenchington, E.R., Bird, C.J., Pocklington, R., Bradford, B., Silvert, W. 1997. Accumulation of domoic acid by the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) fed cultured cells of toxic *Pseudo-nitzschia multiseriis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 907-913.

Draisci, R., Giannetti, L., Lucentini, L., Marchiafava, C., James, K.J., Bishop, A.G., Healy, B.M., Kelly, S.S. 1998. Isolation of a new okadaic acid analog from phytoplankton implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Journal of Chromatography A* 98: 137-145.

Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., Poletti, R. 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 34: 923-935.

Duedendorfer, A., Maroy, P. 1986. Ecdysteroid conjugation by tissues of adult females of *Drosophila melanogaster*. *Insect biochemistry* 16: 109-113.

Duinker, A., Bergslien, M., Strand, O., Olseng, C.D., Svardal, A. 2007. The effect of size and age on depuration rates of diarrhetic shellfish toxins (DSP) in mussels (*Mytilus edulis* L.). *Harmful Algae* 6: 288-300.

EFSA 2008. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – Okadaic acid and analogues. *The EFSA Journal* 589: 1-62.

Elbrächter, M., Schnepf, E. 1998. Parasites of harmful algae. En: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 351-369.

FAO 2009. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Pesca y la Alimentación, Roma.

FAO, IOC, WHO 2004. Joint FAO/IOC/WHO ad hoc expert consultation on biotoxins in bivalve mollusk, Oslo.

Fernández, M.L. 2007. Estudio de las toxinas DSP producidas por los dinoflagelados de las Rías Gallegas y de sus transformaciones en los moluscos. Gestión y mitigación de los episodios tóxicos. *Tesis Doctoral. Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela*: 348.

Fernández, M.L., Reguera, B., González-Gil, S., Míguez, A. 2006. Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain). *Toxicon* 48: 477-490.

Fernández, J.J., Suárez-Gómez, B., Souto, M.L., Norte, M. 2003a. Identification of new okadaic acid derivatives from laboratory cultures of *Prorocentrum lima*. *Journal of Natural Product* 66: 1294-1296.

Fernández, M.L., Shumway, S.E., Blanco, J. 2003b. Management of shellfish resources. En: Hallegraeff, G.M., Cembella, A., Anderson, D.M. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 657-692.

Fernández, M.L., Reguera, B., Ramilo, I., Martínez, A. 2001. Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D.acuta* and *D.caudata* from the Galician Rías Baixas. En:

Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds.), *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 360-363.

Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A., Cacho, E., Martínez, A., Blanco, J. 1998. Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela., pp. 442-449.

Fernández, M.L., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A. 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of spanish mussels. *Toxicon* 34: 381-387.

Fessard, V., Diogène, J., Dubreuil, A., Quod, J.P., Durand-Clément, M., Legay, C., Puiseux-Dao, S. 1994. Selection of cytotoxic responses to maitotoxin and okadaic acid and evaluation of toxicity of dinoflagellate extracts. *Natural Toxins* 2: 322-328.

Fujiki, H., Suganama, M. 1999. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 125: 150-155.

Fujiki, H., Suganama, M. 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Advances in Cancer Research* 61: 143-194.

Fujiki, H., Suganama, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamanda, K., Murata, M., Yasumoto, T., Sugimura, T. 1988. Diarrhetic shellfish toxins, dinophysistoxin -1 is a potent tumor promoter on mouse skin. *Japanese Journal Cancer Research* 79: 1089-1093.

Fux, E., Bire, B., Hess, P. 2009. Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland. *Harmful Algae* 8: 523-537.

Fux, E., Marcaillou- Le Baut, C., Mondeguer, F., Bire, R., Hess, P. 2008. Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1. *Harmful Algae* 7: 574-583.

Gago-Martinez, A., Leao, J.M., Piñeiro, N., Carballal, E., Vaquero, E., Nogueiras, M., Rodríguez-Vázquez, J.A. 2003a. An application of capillary electrophoresis for the analysis of algal toxins from the aquatic environment. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 83: 443-456.

Gago-Martinez, A., Piñeiro, N., Agüete, E.C., Vaquero, E., Nogueiras, M., Leao, J.M., Rodríguez-Vázquez, J.A., Dabek-zlotorzynska, E. 2003b. Further improvements in the application of high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and capillary electrochromatography to the analysis of algal toxins in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* 992: 159-168.

Gago-Martinez, A., Rodríguez-Vázquez, J.A., Quilliam, M.A. 1996. Detection and confirmation of DTX-2, a diarrhetic shellfish poisoning toxin, in Galician mussels. *Revista de Toxicologia* 13: 32-36.

- Gentien, P. 1998. Bloom dynamics and ecophysiology of the *Gymnodinium mikimotoi* species complex. En: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 155-173.
- Gerssen, A., McElhinney, M., Mulder, P., Bire, R., Hess, P., de Boer, J. 2009a. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394: 1213-1226.
- Gerssen, A., Mulder, P.P.J., McElhinney, M., Boer, J. 2009b. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. *Journal of Chromatography A* 9: 1421 - 1430.
- González, J.C., Leira, F., Fontal, O.I., Vieytes, M.R., Arévalo, F.F., Vieites, J.M., Bermúdez-Puente, M., Muñiz, S., Salgado, C., Yasumoto, T., Botana, L.M. 2002. Inter-laboratory validation of the fluorescent protein phosphatase inhibition assay to determine diarrhetic shellfish toxins: intercomparison with liquid chromatography and mouse bioassay. *Analytica Chimica Acta* 466: 233-246.
- Gosling, E. 2003. Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture. *Fishing news books* Chapter 4: 115-117.
- Goto, H., Igarashi, T., Yamamoto, M., Yasuda, M., Sekiguchi, R., Watai, M., Tanno, K., Yasumoto, T. 2001. Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 907: 181-189.
- Guzmán, L., Campodónico, I. 1975. Marea roja en la región de Magallanes. *Anales del Instituto de la Patagonia, Series Monográficas* 9: 1- 44.
- Haamer, J., Andersson, P., Lindahl, O., Lange, S., Li, X.P., Edebo, L. 1990. Effects of transplantation and reimmersion of mussels *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1728) on their contents in okadaic acid. *Journal of Shellfish Research* 9: 109-112.
- Hamano, Y., Kinoshita, Y., Yasumoto, T. 1986. Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 27: 375-379.
- Henry, M., Boucaud-Camou, E., Lefort, Y. 1991. Functional microanatomy of the digestive gland of the scallop *Pecten maximus* (L.). *Aquatic living resources* 4: 191-202.
- Hess, P., McMahon, T., Slattery, D., Swords, D., Dowling, G., McCarron, M., Clarke, D., Gibbons, W., Silke, W., O'Conneide, M. 2003. Use of LC-MS testing to identify lipophilic toxins, to establish local trends and interspecies differences and to test the comparability of LC-MS testing with mouse bioassay: an example from the Irish Biotxin Monitoring Programme 2001. En: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J.L., Beiras, R. (Eds.), *Molluscan Shellfish Safety. Proceedings of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela. Spain, pp. 57-66.

Hoffmann, K., Hermanns-Clausen, M., Buhl, C., Büchler, M.W., Schemmer, P., Mebs, D., Kauferstein, S. 2008. A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury. *Toxicon* 51: 1535-1537.

Holmes, C.F.B. 1991. Liquid chromatography-linked protein phosphatase bioassay; a highly sensitive marine bioscreen for okadaic acid and related diarrhetic shellfish toxins. *Toxicon* 29: 469-477.

Honkanen, R.E., Stapleton, J.D., Bryan, D.E., Abercrombie, J. 1996. Development of a protein phosphatase-based assay for the detection of phosphatase inhibitors in crude whole cell and animal extracts. *Toxicon* 34: 1385-1392.

Hu, T., Curtis, J.M., Oshima, Y., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Watson-Wright, W.M., Wright, J.L.C. 1995a. Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications* 20: 2159-2161.

Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., McLachlan, J.L., Wright, J.L.C. 1995b. Two new water-soluble DSP toxin derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products. *Tetrahedron Letters* 36: 9273-9276.

Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., Wright, J. 1995c. Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 5: 597-599.

Hu, T., Doyle, J., Jackson, D.M., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C. 1992a. Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications* 1: 39-44.

Hu, T., Marr, J., deFreitas, A.S.W., Quilliam, M.A., Walter, J.A., L.C., W., Pleasance, S. 1992b. New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. *Journal of Natural Products* 55: 1631-1637.

Indrasena, W.M., Gill, T.A. 1999. Thermal degradation of paralytic shellfish poisoning toxins in scallop digestive glands. *Food Research International* 32: 49-57.

Ito, S., Tsukada, K. 2001. Matrix effects and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. *Journal of Chromatography A* 943: 30-46.

James, K.J., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M., Furey, A. 2003. Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon* 41: 145-151.

James, K.J., Furey, A., Healy, B., Kelly, S.S., Twohig, M. 1998. Luminarin-3, a new fluorimetric reagent for the HPLC determination of diarrhoeic shellfish poisoning toxins. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. International oceanographic Commission of UNESCO & Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, pp. 519-520.

Janer, G., Lavado, R., Thibaut, R., Porte, C. 2005. Effects of 17 β -estradiol exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: A possible regulating role for steroid acyltransferases. *Aquatic Toxicology* 75: 32-42.

- Janer, G., Mesia-Vela, S., Porte, C., Kauffman, F.C. 2004. Esterification of vertebrate-type steroids in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Steroids* 69: 129-136.
- Jørgensen, K., Scanlon, S., Jensen, L.B. 2005. Diarrhetic shellfish poisoning toxin esters in danish blue mussels and surf clams. *Food Additives and Contaminants* 22: 743-751.
- Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos y Ministerio de Medio ambiente, Medio Rural y Marino (JACUMAR) 2009. La acuicultura en España. 10 de mayo del 2010. <http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/presentacion/acuicultura_es.htm>.
- Kat, M. 1983. *Dinophysis acuminata* blooms in the Dutch coastal area related to diarrhetic mussel poisoning in the Dutch Waddensea. *Sarsia* 6: 81-84.
- Kataoka, S., Yamamoto, T.Y. 1985. Acyltransferase and acid hydrolase activities of the abalone photoreceptor cell. *Cell and Tissue Research* 241: 59-65.
- Khelef, N., Soe, T.T., Quehenberger, O., Beatini, N., Tabas, I., Maxfield, R. 2000. Enrichment of Acyl Coenzyme A: Cholesterol O-Acyltransferase near trans-golgi network and endocytic recycling compartment. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology: Journal of the American Heart Association* 20: 1769-1776.
- Khelef, N., Buton, X., Beatini, N., Wang, H., Meiner, V., Chang, T.Y., Farese, R.V., Maxfield, F.R., Tabas, I. 1998. Immunolocalization of acyl-coenzyme A: cholesterol O-acyltransferase in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 273: 11218-11224.
- Kim, H.K., Kim, K.I., Kim, D.S., Park, K.S., Hong, T.H., Jeong, T.H. 2000. Developing a method of controlling the outbreak and maintenance of red tides using NaOCl produced by electrolysis of natural seawater. Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms, Tasmania, Australia.
- Kim, H.G. 1998. *Cochlodinium polykrikoides* blooms in Korean coastal waters and their mitigation. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia & IOC of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 227-228.
- Knauer, J., Southgate, P.C. 1997. Assimilation of gelatin-acacia microencapsulated lipid by Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Aquaculture* 153: 291-300.
- Korringa, P., Roskam, R.T. 1961. An unusual case of mussel poisoning. *International Council of the Exploration of the Sea (ICES). Council meeting* 49: 2
- Kurelec, B. 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology* 22: 23-43.
- Labadie, P., Peck, M., Minier, C., Hill, E.M. 2007. Identification of the steroid fatty acid ester conjugates formed in vivo in *Mytilus edulis* as a result of exposure to estrogens. *Steroids* 72: 41-49.
- Lawrence, J.E., Cembella, A.D., Ross, N.W., Wright, J.L.C. 1998. Cross-reactivity of an anti-okadaic acid antibody to dinophysistoxin-4 (DTX-4), dinophysistoxin-5 (DTX-5), and an okadaic acid diol ester. *Toxicon* 36: 1193-1196.
- Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of Applied Phycology* 1: 147-152.

- Lee, J.S., Yanagi, T., Kenma, R., Yasumoto, T. 1987. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry* 51: 877-881.
- Lehane, L., Lewis, R.J. 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International Journal of Food Microbiology* 61: 91-125.
- Leira, F.J., Vieites, J.M., Botana, L.M., Vieytes, M.R. 1998. Domoic acid levels of naturally contaminated scallops as affected by canning. *Journal of Food Science* 63: 1081-1083.
- Levine, L., Fujiki, H., Yamada, K., Ojika, M., Gjika, H.B., VanVunakis, H. 1988. Production of antibodies and development of a radioimmunoassay for okadaic acid. *Toxicon* 26: 1123-1128.
- Lindegarh, S., Torgersen, T., Lundve, B., Sandvik, M. 2009. Differential retention of okadaic acid (OA) group toxins and pectenotoxins (PTX) in the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.) and european flat oyster, *Ostrea edulis* (L.). *Journal of Shellfish Research* 28: 313-323.
- Lodeiros, C.J., Rengel, J.J., Freitas, L., Morales, F., Himmelman, J.H. 1998. Growth and survival of the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* maintained in suspended culture at three depths. *Aquaculture* 165: 41-50.
- Luckas, B. 1992. Phycotoxins in seafood - toxicological and chromatographic aspects. *Journal of Chromatography* 624: 439-456.
- Luedeking, A., Van Noorden, C.J.F., Koehler, A. 2005. Identification and characterisation of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 286: 167-175.
- Mackenzie, L.A. 2010. *In situ* passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as a monitoring tool. *Current opinion in biotechnology* 21: 326-331.
- Mackenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Suzuki, T., Selwood, A. 2005. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae* 4: 75-85.
- Mackenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Selwood, A. 2004. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): A new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves. *Toxicon* 44: 901-918.
- MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T. 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* 40: 1321-1330.
- Marr, J.C., McDowell, L.M., Quilliam, M.A. 1994. Investigation of derivatization reagents for the analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Natural Toxins* 2: 302-311.
- Marr, J.C., Hu, T., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Wright, J.L.C. 1992. Detection of new 7-O-acyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 30: 1621-1630.

- Mccarron, P., Emteborg, H., Hess, P. 2007. Freeze-drying for the stabilization of shellfish toxins in mussel tissue (*Mytilus edulis*) reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 2475-2486.
- McFadzen, I., Eufemia, N., Heath, C., Epel, D., Moore, M.N., Lowe, D. 2000. Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 50: 319-323.
- McNabb, P., Holland, P. 2003. Using liquid chromatography mass spectrometry to manage shellfish harvesting and protect public health. En: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J.L., Beiras, R. (Eds.), *Molluscan Shellfish Safety. Proceedings of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 179-186.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural Marino (MARM) 2008. Anuario de Estadística. 10 de mayo de 2010.
<http://www.mapa.es/estadistica/pags/anuario/2008/Anuario_2008.pdf>.
- Moore, M.N., Lowe, D.M., Soverchia, C., Haigh, S.D., Hales, S.G. 1997. Uptake of a non-calorific, edible sucrose polyester oil and olive oil by marine mussels and their influence on uptake and effects of anthracene. *Aquatic Toxicology* 39: 307-320.
- Moore, M.N., Willows, R.I. 1998. A model for cellular uptake and intracellular behaviour of particulate-bound micropollutants. *Marine Environmental Research* 46: 509-514.
- Moroño, A., Arévalo, F., Fernández, M.L., Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C., Blanco, J. 2003. Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* (LMK) during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. *Aquatic Toxicology* 62: 269-280.
- Moroño, A., Fernández, M.L., Franco, J.M., Martínez, A., Reyero, I., Míguez, A., Cacho, E., Blanco, J. 1998a. PSP and DSP detoxification kinetics in mussel, *Mytilus galloprovincialis*: Effect of environmental parameters and body weight. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela., pp. 445-448.
- Moroño, A., Maneiro, J., Pazos, Y., Blanco, J. 1998b. Modelling the accumulation of PSP toxins in galician mussels: results and perspectives. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Santiago de Compostela., pp. 441-444.
- Morton, S.L. 1998. Morphology and toxicology of *Prorocentrum faustiae* sp. nov., a toxic species of non-planktonic dinoflagellate from Heron Island, Australia. *Botanica Marina* 41: 565-569.
- Morton, S.L., Moeller, P.D., Young, K.A., Lanoue, B. 1998. Okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum* Faust isolated from the Belizian coral reef ecosystem. *Toxicon* 36: 201-206.

- Morton, B. 1983. Feeding and digestion in bivalvia En: Saleuddin, A.S.M. ,Wilbur, K.M. (Eds.), *The Mollusca*. Academic Press, London, pp. 65-147.
- Moser, G.A., McLachlan, M.S. 1999. A non-absorbable dietary fat substitute enhances elimination of persistent lipophilic contaminants in humans. *Chemosphere* 39: 1513-1521.
- Mounfort, D.O., Suzuki T, T.P. 2001. Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP contaminated mussels. *Toxicon* 39: 383-390.
- Mounfort, D.O., Kennedy, G., Garthwaite, I., Quilliam, M., Truman, P., Hannah, D.J. 1999. Evaluation of the phosphatase inhibition assay in the determination of okadaic acid in mussels. *Toxicon* 37: 909-922.
- Mountfort, D.O., Atkinson, M., Ponikla, K., Burke, B., Todd, K. 1996. Lysis of *Gymnodinium* species by the fungus *Verticillium lecanii*. *Botanica Marina* 39: 159-165.
- Murakami, Y., Oshima, Y., Yasumoto, T. 1982. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48: 69-72.
- Murata, M., Shimitami, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. 1982. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48: 549-552.
- Nagasaki, K., Yamaguchi, M. 1998a. Effect of temperature on the algicidal activity and the stability of HaV (*Heterosigma akashiwo* virus). *Aquatic Microbial Ecology* 15: 211-216.
- Nagasaki, K., Yamaguchi, M. 1998b. Intra-species host specificity of HaV (*Heterosigma akashiwo* virus) clones. *Aquatic Microbial Ecology* 14: 109-112.
- Nagasaki, K., Yamaguchi, M. 1997. Isolation of a virus infectious to the harmful bloom causing microalga *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*). *Aquatic Microbial Ecology* 13: 135-140.
- Nagashima, Y., Noguchi, T., Tanaka, M., Hashimoto, K. 1991. Thermal degradation of paralytic shellfish poison. *Journal of Food Science* 56: 1572-1575.
- Nam, K.Y., Hiro, M., Kimura, S., Fujiki, H., Imanishi, Y., 1990. Permeability of a non-TPA-type tumor promoter, okadaic acid, through lipid bilayer membrane. *Carcinogenesis* 11 (7): 1171-1174.
- Norte, M., Padilla, M., Fernández, J.J., Souto, M.L. 1994. Structural determination and biosynthetic origin of two ester derivatives of okadaic acid isolated from *Prorocentrum lima*. *Tetrahedron Letters* 50: 9175-9180.
- Novoa, S., Martinez, D., Ojea, J., Soudant, P., Samain, J.F., Moal, J., Rodriguez, J.L. 2002. Ingestion, digestion, and assimilation of gelatin-acacia microcapsules incorporating deuterium-labeled arachidonic acid by larvae of the clam *Venerupis pullastra*. *Journal of Shellfish Research* 21: 649-658.

- Nzoughet, K.J., Hamilton, J.T.G., Floyd, S.D., Douglas, A., Nelson, J., Devine, L., Elliott, C.T., 2008. Azaspiracid: first evidence of protein binding in shellfish. *Toxicon* 51: 1255–1263.
- Ofuji, M., Satake, M., Oshima, Y., McMahon, T., James, K.J., Yasumoto, T. 1999. A sensitive and specific determination method for azaspiracids by liquid chromatography mass spectrometry. *Natural Toxins* 7: 247-250.
- Ogino, H., Kumagai, M., Yasumoto, T. 1998. Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Natural Toxins* 5: 255-259.
- Owen, G. 1972. Lysosome, peroxisomes and bivalves. *Science Progress (Oxford)* 6: 299-318.
- Owen, G. 1970. The fine structure of the digestive tubules of the marine bivalve *Cardium edule*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 258: 245-260.
- Owen, G. 1955. Observations on the stomach and digestive diverticula of the Lamellibranchia. I. The Anisomyana and Eulamellibranchia. *The Quarterly Journal of Microscopical Science* 96: 517-537.
- Pan, Y., Cembella, A.D., Quilliam, M.A. 1999. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Marine Biology* 134: 541-549.
- 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*. *Aquatic Microbial Ecology* 45: 101-106.
- Paz, B., Daranas, A.H., Cruz, P.G., Franco, J.M., Norte, M., Fernández, J.J. 2008. Identification of 19-*epi*-okadaic acid, a new diarrhetic shellfish poisoning toxin, by liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Marine Drugs* 6: 489-495.
- Paz, B., Riobó, P., Fernández, M.L., Fraga, S., Franco, J.M. 2004. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon* 44: 251-258.
- Pizarro, G., Paz, B., González-Gil, S., Franco, J.M., Reguera, B. 2009. Seasonal variability of lipophilic toxins during a *Dinophysis acuta* bloom in Western Iberia: differences between picked cells and plankton concentrates. *Harmful Algae* 8: 926-937.
- Pizarro, G. 2008. Estudio, mediante LC-MS, de la variabilidad del perfil y contenido de toxinas, en poblaciones de *Dinophysis* spp. agentes de episodios DSP en las Rías baixas Gallegas. *Tesis Doctoral. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidad de Vigo*: 222.
- Pizarro, G., Paz, B., Franco, J.M., Suzuki, T., Reguera, B. 2008. First detection of Pectenotoxin-11 and confirmation of OA-D8 diol-ester in *Dinophysis acuta* from European waters by LC-MS/MS. *Toxicon* 52: 889-896.
- Planas, M., Fernández Reiriz, M.J., Ferreiro, M.J., Labarta, U. 1990. Effect of selected variables on the preparation of gelatin-acacia microcapsules for aquaculture. *Aquacultural Engineering*. 9: 329-341.

- Pleasance, S., Quilliam, M., De Freitas, A.S.W., Marr, J., Cembella, A. 1990. Ion-spray mass spectrometry of marine toxins. II. Analysis of diarrhetic shellfish toxins in plankton by liquid chromatography-mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 4: 206-213.
- Prassopoulou, E., Katikou, P., Georgantelis, D., Kyritsatis, A. 2009. Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in Greece using the mouse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection. *Toxicon* 53: 214-227.
- Quilliam, M.A. 2003. Chemical method for lipophilic shellfish toxins. En: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 211-245.
- Quilliam, M.A., Gago-Martinez, A., Rodríguez-Vázquez, J.A. 1998. Improved method for preparation and use of 9-anthryldiazomethane for derivatization of hydroxycarboxylic acids. Application to diarrhetic shellfish poisoning toxins. *Journal of Chromatography A* 807: 229-239.
- Quilliam, M.A., Hardstaff, W.R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Ross, N.W., Windust, A.J. 1996. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. En: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 289-292.
- Quilliam, M., Ross, N.W. 1996. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins and metabolites in plankton and shellfish by ion-spray liquid chromatography-mass spectrometry. En: Snyder, A.P., Washington, D.C. (Eds.), *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. American Chemical Society, pp. 351-364.
- Quilliam, M.A. 1995. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International* 78: 555-570.
- Reboreda, A., Lago, J., Chapela, M.J., Vieites, J.M., Botana, L.M., Alfonso, A., Cabado, A.G. 2010. Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes. *Toxicon* 55: 235-243.
- Rundberget, T., Gustad, E., Samdal, L.A., Sandvik, M., Miles, C. 2009. A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers. *Toxicon* 53: 543-550.
- Sampayo, M.A., Alvito, P., Franca, S., Sousa, I. 1990. *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. En: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 215-220.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K.J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. 1998. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *Journal of American Chemical Society* 120: 9967-9968.

- Satake, M., MacKenzie, L., Yasumoto, T. 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Natural Toxins* 5: 164-167.
- Schantz, E.J., Mold, J., D., Howard, W.L., Bowden, J.P., Stanger, D.W., Lynch, J.M., Wintersteiner, O.P., Dutcher, J.D., Walters, D.R., Rieges, B. 1961. Paralytic shellfish poison. VIII. Some chemical and physical properties of purified clam and mussels poisons. *Canadian Journal of Chemistry* 39: 2117-2123.
- Schantz, E.J., Mold, J., D., Stanger, D.W., Shaver, J., Riel, F.J., Bowden, J.P., Lynch, J.M., Wyler, R.S., Rieges, B., Sommer, H. 1957. Paralytic shellfish poison. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clam and mussel tissues. *Journal of American Chemical Society* 79: 5230-5235.
- Shen, J.L., Ganzlin, G., Luckas, B. 1991. HPLC determination of DSP toxins. En: Fremy, J.M. (Ed.), *Proceedings of Symposium on Marine Biotoxins*. Maison Alforts, Paris, pp. 101-106.
- Shewstowsky, W.S., Quilliam, M.A., Sikorski, H.M. 1992. An idyotypic -anti idyotypic competitive immunoassay for quantitation of okadaic acid. *Toxicon* 30: 1441-1448.
- Simon, J.F., Vernoux, J.P. 1994. Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphate. *Natural Toxins* 2: 293-301.
- Southgate, P.C., Lou, D.C. 1995. Improving the n-3 HUFA composition of Artemia using microcapsules containing marine oils. *Aquaculture* 13: 91-99.
- Stabell, O.B., Steffenak, I., Pedersen, K., Underdal, B. 1991. Diversity of shellfish toxins of "diarrhetic" type revealed by biological and chemical assays. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 33: 273-282.
- Statistical Office of the European Communities (EUROSTAT) 2007. Fishery Statistics 1990-2006. 10 de mayo de 2010. <<http://ec.europa.eu/eurostat>>.
- Steidinger, K.A. 1993. Some taxonomic and biologic aspects of toxic dinoflagellates. En: Falconer, I.R. (Ed.), *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press, New York, US, pp. 1-28.
- Suárez-Gómez, B., Souto, M.L., Cruz, P.G., Fernández, J.J., Norte, M. 2005. New targets in diarrhetic shellfish poisoning control. *Journal of Natural Products* 68: 596-599.
- Subba Rao, D.V., Quilliam, M.A., Pocklington, R. 1988. Domoic acid - A neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 2076-2079.
- Sugiyama, N., Konoki, K., Tachibana, K. 2007. Isolation and characterization of Okadaic acid binding proteins from the marine sponge *Halichondria okadae*. *Biochemistry* 46: 11410-11420.
- Suzuki, T., Beuzenberg, V., Mackenzie, L., Quilliam, M.A. 2004. Discovery of okadaic acid esters in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18: 1131-1138.

- Suzuki, T., Beuzenberg, V., Mackenzie, L., Quilliam, M.A. 2003. Liquid chromatography-mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Journal of Chromatography A* 992: 141-150.
- Suzuki, T., Mitsuya, T. 2001. Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 39: 905-908.
- Suzuki, T., Yasumoto, T. 2000. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish-poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves. *Journal of Chromatography A*. 874: 199-206.
- Suzuki, T., Ota, H., Yamasaki, M. 1999. Direct evidence of transformation of Dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-Dinophysistoxin-1 (Dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon* 37: 187-198.
- Svensson, S., Forlin, L. 2004. Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquatic Toxicology* 66: 405-418.
- Svensson, S. 2003. Depuration of okadaic acid (diarrhetic shellfish poisoning) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture* 218: 277-291.
- Tachibana, K., Scheuer, P., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Enden, V., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, F. 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus halichondria. *Journal of American Chemical Society* 103: 2469-2471.
- Takai, A., Mieskes, G. 1991. Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity on protein phosphatases. *Biochemical Journal* 275: 233-239.
- 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 oivifrons*. *Toxicon* 42: 29-33.
- Taroncher-Oldenburg, G., Kulis, D.M., Anderson, D.M. 1997. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnology and Oceanography* 42: 1178-1188.
- Ten-Hage, L., Delaunay, N., Pichon, V., Coute, A., Puiseux-Dao, S., Turquet, J. 2000. Okadaic acid production from the marine benthic dinoflagellate *Prorocentrum arenarium* Faust (*Dinophyceae*) isolated from Europa Island coral reef ecosystem (SW Indian Ocean). *Toxicon* 38: 1043-1054.
- Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M., Yasumoto, T. 1990. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. The effects on mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon* 28: 1095-1104.

- Thomas, H.F.A., Gerritsen, J.L. 2000. The most effective and environmentally friendly way of killing algae. Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms, Tasmania, Australia.
- Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A. 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (*Dinophyceae*) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology* 44: 63-79.
- Torgersen, T., Miles, C., Rundberget, T., Wilkins, A. 2008a. New esters of okadaic acid in seawater and blue mussels (*Mytilus edulis*). *Agricultural and Food Chemistry* 56, 9628-9635.
- Torgersen, T., Sandvik, M., Lundve, B., Lindegarth, S. 2008b. Profiles and levels of fatty acid esters of okadaic acid group toxins and pectenotoxins during toxin depuration. Part II: Blue mussels (*Mytilus edulis*) and flat oyster (*Ostrea edulis*). *Toxicon* 52: 418-427.
- Tubaro, A., Sirari, L., Della Loggia, R., Yasumoto, T. 1998. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from the northern Adriatic Sea. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia & IOC of UNESCO, Santiago de Compostela., pp. 470-472.
- Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Sosa, S., Della Loggia, R., Yasumoto, T. 1996a. A protein phosphatase 2a inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon* 34: 743-752.
- Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Vertua, R., Della Loggia, R., Yasumoto, T. 1996b. Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels. *Toxicon* 34: 965-974.
- Underdal, B., Yndestad, M., Aune, T. 1985. DSP intoxication in Norway and Sweden, Autumn 1984-Spring 1985. En: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York, pp. 489-494.
- Usagawa, T., Nishimura, M., Itoh, Y., Uda, T., Yasumoto, T. 1989. Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge *Halicondria okadai*. *Toxicon* 27: 1323-1330.
- Usami, M., Satalke, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y., Yasumoto, T. 1995. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Journal of American Chemical Society* 117: 5389-5390.
- Vale, P. 2010. Profiles of fatty acids and 7-O-acyl okadaic acid esters in bivalves: Can bacteria be involved in acyl esterification of okadaic acid?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 151: 18-24.
- Vale, P. 2006a. Detailed profiles of 7-O-acyl esters in plankton and shellfish from the Portuguese coast. *Journal of Chromatography A* 1128: 181-188.
- Vale, P. 2006b. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins, Part II: Offshore bivalve species. *Toxicon* 47: 163-173.

- Vale, P. 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: A phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. *Toxicon* 44: 123-134.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M. 2002a. Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the northwest coast determined by LC-MS-a widespread phenomenon. *Toxicon* 40: 33-42.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M. 2002b. First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro Lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon* 40: 989-996.
- Vale, P., Sampayo, M.A. 1999. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon* 37: 1109-1121.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M., Quilliam, M. 1998. DSP Complex toxin profiles relation with *Dinophysis* spp occurrence and domoic acid confirmation by LC-MS in Portuguese bivalves. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 503-506.
- Van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G.J.A., Waldock, M. 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *Journal of Natural Toxins* 2: 41-82.
- Vanden Heuvel, J.P. 2002. Xenobiotic receptor systems. Introduction and overview. En: Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H., Mattes, W.B., Greenlee, W.F. (Eds.), *Comprehensive toxicology, vol. XIV*. Elsevier Science BV, Amsterdam, pp. 646.
- Vernoux, J.P., Le Baut, C., Masselin, P., Marais, C., Baron, B., Choumiloff, R., Proniewski, F., Nizard, G., Bohec, M. 1993. The use of *Daphnia magna* for the detection of okadaic acid in mussel extracts. *Food Additive and Contaminants* 10: 603-608.
- Vidal, A., Correa, J., Blanco, J. 2009. Effect of some habitual cooking processes on the domoic acid concentration in the cockle (*Ceratoderma edule*) and Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Food Additives & Contaminants, Part A* 26: 1080-1095.
- Vieites, J.M., Botana, L.M., Vieytes, M.R., Leira, F.J. 1999. Canning process that diminishes paralytic shellfish poison in naturally contaminated mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Journal of Food Protection* 62: 515-519.
- Vieytes, M.R., Fontal, O.I., Leira, F., Baptista de Sousa, J.M.V., Botana, L.M. 1997. A fluorescent microplate assay for diarrheic shellfish toxins. *Analytical Biochemistry* 248: 258-264.
- Waldmann, P., Pivcevic, B., Muller, W.E., Zahn, R.K., Kurelec, B. 1995. Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*. *Mutation Research* 342: 113-123.
- Weinstein, J.E. 1995. Fine structure of the digestive tubule of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *Journal of Shellfish Research* 14: 97-103.

Widdows, J., Fieth, P., Worral, C.M. 1979. Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 50: 195-207.

Wong, V.K. 1998. Microencapsulation of amino acids for prawn feed additives. Tesis doctoral. Department of Chemical Engineering, University of Queensland (Australia).

Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI) 2008. 28 de marzo de 2011. <<http://www.whoi.edu/redtide/page.do?pid=14899&tid=542&cid=65844&c=3>>.

Wright, J.L.C., Boyd, R.K., de Freitas, A.S.W., Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M.V., McCulloch, A.W., McInnes, A.G., Odense, P., Pathak, V., Quilliam, M.A., Ragan, M.A., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A., Gilgan, M., Richard, D.J.A., Dewar, D. 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from Eastern Prince Edward Island. *Canadian Journal of Chemistry* 67: 481-490.

Yasumoto, T., Igarashi, T., Furey, A., James, K.J., Koike, K. 2002. Discovery of the origin of azaspiracids. Abstract X International Conference on Harmful Algal Blooms, St. Peterbourg, Florida, USA.

Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J.S., Torigoe, K. 1989. Polyeter toxins produced by dinoflagellates. En: Natori, S., Hasimoto, K., Ueno, T. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins*. Elsevier, Amsterdam, pp. 375-382.

Yasumoto, Y., Seino, N., Murakami, Y., Murata, M. 1987. Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biological Bulletin* 172: 128-131.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G., Clardy, J. 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41: 1019-1025.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N. 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46: 1405-1411.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M. 1979. Occurrence of a new type of toxic shellfish in Japan and chemical properties of the toxin. En: Taylor, D.L., Seliger, H.W. (Eds.), *Toxic dinoflagellate blooms*. Elsevier, New York, pp. 395-398.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M. 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of Japanese Society Sciences Fisheries* 44: 1249-1255.

Yonge, C.M. 1926. The digestive diverticula in the lamellibranchs. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 54: 703-718.

Yoshinaga, I., Kawai, T., Ishida, Y. 1997. Analysis of algicidal ranges of the bacteria killing the marine dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* isolated from Tanabe Bay, Wakayama Pref, Japan. *Fisheries Science* 63: 94-98.

Zhou, J., Fritz, L. 1994. Okadaic acid antibody localizes to chloroplasts in the DSP-toxin-producing dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum maculosum*. *Phycologia* 33: 455-461.

