



TESIS DOCTORAL
Modalidad de compendio de artículos

**MECANISMOS DE TOXICIDAD Y
PERMEABILIDAD TRANSEPITELIAL DE
TOXINAS MARINAS Y DE AGUA DULCE**

Fdo.

Diego Alberto Fernández Martínez

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

FACULTAD DE VETERINARIA

LUGO

2015



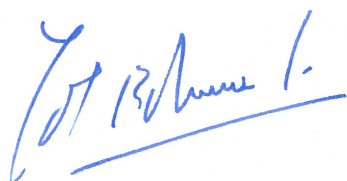
Prof. Dr. D. **Luis M. Botana López**, como Director de la tesis titulada: “Mecanismos de toxicidad y permeabilidad transepitelial de toxinas marinas y de agua dulce”.

Por la presente **DECLARO**:

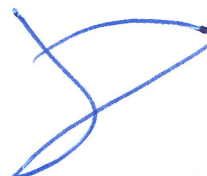
Que la tesis presentada por Don Diego Alberto Fernández Martínez es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTICULOS, en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis serán presentados por ninguno de ellos en otra tesis de Doctorado, lo que firmo bajo mi responsabilidad.

Santiago de Compostela, a 5 de Mayo de 2015.



Luis M. Botana López
Doctor en Farmacia
Codirector de Tesis



Diego Alberto Fernández Martínez



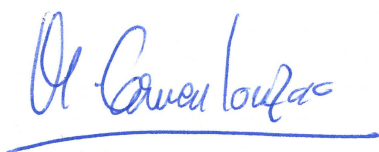
Prof. Dr. D. **M. Carmen Louzao Ojeda**, como Directora de la tesis titulada: “Mecanismos de toxicidad y permeabilidad transepitelial de toxinas marinas y de agua dulce”.

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis presentada por Don Diego Alberto Fernández Martínez es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTICULOS, en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis serán presentados por ninguno de ellos en otra tesis de Doctorado, lo que firmo bajo mi responsabilidad.

Santiago de Compostela, a 5 de Mayo de 2015.



M. Carmen Louzao Ojeda
Doctora en Biología
Codirectora de Tesis



Diego Alberto Fernández Martínez



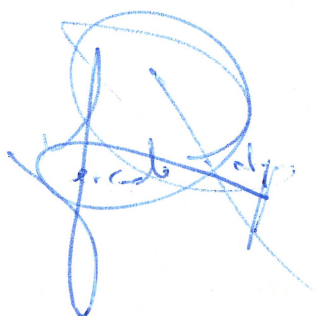
Prof. Dra. Dña. **Mercedes Rodríguez Vieytes**, como Directora de la tesis titulada: “Mecanismos de toxicidad y permeabilidad transepitelial de toxinas marinas y de agua dulce”.

Por la presente **DECLARO**:

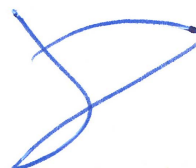
Que la tesis presentada por Don Diego Alberto Fernández Martínez es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTICULOS, en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis serán presentados por ninguno de ellos en otra tesis de Doctorado, lo que firmo bajo mi responsabilidad.

Santiago de Compostela, a 5 de Mayo de 2015.



Mercedes Rodríguez Vieytes
Doctora en Biología
Codirectora de Tesis



Diego Alberto Fernández Martínez





“Lo simple puede ser más difícil que lo complejo. Tienes que trabajar duro manteniendo tu mente clara para hacer las cosas simples. Vale la pena llegar hasta el final con esto, porque cuando terminas puedes mover montañas.

Steve Jobs

(1955-2011)



AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar a mis directores Luis Botana, Mercedes R. Vieytes y María del Carmen Louzao por darme la oportunidad de realizar esta tesis en su departamento, compartir conmigo su sabiduría y guiarme en esta nueva y excitante etapa de mi vida.

Al resto de profesores del Departamento de Farmacología en especial a Natalia Vilariño por su inestimable ayuda y consejos a lo largo de estos años. También a Amparo Alfonso por estar siempre disponible para solventar cuestiones logísticas y de otra índole y a Carmen Vale.

A la doctora Begoña Espiña, por ser la persona que me inició en la investigación cuando llegué y por su inagotable paciencia a la hora de transmitirme sus conocimientos.

A todos mis compañeros de laboratorio, incluyendo a los que se han ido y a los que todavía están luchando por alcanzar su meta: Ana, Andrea, Andrés, Álvaro, Araceli, Carmen, Carolina, Eva Alonso, Eva Cagide, Henar, Jon, Jose, Juan, Laura, María, María Roel, Marta, Mercedes, Olalla, Paula, Paula Abal, Paz, Rebeca, Sara, Sandra, Silvia, Tania y Víctor. Muy especialmente agradecer al grupo de Granada y de Peniche por su amistad y su apoyo en momentos difíciles. Sin vosotros esto hubiese sido muchísimo más duro. ¡Gracias gente!

A todos mis amigos de Ourense que de un modo u otro me ayudaron durante estos años, haciéndome reír y pasando momentos inolvidables en buena compañía: A Julio y a Lorena (y a Noelia y Sergio), a Manu e Iria, a Pati y a Luís, a Víctor, a mis compañeros de Salesianos y “personajes míticos” y a todos los que me haya dejado por el camino. ¡Gracias por estar ahí!

A Inés y a Manolo, sus “tuppers”, su cálida acogida finde tras finde y su ayuda durante esta etapa han sido incalculables. Gracias de corazón.

A toda mi familia y en especial a mis padres, Alberto e Isabel y a mi hermana Nuria, por estar siempre apoyándome de todas las maneras posibles incluso desde la distancia. Ellos me han formado como persona y han hecho posible que haya llegado hasta aquí. Gracias por creer en mi.

Finalmente a Silvia, la persona que quizás más haya “sufrido” directamente las consecuencias derivadas de este período de mi vida pero que jamás ha dejado de ayudarme ofreciéndome todo su apoyo incondicional y cariño. ¡Gracias por aguantarme!. Espero compensarte en esta nueva etapa que acabamos de comenzar. Te quiero.



Mecanismos de toxicidad y permeabilidad transepitelial de toxinas marinas y de agua dulce

RESUMEN

La presente tesis doctoral aporta datos experimentales que permiten comprender mejor los efectos que las toxinas marinas Palitoxina (PLTX), Ácido Okadaico (OA), Dinofisistoxina 1 y 2 (DTX-1 y DTX-2) y la toxina de agua dulce Cilindrospermopsina (CYN), pueden ejercer sobre la salud humana y animal. Con esta finalidad se investiga la citotoxicidad y las alteraciones citomorfológicas que estos compuestos desencadenan en células intestinales, hepáticas y nerviosas. También se evalúa la toxicidad oral mediante el estudio de la permeabilidad intestinal empleando un método *in vitro* con células intestinales humanas, Caco-2. La PLTX es una de las toxinas marinas más potentes y puede provocar intoxicaciones letales en el hombre. Los resultados obtenidos revelan que la PLTX ejerce un efecto citotóxico marcado en células intestinales humanas con cambios en la ultraestructura de las mismas y pérdida de la integridad de la monocapa sin afectar a las uniones estrechas entre células. A pesar de esto, su permeabilidad intestinal es baja, explicando así la menor toxicidad de la PLTX por vía oral que por otras vías de administración. El OA, la DTX-1 y la DTX-2 también causan intoxicaciones alimentarias debidas a la ingestión de marisco contaminado con estas ficotoxinas. Los resultados muestran que la DTX-1 tiene una mayor potencia citotóxica que el OA o la DTX-2. Además la DTX-1 afecta a la integridad de la monocapa de células Caco-2 actuando sobre una de las proteínas que forman las uniones estrechas, la ocludina. Así mismo, la permeabilidad intestinal de DTX-1 sugiere que la toxicidad oral de este compuesto es mayor que la de OA y DTX-2. Las toxinas de agua dulce como la CYN se puede encontrar en lagos, embalses, ríos y presas suponiendo un riesgo para la salud asociado al agua de consumo. Los datos de permeabilidad indican un paso moderado de CYN a través del epitelio intestinal. Apenas tiene efectos tóxicos, ni afecta a la integridad de la monocapa en células Caco-2. Sin embargo, si que altera la viabilidad de la línea celular hepática Clone 9 pero su toxicidad no está relacionada con una inhibición de la síntesis de proteínas o con una reducción de los niveles de glutatión (GSH).

Palabras clave:

palitoxina, dinofisistoxinas, cilindrospermopsina, permeabilidad transepitelial, citotoxicidad

Toxicity mechanisms and transepithelial permeability of marine and freshwater toxins

SUMMARY

The present doctoral thesis provides experimental data that leads to a better understanding of the effects that marine toxins Palytoxin (PLTX), Okadaic Acid (OA), the Dinophysistoxins 1 and 2 (DTX-1 and DTX-2) and the freshwater toxin Cylindrospermopsin (CYN) can have on human and animal health. For this purpose we investigate the cytotoxicity and cytomorphological alterations that these compounds trigger on different intestinal, hepatic and nervous cells. Also the oral toxicity is evaluated by studying the intestinal permeability employing an *in vitro* method with intestinal human cells, Caco-2. PLTX is among the most potent marine toxins and can cause lethal intoxications in humans. The results show that PLTX has a strong cytotoxic effect on intestinal cells with ultrastructure alterations and loss of monolayer integrity but with cellular tight-junctions unaffected. Despite this, the intestinal permeability is low, offering an explanation to the lower oral toxicity than toxicity obtained by other administration routes. OA, DTX-1 and DTX-2 cause diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in humans due to the consumption of shellfish that accumulate the phycotoxins. Results indicate that DTX-1 has a higher cytotoxic potency than OA or DTX-2. Besides DTX-1 affects the integrity of the Caco-2 monolayer by the alteration of the tight-junction protein occludin. Furthermore, the intestinal permeability of DTX-1 suggests a higher oral toxicity of this toxin compared to OA and DTX-2. Freshwater toxins as CYN are found in lakes, ponds and rivers and water supplies presenting a health risk associated to the drinking water. Permeability data indicated a moderated passage of the toxin through the intestinal epithelium. Barely exerts any damage or effect on the integrity of the monolayer of Caco-2 cells. However, it has a dramatic effect on the viability of hepatic Clone 9 cells but this toxicity is not related to the inhibition of protein synthesis or the reduction of glutathione (GSH) levels.

Keywords:

palytoxin, dinophysistoxins, cylindrospermopsin, transepithelial permeability, citotoxicity

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- ARfD:** Acute Reference Dose. Dosis aguda de referencia.
- ASP:** Amnesic Shellfish Poisoning. Intoxicación amnésica por consumo de marisco.
- AZAs:** Azaspirácidos.
- AZP:** Azaspiracid Poisoning. Intoxicación por azaspirácidos.
- BGAs:** Blue-Green Algae Supplements. Suplementos de algas verde-azuladas.
- CFP:** Ciguatera Fish Poisoning. Intoxicación de ciguatera por consumo de pescado.
- CI:** Cyclic Imines. Iminas cíclicas.
- CP450:** Citocromo P450.
- CTXs:** Ciguatoxinas.
- CYNs:** Cylindrospermopsins. Cilindrospermopsinas .
- DA:** Domoic Acid. Ácido Domoico.
- DL₅₀:** Dosis letal 50.
- DSP:** Diarrhetic Shellfish Poisoning. Intoxicación diarreica por consumo de marisco.
- DTXs:** Dinofisistoxinas.
- EFSA:** European Food and Safety Authority. Autoridad Europea de seguridad alimentaria.
- ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
- FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura.
- GSH:** Glutation reducido.
- GCL:** Glutamato Cisteína Ligasa.
- GCLC:** Subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa.
- GYM:** Gymnodimina.
- HABs:** Harmful Algal Blooms. Floraciones algales nocivas.
- IC₅₀:** Concentración inhibitoria 50.
- IEFs:** Inhibitory Equivalency Factors. Factores de equivalencia inhibitoria.
- ILs:** Interleucinas.
- IOC:** Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Comisión oceanográfica intergubernamental de la UNESCO.
- i.p.:** Intraperitoneal.
- i.v.:** Intravenosa.
- LOAEL:** Lowest Observed Adverse Effect Level. Nivel más bajo que causa efecto observable.

LPS: Lipopolisacáridos.

MCs: Microcistinas.

MTXs: Maitotoxinas.

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level. Nivel sin efecto adverso observable.

NODs: Nodularinas.

NSP: Neurotoxic Shellfish Poisoning. Intoxicación neurotóxica por consumo de marisco.

OA: Okadaic Acid. Ácido okadaico.

PbTx: Brevetoxinas.

PC: Policarbonato.

PET: Polyethylene Terephthalate. Tereftalato de polietileno.

PLTXs: Palitoxinas.

PPs: Protein Phosphatases. Proteína fosfatasa.

PTXs: Pectenotoxinas.

PS: Poliestireno.

PSP: Paralytic Shellfish Poisoning. Intoxicación paralizante por consumo de marisco.

STXs: Saxitoxinas

TCR: T Cell Receptor. Receptor de linfocitos T.

TEFs: Toxic Equivalency Factors. Factores de equivalencia tóxica.

TEER: Trans Epithelial Electrical Resistance. Resistencia eléctrica transepitelial.

TEM: Transmission Electron Microscopy. Microscopía electrónica de transmisión

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha. Factor alfa de necrosis tumoral

WHO: World Health Organization. Organización mundial de la salud.

YTXs: Yesotoxinas

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ficotoxinas marinas	2
1.1.1. Clasificación de ficotoxinas marinas	5
1.1.2. Palitoxina	9
1.1.2.1 Organismo productor	11
1.1.2.2 Estructura y propiedades químicas	12
1.1.2.3 Mecanismo de acción	14
1.1.2.4 Sintomatología, vías de intoxicación y toxicidad	16
1.1.2.5 Métodos de detección	19
1.1.3. Ácido Okadaico y Dinofisistoxinas	22
1.1.3.1 Organismo productor	23
1.1.3.2 Estructura y propiedades químicas	25
1.1.3.3 Mecanismo de acción	27
1.1.3.4 Sintomatología, vías de intoxicación y toxicidad	31
1.1.3.5 Métodos de detección	33
1.2. Cianotoxinas	35
1.2.1. Clasificación de las cianotoxinas	35
1.2.2. Cilindrospermopsina	37
1.2.2.1 Organismo productor	39
1.2.2.2 Estructura y propiedades químicas	41
1.2.2.3 Mecanismo de acción	42
1.2.2.4 Sintomatología, vías de intoxicación y toxicidad	43
1.2.2.5 Métodos de detección	46
1.3 Viabilidad celular y citotoxicidad	49
1.3.1 Métodos para el estudio de la citotoxicidad de sustancias	49
1.4 Absorción y permeabilidad intestinal	53
1.4.1 Modelos de estudio de la absorción intestinal de sustancias	57
1.4.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la permeabilidad intestinal mediante células Caco-2	60
2. OBJETIVOS	69
3. PUBLICACIONES	73
<i>The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (Caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity</i>	75
<i>Experimental Basis for the High Oral Toxicity of Dinophysistoxin 1: A Comparative Study of DSP</i>	77
<i>Evaluation of the intestinal permeability and cytotoxic effects of cylindrospermopsin</i>	79
4. DISCUSIÓN	83
5. CONCLUSIONES	99
6. BIBLIOGRAFÍA	103





1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

El agua, un elemento esencial para toda forma de vida conocida hasta la fecha, ocupa casi tres cuartas partes de la superficie del planeta tierra. En la investigación hidrológica además de evaluar los parámetros físicos y químicos se estudia el fitoplancton para establecer la calidad del agua y pronosticar las variaciones en las redes tróficas. Cuando las condiciones ambientales son favorables (intensidad lumínica, temperatura, pH, eutrofización y otros parámetros físico-químicos del agua) algunas de las especies que conforman el fitoplancton (alrededor de 300) son capaces de proliferar masivamente causando los episodios popularmente conocidos como “mareas rojas” [1,2]. El término marea roja se acuñó inicialmente para designar las proliferaciones de algas rojas, pero en la actualidad se utiliza para hacer referencia a cualquier tipo de proliferación algal independientemente del color del pigmento fotosintético dominante en la especie productora. Esto es, existen “mareas rojas” con dominancia de color amarillo, verde, marrón, azul o incluso incoloras. No obstante, el término correcto a emplear sería el de “proliferación masiva de microalgas”. Cuando estas proliferaciones incluyen especies de algas capaces de producir o liberar biotoxinas, en este caso denominadas ficotoxinas, el fenómeno natural recibe el nombre de floraciones algales nocivas, HABs (del inglés Harmful Algal Blooms) [3]. El problema radica en que las microalgas tóxicas son ingeridas y sus toxinas acumuladas por otros organismos acuáticos que posteriormente pueden ser consumidos por el hombre suponiendo un riesgo para la salud pública.

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de la toxicidad de algunos de estos compuestos en el hombre, estudiando además su llegada a la circulación sanguínea tras ser ingeridos en el alimento o con el agua. Con esta finalidad se hará una breve descripción de las toxinas marinas y de agua dulce utilizadas en nuestros experimentos así como de algunos procesos de citotoxicidad y permeabilidad celular estudiados durante el presente trabajo de investigación.

1.1. Ficotoxinas marinas

Las ficotoxinas marinas son productos naturales del metabolismo de las microalgas. Sin embargo, no se conoce con exactitud la función real de las mismas en el fitoplancton. Se han propuesto diversas teorías. Una de ellas considera a las ficotoxinas como productos secundarios de ciertas rutas metabólicas, es decir, sin un papel esencial para el funcionamiento básico y el desarrollo del organismo productor [4]. No obstante, desde un punto de vista evolutivo, parece poco probable que siendo tantas las especies distintas que generan este tipo de sustancias y su extensión, se hayan mantenido como un mero vestigio evolutivo sin ninguna otra función asociada. Otra hipótesis propuesta es que las ficotoxinas sean compuestos generados específicamente para afectar negativamente al crecimiento, desarrollo, supervivencia y/o reproducción de otros organismos competidores, incluso de niveles tróficos superiores [5], lo que se conoce con el término alelopatía negativa. Se ha demostrado, por ejemplo, que algunos dinoflagelados tales como *Karenia brevis* o *Alexandrium* sp. son capaces de sintetizar sustancias que dañan o lisan rápidamente a otros organismos que compiten por los mismos nutrientes limitantes [6-8]. Otra explicación, es la posible generación de estas sustancias

tóxicas debido a la presencia de bacterias viviendo en simbiosis con las microalgas. Según esta teoría, estas bacterias serían las responsables de la síntesis de dichas sustancias tóxicas o al menos necesarias para que las microalgas las generen. [9,10]. Finalmente, otras hipótesis barajan la posibilidad de que las ficotoxinas actúen como sustancias químicas de comunicación similares a las fitohormonas en plantas terrestres o incluso que sean una vía de reserva de nitrógeno (N_2) [4].

Independientemente de la función real que pudiesen tener estas sustancias, lo verdaderamente importante es la repercusión que tienen en la salud pública pero también el gran impacto medioambiental y socioeconómico que provocan en las zonas donde aparecen.

Aunque las proliferaciones algales son un fenómeno natural que en ciertos lugares del globo se produce con frecuencia, sobre todo en zonas tropicales con aguas cálidas y calmadas, desde hace más de tres décadas, el número de HABs se ha venido incrementando en todo el mundo, incluso en aquellas zonas más frías donde no eran habituales (Europa) [11,12]. Las razones de este aumento de las proliferaciones no se conocen con exactitud, pero se han propuesto numerosos factores que podrían ser desencadenantes de las mismas: el cambio climático, las diferentes actividades antropogénicas que afectan al medioambiente, la eutrofización de aguas (natural o inducida), cambios en las técnicas de cultivo de mariscos, el incremento del tráfico marítimo y el vertido de aguas de lastre de los barcos (**Figura 1**) o incluso las más obvias como son el avance en la detección y descubrimiento de nuevas ficotoxinas o las mejoras en los programas de monitorización y control de calidad de los alimentos en distintos países. [13,14]. Lo que si está claro, es

INTRODUCCIÓN

que el aumento de la incidencia de estos fenómenos tiene repercusiones en la salud pública pero también en actividades como el turismo, la pesca o el cultivo de ciertos mariscos debido al tremendo impacto económico negativo que esto acarrea (limitación del baño en playas, cierre de bateas, limitación de la pesca en ciertas zonas etc.).

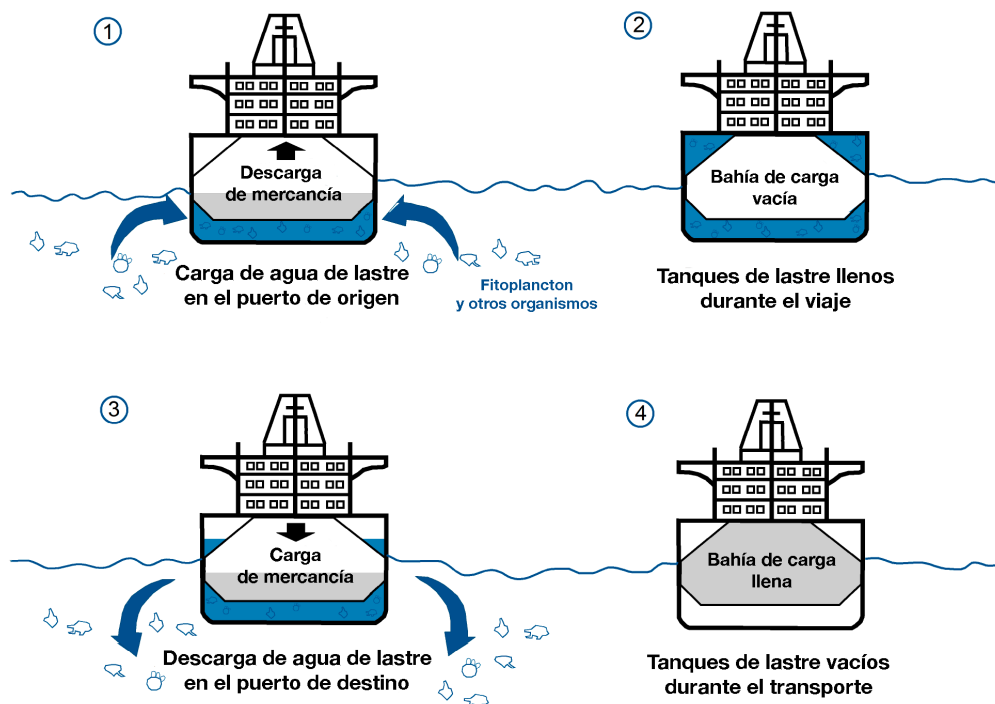


Figura 1: Carga y descarga de aguas de lastre. En esta figura se esquematiza como el transporte de mercancías en grandes buques de carga permite que indirectamente se trasladen especies foráneas de fitoplancton de un lugar a otro debido a las aguas de lastre empleadas para equilibrar la carga del barco.

Adaptado de: http://lms.seos-project.eu/learning_modules/marinepollution/marinepollution-c04-p05.html

Los dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias son los principales constituyentes del fitoplancton, tanto marino como de agua dulce. Al ser la base de las redes tróficas del ecosistema, otros organismos se alimentan de ellos, principalmente bivalvos filtradores o crustáceos que a su vez sirven de alimento para otros organismos de niveles tróficos superiores como peces. La

mayoría de ficotoxinas son susceptibles de ser bioacumulados en organismos que pueden actuar como vectores de transmisión para el hombre cuando consume estos productos tóxicos [15,16]. Sin embargo, existen también otras vías de intoxicación muy comunes como son la ingestión de agua contaminada, el baño o contacto directo con dichas aguas o incluso la inhalación de aerosoles generados por las mismas, por ejemplo, con el batir de las olas en zonas costeras. La vía o vías de intoxicación, el tipo y la gravedad de la misma varía dependiendo de la ficotoxina siendo los más comunes los episodios de intoxicación gastrointestinales, neurotóxicos y hepatotóxicos [16].

Sin embargo, no todos los efectos de las ficotoxinas son dañinos o nocivos para la salud. La riqueza y variedad estructural de estas moléculas bioactivas ha permitido que se investigue el uso de algunas de ellas como posibles fármacos con utilidad terapéutica en diversas enfermedades neurológicas como el Alzheimer o distintos tipos de cáncer [17].

1.1.1. Clasificación de ficotoxinas marinas

Inicialmente, las ficotoxinas marinas se clasificaron en función de la sintomatología de la intoxicación que causaban:

- **ASP (Amnesic Shellfish Poisoning):** Intoxicación amnésica por consumo de marisco.
- **DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning):** Intoxicación diarreica por consumo de marisco.
- **NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning):** Intoxicación neurotóxica por consumo de marisco.

- **PSP (Paralytic Shellfish Poisoning):** Intoxicación paralizante por consumo de marisco.
- **AZP (Azaspiracid Shellfish Poisoning):** Intoxicación por azaspirácidos.
- **CFP (Ciguatera Fish Poisoning):** Intoxicación de ciguatera por consumo de pescado.
- **Intoxicación por Palitoxinas**

No obstante, esta clasificación presentaba problemas con la aparición de nuevas toxinas que no podían englobarse en ninguno de los grupos existentes, por ello en 2004 y con motivo de una reunión de expertos se estableció un acuerdo entre la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), WHO (World Health Organization) e IOC (Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO) para clasificar las toxinas marinas en base a criterios estructurales y de mecanismo de acción por adecuarse mejor a la aplicación de métodos analíticos [18]. Así pues, la clasificación actual de los principales grupos de toxinas marinas, sus principales análogos, mecanismos de acción conocidos y organismos productores se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Clasificación de ficotoxinas marinas

Grupo	Compuesto de referencia/análogos	Mecanismo de acción	Organismo productor
Ácido Domoico (DA) o toxinas amnésicas (ASP)	Ácido Domoico (DA)/Ácido isodomoico A-H, Ácido epidomoico	Activación de receptores kainato	<i>Pseudo-nitzschia</i> (Diatomea)
Azaspirácidos (AZAs)	Azaspirácido-1 (AZA-1)/Azaspirácidos 1-11	Desconocido	<i>Azadinium spinosum</i> , <i>Amphidoma languida</i>
Brevetoxinas (PbTx) o toxinas neurotóxicas (NSP)	Brevetoxinas A y B (PbTx1 y PbTx2)/Brevetoxinas 3-14, Brevetoxina.	Activación de canal de sodio dependiente de voltaje (sitio 5)	<i>Karenia</i> , <i>Chatonella</i>
Ciguatoxinas (CTXs)	Ciguatoxina-1 (CTX-1)/Ciguatoxinas P-C-I y variantes, Gambierol	Activación de canal de sodio dependiente de voltaje (sitio 5)	<i>Gambierdiscus toxicus</i>
Iminas cíclicas (CIs)	Gymnodimina A (GYM-A) y Espirólido/ Gymnodimina A-C, y (12-methyl gymnodiminina), Espirólido A-I (y desmetilespirólidos), Pinnatoxina A-G, Pteriatoxina A-C, Prorocentrólido, Spiroprorocentrimina, Portimina, Simbioimina	Bloqueo reversible de receptores colinérgicos muscarínicos y nicotínicos	<i>Gymnodinium</i> , <i>Karenia</i> , <i>Alexandrium ostenfeldii</i> , <i>Prorocentrum</i>
Maitotoxina (MTX)	Maitotoxina (MTX)/2 ⁹⁹ isómeros estructurales posibles	No esta claro. Activa entrada de calcio en células	<i>Gambierdiscus toxicus</i>
Palitoxinas (PLTXs)	Palitoxina (PLTX)/Hasta 10 ²¹ isómeros estructurales posibles, Ostreocinas, Ovatoxinas, Mascarenotoxinas	Bloqueo bomba sodio-potasio ATPasa	<i>Ostreopsis</i> , <i>Palythoa</i> (Coral)
Pectenotoxinas (PTXs)	Pectenotoxina-2 (PTX-2)/Pectenotoxina 1-14 y seco ácidos	Afecta a citoesqueleto de actina	<i>Dynophysis acuta</i> , <i>Dynophysis fortii</i>
Toxinas Diarreicas (DSP)	Ácido Okadaico (OA)/Dinophysistoxinas 1-6 (DTXs)	Inhibición proteína fosfatasa tipo 1 y 2A	<i>Dynophysis</i> , <i>Prorocentrum</i>
Toxinas Paralizantes (PSP)	Saxitoxina (STX)/Carbamatos (GTX 1-4, NeoSTX), N-Sulfocarbamoil (C1-4, GTX5-6), Decarbamoil (dcGTX1-4, dcSTX, dcNeo), Benzoatos (GC1- 6)	Bloqueo de canal de sodio dependiente de voltaje (sitio 1)	<i>Alexandrium</i> , <i>Gymnodinium</i> , <i>Pyrodinium</i> , <i>Cyanobacterias</i>
Yesotoxinas (YTXs)	Yesotoxina (YTX)/ Diversos análogos de: HidroxiYTX, CarboxyYTX, HomoYTX, KetoYTX, NoroxoYTX	Activación de fosfodiesterasas	<i>Protoceratium</i> , <i>Lyngulodinium</i> , <i>Gonyaulux</i>

INTRODUCCIÓN

Fijándonos en la tabla, Es relevante señalar que una misma especie puede producir distintas toxinas, como por ejemplo en el caso de *Gambierdiscus toxicus* las Ciguatoxinas y Maitotoxinas.

A continuación, se describirán más en profundidad los grupos de toxinas empleados durante las investigaciones llevadas a cabo a lo largo de la presente tesis doctoral.



1.1.2. Palitoxina

Cuenta la leyenda que en la isla de Maui, Hawái, existía un pequeño pueblo de pescadores cerca del puerto de Hana. Una noche, cuando todas las canoas habían regresado del mar con la pesca del día se percataron de que una vez más, uno de los pescadores había desaparecido sin dejar rastro, tal y como veía ocurriendo desde hace tiempo con otros compañeros. Desesperados y buscando respuestas, los pescadores culparon a un solitario jorobado que vivía en el acantilado cercano. Cuando llegaron junto al hombre y le arrancaron la capa que cubría su espalda, descubrieron que tenía una enorme boca llena de afilados dientes triangulares, habían atrapado a un Dios Tiburón, uno con insaciable apetito por la carne humana. Las sospechas de los pescadores eran correctas, cada día, cuando las canoas se iban de pesca, el Dios Tiburón se pasaba nadando por el pueblo para conseguir su desayuno. Los enfurecidos hombres, despedazaron al jorobado y quemaron completamente sus restos, arrojándolos posteriormente a una poza de marea cercana. Sin embargo, la maldad del demonio fue convirtiendo el estanque en una “piscina de la muerte”. Poco a poco, pequeñas y extrañas anemonas de color marrón fueron cubriendo sus paredes. Más tarde, los hombres del poblado descubrieron que si se untaban las puntas de sus lanzas y dagas con esas criaturas se perpetuaba la maldad del Dios Tiburón causando una muerte segura a la víctima contra la que empleasen dichas armas. Estas criaturas que crecían en la poza de marea fueron llamadas “Limu Make o Hana”, lo que más o menos se traduce como algas marinas de la muerte [19].

INTRODUCCIÓN

En 1961, investigadores de la Universidad de Hawái interesados en esta sustancia en la que los nativos impregnaban sus lanzas se decidieron a indagar en el asunto. Pocos habitantes de Maui conocían el lugar exacto dónde estaba situada la “piscina de la muerte” y los que lo sabían no querían hablar, por suerte, uno de los aldeanos accedió a conducir a los científicos hasta allí. Cuando se preparaban para tomar muestras de los especímenes que poblaban la poza, varios nativos locales les interrumpieron para advertirles que el lugar estaba “kapu” (prohibido en Hawaiano) y que si irrumpían allí alterando algo, la maldición se reactivaría. Los científicos sonriendo les contestaron que no creían en supersticiones. Curiosamente, el mismo día, un incendio destruyó uno de los laboratorios principales del Instituto Hawaiano de Biología Marina en la Isla Coconut en Kaneohe Bay, Oahu. Las muestras recogidas resultaron ser de una nueva especie de coral, *Palythoa toxica* [20], que contenía esta sustancia mortal a la que más tarde se denominó palitoxina (PLTX).

La PLTX es una de las sustancias naturales no proteicas más potentes que existen y junto a sus compuestos análogos, forman parte de uno de los grupos de toxinas marinas más tóxicas conocidas hasta la fecha [21]. Aunque originalmente se encontraron solamente en aguas del Pacífico, concretamente en ciertas partes de las costas de Hawái y Japón [22,23], hoy en día se consideran toxinas emergentes ya que su distribución es mundial con presencia en distintos lugares del planeta incluyendo zonas tan cercanas a nosotros como en el Mar Mediterráneo las costas de Francia, Italia, Grecia e incluso España, de ahí nuestro interés en el estudio de esta toxina [24-28]. La presencia de estas toxinas en las costas afecta al ecosistema. Se ha

demostrado que producen alteraciones fisiológicas en diversas especies marinas como el mejillón [29-32]. Además, estas sustancias tienden a bioacumularse en animales marinos de consumo humano habitual tales como peces y crustáceos. Esto puede representar un grave problema de salud pública, sobre todo cuando ya se han registrado casos de intoxicaciones letales en personas tras ingerir especies contaminadas con PLTX [32-36].

1.1.2.1 Organismo productor

Actualmente, existe una cierta controversia respecto al verdadero organismo productor de la PLTX. A pesar de que inicialmente se aisló de corales pertenecientes a la especie *Palythoa toxica* (**Figura 6**) [37] y se ha encontrado también en muchas más especies del género *Palythoa* como por ejemplo *P. tuberculosa*, *P. vestitus*, *P. mammilosa*, *P. carriabaeroum* etc [35,38-44], existen indicios en diversas investigaciones de que los verdaderos productores podrían ser bacterias viviendo en simbiosis con los corales. Por ejemplo, cepas de *Vibrio* sp. aisladas de *P. toxica* que tienen como metabolitos secundarios una fracción similar a la PLTX en espectro UV [45] o cepas de *Pseudomonas* sp. también asociadas con varias especies del género *Palythoa* o incluso dinoflagelados de la especie *Ostreopsis lenticularis* en el Caribe [46]. Además, recientemente se ha demostrado que cianobacterias del género *Trichodesmium* son capaces de producir PLTX y uno de sus análogos, 42-hidroxi-PLTX [47]. Todo esto también podría ser un indicio a favor de la hipótesis de que los corales pudiesen bioacumular la toxina en sus propios tejidos al estar en contacto con especies que la producen, como ocurre con crustáceos y peces [48,49].

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, también se sabe que los dinoflagelados del género *Ostreopsis* (**Figura 2**) producen PLTX y análogos de la misma [50]. Por ejemplo *Ostreopsis siamensis* sintetiza ostreocinas, y en especial, ostreocina-D, un análogo de la PLTX [34,51,52]. Lo mismo ocurre con otras especies del mismo género como *O. mascarenensis* en el Océano Índico [53] y *O. ovata* en el Mar Mediterráneo [36,54,55] que también son origen de análogos de PLTX como mascarenotoxinas y ovatoxinas.

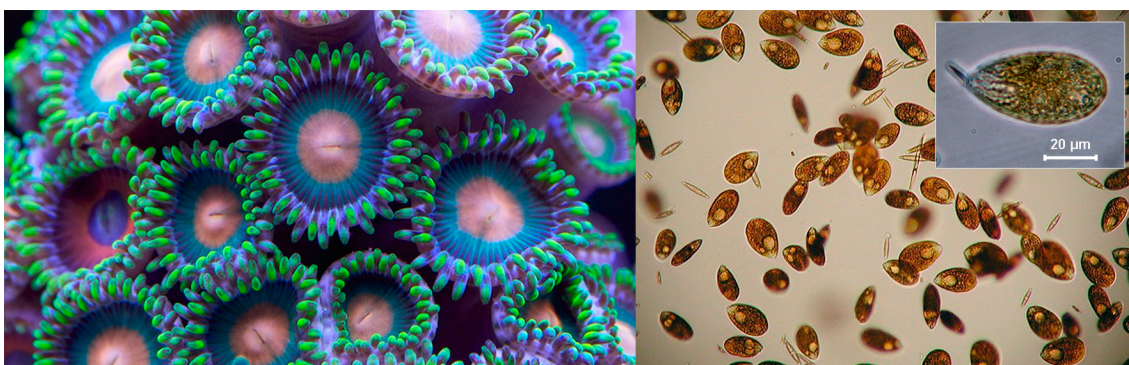


Figura 2: Colonia de corales blandos de la especie *Palythoa toxica* (izquierda) y dinoflagelados del género *Ostreopsis* (derecha) con detalle de su tamaño. Imágenes adaptadas de: <http://www.animalsglobe.ru/korallyi/>
<http://nitroalboran.blogspot.com.es/2010/08/ostreopsis-sp-en-la-zona-del-faro-de.html>
<http://fotoalbum.virgilio.it/alice/gfelih/funghialghe/ostr002.html>

1.1.2.2 Estructura y propiedades químicas

La PLTX se considera una de las moléculas naturales no proteicas más grandes y complejas que existen. Prácticamente todos los análogos que se conocen (ostreocinas, ovatoxinas, mascarenotoxinas, homo-PLTX, bishomo-PLTX, neo-PLTX, deoxi-PLTX, 42-hidroxi-PLTX etc) superan los 2500 Da de peso molecular. La estructura de la PLTX (**Figura 3**) extraída de corales del género *Palythoa* se dilucidó por primera vez en 1981 [41], sin embargo, se encontraron pequeñas diferencias entre la PLTX contenida en los corales del género *Palythoa* de Tahiti ($C_{129}H_{221}N_3O_{54}$, 2659 Da) y en los *P. toxica* ($C_{129}H_{223}N_3O_{54}$, 2677 Da) empleados en el estudio. Así mismo en *P.*

tuberculosa, se encontró una mezcla de las dos PLTXs anteriores. Se considera que la estructura básica consiste en una cadena hidrocarbonada alifática parcialmente insaturada con 8 dobles enlaces, éteres cíclicos, 64 centros quirales, de 40 a 42 moléculas hidroxilo y 2 grupos amida [26,56].

La PLTX pura se describe como un compuesto sólido, no cristalino (amorfo), hidroscópico, básico y de color blanco, soluble en metanol, etanol, piridina, dimetilsulfóxido (DMSO) y agua pero no soluble en sustancias no-polares tales como cloroformo, éter o acetona. Así mismo, aunque no se ha establecido su punto de fusión exacto y pese a que se considera una sustancia altamente

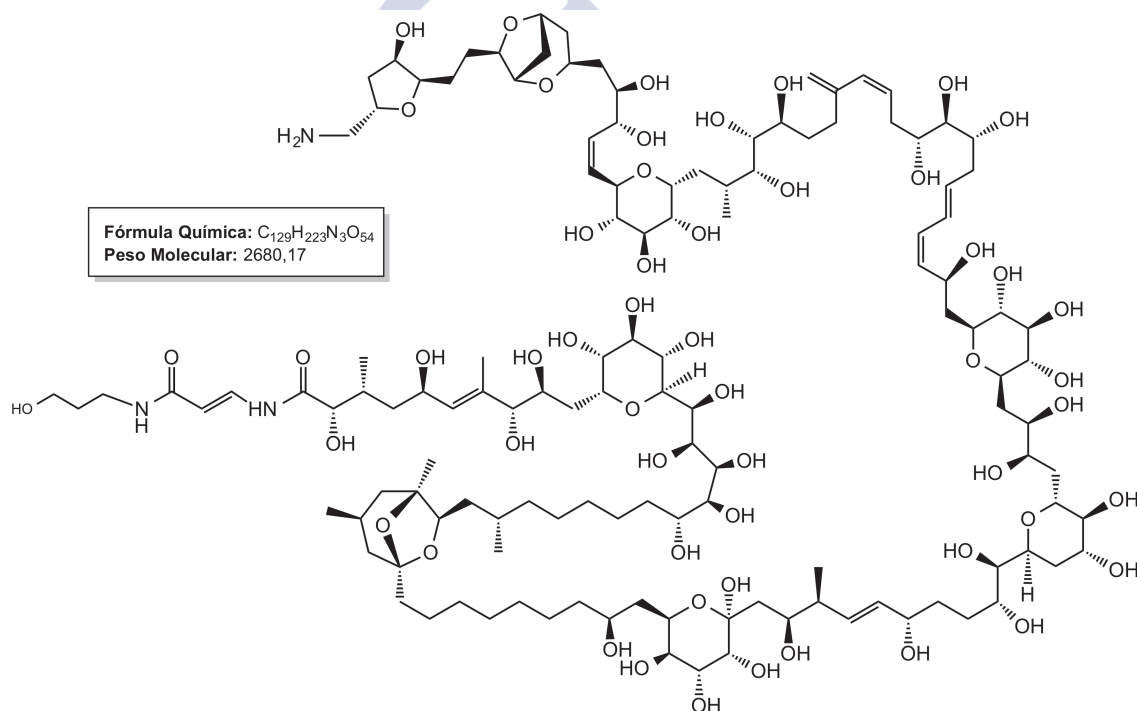


Figura 3: Estructura química de la PLTX

resistente al calor, se carboniza a unos 300 ° C. Es un compuesto ópticamente activo y en disolución acuosa puede formar espuma si se agita debido a su carácter anfipático ya que posee partes hidrofílicas e hidrofóbicas que pueden llegar a formar estructuras micelares.

INTRODUCCIÓN

1.1.2.3 Mecanismo de acción

La principal diana de la PLTX es la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Sodio-Potasio ATPasa) (**Figura 4**) [57]. Esta bomba es una proteína integral transmembrana que ha sido identificada en todas las células animales y por tanto está altamente conservada. Su función principal es el intercambio activo de iones sodio y potasio entre el medio extracelular y el citoplasma para mantener la

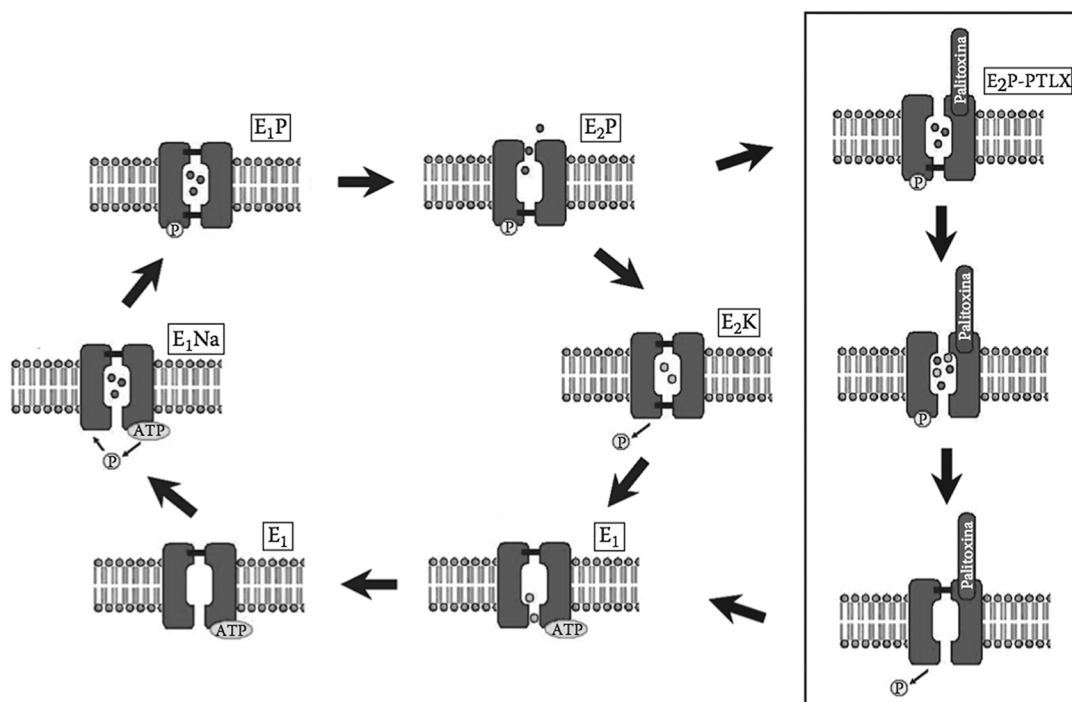


Figura 4: Esquema de funcionamiento y efecto de la palitoxina en la bomba Na^+/K^+ ATPasa. La bomba alterna cíclicamente entre dos estados conformacionales, E_1 y E_2 . En el estado $E_2\text{P}$, la bomba está fosforilada permitiendo la unión de palitoxina que genera un cambio conformacional en las hélices α provocando una apertura de la puerta del compartimento intracelular. Posteriormente la toxina afecta a la desfosforilación de la bomba provocando una apertura prolongada y la convierte en un canal iónico no específico. Al final, la bomba consigue ser desfosforilada y vuelve a su estado fisiológico normal.

Adaptado de: Palytoxin and analogues: Biological effects and detection. In Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology, and detection, 3rd ed.; Botana, L.M., Ed. CRC Press: Boca Raton, FL 33487-2742, 2014; pp 741-772.

homeostasis de las células regulando el gradiente de solutos, la osmolaridad y la polaridad eléctrica de la membrana celular. En cada ciclo expulsa 3 iones Na^+ e ingresa 2 iones K^+ con gasto de energía en forma de hidrólisis de ATP. Cuando la PLTX se une al heterodímero que forman las unidades $\alpha\text{-}\beta$ de esta

bomba (concretamente se une al extremo N-terminal de la subunidad α) la transforma en un canal iónico no selectivo [58-60] permitiendo la entrada y salida descontrolada de iones con la consecuente despolarización de la membrana (tanto de células excitables como no excitables) y pérdida de la homeostasis celular provocando una lisis de las células afectadas [61]. Este efecto puede ser inhibido por la ouabaina, fármaco que compite con la PLTX por el lugar de unión y evita que esta actúe sobre la bomba Na^+/K^+ ATPasa [58].

Es conveniente señalar que muchos organismos son capaces de bioacumular la PLTX sin que esta ejerza un efecto nocivo en los mismos a pesar de la presencia de bombas Na^+/K^+ ATPasa en sus membranas celulares. La manera en que estos organismos se protegen del efecto de la PLTX se desconoce [48] pero podría estar relacionado con una transformación metabólica de la toxina, ya que se ha postulado que la PLTX necesita mantener su forma intacta para actuar sobre la bomba Na^+/K^+ ATPasa y preservar su capacidad tóxica [62].

La unión de la PLTX a la bomba Na^+/K^+ ATPasa genera una secuencia de eventos en las células. Primero modifica la permeabilidad de membrana que desencadena la despolarización de la misma debido a la entrada descontrolada de iones, como se ha comentado anteriormente, incluyendo el Ca^{2+} . El resultado son unos cambios morfológicos en las células, desensamblaje de la F-actina y daño en el citoesqueleto [63,64]. Además, se ha demostrado que esta toxina es un potente promotor tumoral debido a su implicación en un amplio rango de mecanismos relacionados con la carcinogénesis [65] como son la estimulación del metabolismo del ácido araquidónico, la producción de prostaglandinas, la regulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico

y de las cascadas de protein quinasas MAP (Del inglés Mitogen-Activated Protein kinases) [66].

1.1.2.4 Sintomatología, vías de intoxicación y toxicidad

Los síntomas que produce la intoxicación por PLTX en humanos son variados y no están bien definidos pero en general incluyen mialgia, debilidad, problemas respiratorios, náuseas, vómitos, diarrea, anomalías en la función cardíaca, disminución de las funciones neuromusculares incluyendo convulsiones e incluso delirios en los casos más graves [21]. No obstante, muchos de estos síntomas son específicos de la vía de exposición a la toxina.

En general, las vías de intoxicación por PLTX más comunes son la oral por ingestión, la vía respiratoria por inhalación, la vía dérmica por contacto y la ocular [67].

Los casos de intoxicación oral se deben básicamente al consumo de peces y crustáceos contaminados. En estas situaciones, los síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos y diarrea principalmente) aparecen ya en las primeras horas tras la ingestión y en la mayoría de casos clínicos reportados, las personas afectadas notan un sabor metálico mientras consumen la especie contaminada. En los casos de intoxicación letal, son frecuentes los mareos, calambres musculares y cosquilleos en las extremidades, agitación, dificultad para respirar, bradicardias y delirios, la muerte ocurre en un período de tiempo que comprende desde unas pocas horas a días [23,33,34]. Cuando la intoxicación no es letal, la recuperación completa de las personas afectadas se produce entre 2 y 4 semanas [67].

Las intoxicaciones por vía respiratoria corresponden en su mayoría a la inhalación de los aerosoles que forman las olas en la playa cuando aparecen proliferaciones masivas de dinoflagelados del género *Ostreopsis*. En estos casos, los síntomas más típicos son rinorrea con abundante aumento de secreción de mucosidad, tos, dolor de garganta, irritación de mucosas, disnea y conjuntivitis. En los casos más graves se pueden producir náuseas y vómitos, cefalea e incluso fiebre alta [68-70]. En casos no documentados oficialmente todavía, se habla de personas intoxicadas por respirar vapores resultantes del hervido de rocas (para la limpieza de acuarios) que contenían corales productores de PLTX adheridos a las mismas [71].

Los episodios de intoxicaciones por vía dérmica suelen ser ocasionados principalmente por: corales productores de PLTX o agua de mar que contiene dinoflagelados del género *Ostreopsis* también capaces de generar toxinas análogas. El primer grupo corresponde a personas aficionadas a los acuarios o peceras que bien por desconocimiento o por accidente, han estado en contacto directo con corales del género *Palythoa* mientras los limpiaban o manipulaban tanto con la piel intacta como con alguna herida. En la zona local de contacto con el coral se suelen producir edemas y eritemas, pero también puede haber síntomas a nivel sistémico como por ejemplo parestesias alrededor de la boca y alteración del sentido del gusto (incluida la sensación de sabor metálico). En los casos más graves aparecen también alteraciones transitorias de la función cardíaca [35,72,73]. Hasta el momento, no se han producido casos letales por esta vía y la recuperación completa de las personas intoxicadas varía entre unos pocos días y unas semanas [21]. Las intoxicaciones por contacto con agua de mar con *Ostreopsis* son menos

INTRODUCCIÓN

severas pero más numerosas. El síntoma más típico es dermatitis en la zona de contacto y suelen darse junto con los episodios de intoxicación por inhalación de aerosoles en zonas costeras [21,69,70] .

Las intoxicaciones por vía ocular, son menos frecuentes y la mayoría de casos descritos ocurren también simultáneamente con las intoxicaciones por vía inhalatoria. Los principales síntomas son irritación y conjuntivitis pero se han dado casos de lesiones severas en el ojo con edema corneal persistente durante varias semanas [45,74,75].

Se considera que el grado de toxicidad de la PLTX, depende mucho de la vía de exposición por la que llegue al organismo [76,77]. Actualmente, los datos toxicológicos que existen sobre esta sustancia son escasos y se limitan básicamente a estudios de toxicidad aguda en ciertas especies de animales entre los que se incluyen cobayas, conejos, perros, gatos, monos y los más empleados; ratas y sobre todo ratones. Por norma general, la administración oral de PLTX es mucho menos tóxica que la administración intraperitoneal (i.p.) o intravenosa (i.v.) [78-81]. Los valores DL_{50} (Dosis letal 50, es decir, aquella dosis de la sustancia que mata a la mitad de un conjunto de animales a los que se le administra) por vía oral para ratas y ratones varía entre 40 y 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dependiendo de la especie, condiciones y del tipo de PLTX usada (pura o en matriz, análogos etc.) [82,83]. Por su parte, los valores de DL_{50} para la administración i.p. (0.025-0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en ratas y ratones) e i.v. (0.05-1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, incluyendo perros, gatos, monos, cobayas, ratas y ratones) son mucho más bajas, indicando una mayor toxicidad [80,81]. Sin embargo, en humanos no hay suficientes datos epidemiológicos para establecer un valor o rango de valores fiables de DL_{50} para toxicidad aguda. Lo mismo ocurre con la toxicidad crónica

de la cual no existen estudios a largo plazo [27,84]. Debido a esto, no existe una regulación que marque los límites permitidos de esta sustancia en ningún país del mundo. Sin embargo basándose en la toxicidad aguda de la PLTX, la EFSA (European Food and Safety Authority, Autoridad Europea de seguridad alimentaria) a través de su panel CONTAM (Contaminants in the Food Chain. Contaminantes en la cadena alimenticia) propone y recomienda no superar una dosis aguda de referencia (ARfD) por vía oral de 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal para la mezcla de PLTX y uno de sus análogos, la ostreocina-D. Esta cifra se estableció tras aplicar un factor de incertidumbre extra de 10 a los ya habituales factores de incertidumbre intra- e interespecíficos (también de 10 cada uno) tomando como referencia un LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level. Nivel más bajo que causa efecto observable) de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal basada en los estudios de toxicidad oral en ratones [84]. De esta forma, en la ración de marisco ingerida (ejemplo 400 g) la suma de PLTX y ostreocina-D no debe ser mayor de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vianda para evitar que un adulto de 60 Kg supere el valor de la ARfD (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal).

Se requieren más estudios toxicológicos que nos permitan establecer mejor un valor de toxicidad tanto aguda como crónica en el hombre. La finalidad es definir el riesgo sanitario que supone la aparición de esta toxina y valorar la creación de un marco legal para su regulación.

1.1.2.5 Métodos de detección

Existen distintos tipos de métodos para la detección de la PLTX cada uno con sus ventajas e inconvenientes.

INTRODUCCIÓN

Uno de los más usados en el campo de las biotoxinas es el **bioensayo en ratón**. En él la toxina o extractos de peces/moluscos supuestamente contaminados se inyectan por vía i.p. [23,85] y se observa si el ratón manifiesta síntomas típicos de la intoxicación, en este caso por PLTX. Estos síntomas son: Movimientos bruscos y estiramiento de las patas posteriores y la parte baja de la espalda, debilitamiento de las patas anteriores, locomoción disminuida con episodios de reptación, parálisis, ataxia, cianosis y dificultades para respirar. La utilidad del uso rutinario del bioensayo en ratón radica en que los síntomas en los 15 minutos iniciales permiten identificar la presencia de PLTX en la muestra pero la observación se puede extender hasta 48 h [34,86,87]. Este método serviría para una estimación semicuantitativa de la presencia de PLTX. Actualmente, por la imposibilidad de automatización, la necesidad de emplear animales e instalaciones adecuadas y las múltiples implicaciones éticas, este método está en desuso en muchos países.

Existen también métodos de detección basados en el efecto citotóxico de la PLTX. El **ensayo de hemólisis con eritrocitos** se basa en la capacidad de la toxina de interactuar con la bomba Na^+/K^+ ATPasa convirtiéndola en un canal no específico. Esto conlleva una alteración en el balance iónico de los eritrocitos que termina en una hemólisis. Cuando la hemólisis está producida por PLTX o análogos, puede ser inhibida por ouabaína confirmando la presencia de estas toxinas en la muestra. [52,53,88]. Las células MCF-7 de cáncer de pecho también se utilizan para la detección de PLTX midiendo la magnitud de la lisis celular mediante la cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante del cultivo celular [89]. Así mismo, se han desarrollado métodos de detección de PLTX empleando diversas líneas

celulares de neuroblastoma como las Neuro-2a [90,91] y las Be(2)-M17 [92], estas últimas han sido empleadas durante la presente tesis doctoral. La concentración de la toxina está indirectamente relacionada con la viabilidad celular medida como la actividad oxido-reductasa de las mitocondrias mediante el empleo de compuestos tales como el MTT o el AlamarBlue. En este caso el uso de microplacas permite el análisis de varias muestras simultáneamente utilizando un método simple y con elevada sensibilidad.

Los anticuerpos monoclonales y policlonales anti-PLTX se han empleado para el desarrollo de diferentes **inmunoensayos** para la detección de la toxina. Estos incluyen tanto radio-inmunoensayos [93] como ELISAs [94]. Así mismo, se están desarrollando prometedores métodos mediante el uso combinado de citometría de flujo, microesferas, procesamiento digital de la señal y química tradicional que permiten no solo detectar la PLTX y sus análogos sino incluso cuantificar diferentes toxinas simultáneamente en una misma muestra [95]. En esta técnica se emplea la metodología fluorescente y está basada en la unión de las toxinas a su anticuerpo específico.

Los **métodos físico-químicos** para detectar la PLTX más utilizados son los basados en cromatografía líquida (LC). La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección por fluorescencia (FLD) [55] se desarrolló para la detección y cuantificación de PLTX y moléculas tipo PLTX. Es válido para muestras procedentes de dinoflagelados o marisco. La combinación de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) permite la identificación, detección y la cuantificación de las toxinas [53,55,56,96-98]. En general, son métodos rápidos, que pueden cuantificar toxinas individualmente y pueden ser automatizados, pero requieren un

equipamiento costoso y personal altamente cualificado. Sin embargo, con la mejora en estas técnicas y los avances que se van logrando se puede conseguir una buena separación de toxinas e identificación de nuevos análogos.

1.1.3 Ácido Okadaico y Dinofisistoxinas

En Junio de 1976, se produjeron una serie de intoxicaciones por consumo de mejillones (*Mytilus edulis*) a lo largo de toda la costa de Sanriku, Japón, ocasionando fuertes vómitos y diarrea a un total de 42 personas. Un año más tarde, en 1977, y también en la misma época del año, el suceso se repitió, pero esta vez cubriendo un área todavía más extensa de la costa Japonesa y afectando a un mayor número de personas (122). Además de los mejillones, se identificaron dos especies de vieiras (*Patinopecten yessoensis* y *Chlamys nipponensis akazara*) como organismos responsables de las intoxicaciones. Los estudios de laboratorio que se efectuaron tanto en los restos de mejillones y vieiras como en las deposiciones de las personas intoxicadas, desvelaron que no había presencia de microorganismos patógenos ni tampoco rastro de ninguna ficotoxina conocida hasta la fecha. Los estudios de toxicidad en ratones administrando por vía i.p. extractos de distintas partes del cuerpo de mejillones y vieiras, indicaron que aquellos procedentes del hepatopáncreas presentaban la mayor toxicidad, seguidos de los extractos de branquias, manto y gónadas. Esto hizo sospechar de la presencia de un nuevo tipo de toxina liposoluble que se acumulaba en organismos filtradores [85]. Unos años más tarde, se confirmó que la nueva toxina causante de estos episodios de intoxicación diarreicos o DSP (del inglés, Diarrhetic Shellfish Poisoning) había

sido el ácido okadaico (OA) [99]. Tiempo después se identificaron diversos análogos estructurales del OA que también fueron englobados dentro del grupo de las toxinas que producen DSP, estas sustancias recibieron el nombre de dinofisistoxinas (DTXs) debido al género de dinoflagelados en los que se encontraron [100,101]. Desde entonces, se han confirmado numerosos casos de intoxicaciones por OA y DTXs en distintas zonas del planeta destacando entre otras Nueva Zelanda, Holanda, Chile, Suecia, Noruega, Francia, Reino Unido, Portugal y España [102]. En las costas españolas y particularmente en Galicia la presencia de toxinas DSP ha ido en aumento no sólo en su frecuencia sino también en intensidad y distribución geográfica. 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 la generalización de programas de control que garanticen la salubridad de los productos del mar para el consumo humano pero también tiene repercusiones económicas y sociales debido a las importantes pérdidas en los sectores de marisqueo y de la acuicultura. En este contexto la inmersión en el conocimiento de la toxicidad de los compuestos DSP supone un reto con aplicaciones inmediatas.

1.1.3.1 Organismo productor

El OA se aisló por primera vez en 1980 a partir de esponjas marinas negras del género *Halichondria*. Concretamente se obtuvo de dos especies de manera independiente, *Halichondria okadai* (**Figura 5**) que habitualmente se encuentra en la costa del Pacífico de Japón y de *Halichondria melanodocia*, esponja típica del Caribe recolectada en los cayos de Florida [103,104].

INTRODUCCIÓN

Sin embargo, los verdaderos productores de OA y sus derivados (DTXs) son distintas especies de dinoflagelados planctónicos del género *Dinophysis*, principalmente *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. fortii* pero también otros como *D. caudata*, *D. miles*, *D. norvegica*, *D. ovum* y *D. sacculus*. [105]. También, especies de dinoflagelados bentónicos del género *Prorocentrum* son capaces de producir estas toxinas, destacando especialmente *P. lima* (**Figura 5**), *P. concavum*, *P. belizeanum* y *P. maculosum*.



Figura 5: Esponjas marinas de la especie *Halichondria okadai* (izquierda) y varios dinoflagelados de la especie *Prorocentrum lima* (derecha). Fotografía de *H. okadai* por Yasunori Saito, University of Tsukuba, Shimoda Marine Research Center.

Existen variaciones en la cantidad y frecuencia con la que estas especies producen toxinas. Dichas variaciones podrían responder tanto a factores ecológicos y climáticos (época del año, nutrientes, cantidad de células en el agua, tasa de crecimiento y división de las mismas etc.) como genéticos, ya que solo ciertas cepas de las mencionadas especies de dinoflagelados son capaces de sintetizar estos compuestos. Algunas cepas pueden producir simultáneamente OA y DTXs e incluso también Pectenotoxinas (PTXs). Estas últimas eran consideradas toxinas diarreicas hasta hace poco pero

recientemente se han clasificado como un grupo independiente del OA y sus análogos, como ya se ha indicado previamente [101,102].

Tal y como ocurre con otras toxinas marinas, OA y DTXs se bioacumulan en bivalvos filtradores (sobre todo en el hepatopáncreas) que se alimentan de estas especies de fitoplancton [106-108]. La ingestión de estos mariscos contaminados causa la intoxicación diarreaica o DSP. La toxicidad de estos mejillones no se ve afectada *a priori* por procesos de congelación y/o cocinado. A su vez, las toxinas tampoco cambian las características organolépticas de los organismos contaminados, por eso el consumidor final no puede percatarse de que podría estar ingiriendo alimentos tóxicos. [109,110]

1.1.3.2 Estructura y propiedades químicas

La estructura inicial del OA (**Figura 6**) fue dilucidada mediante cristalografía de rayos X en 1980 a partir de los extractos de dos especies de esponjas del género *Halichondria*. [103]. Tanto el OA como sus análogos, las dinofisis toxinas (DTXs), son poliéteres termoestables de naturaleza lipofílica. Dentro de estas, se encuentran la DTX-1 [111] que posee un grupo metilo adicional respecto al OA, la DTX-2 [112,113] con uno de los grupos metilo en distinta posición, el grupo de la DTX-3 [100,114,115] que incluye una gran cantidad de formas de OA, DTX-1 y DTX-2 esterificadas con ácidos grasos saturados e insaturados en posición C-7 hidroxilo, los precursores diol-éster DTX-4 y DTX-5a,b,c [116-118] solubles en agua y distintos derivados diol-éster entre los que se encuentra la DTX-6 [119].

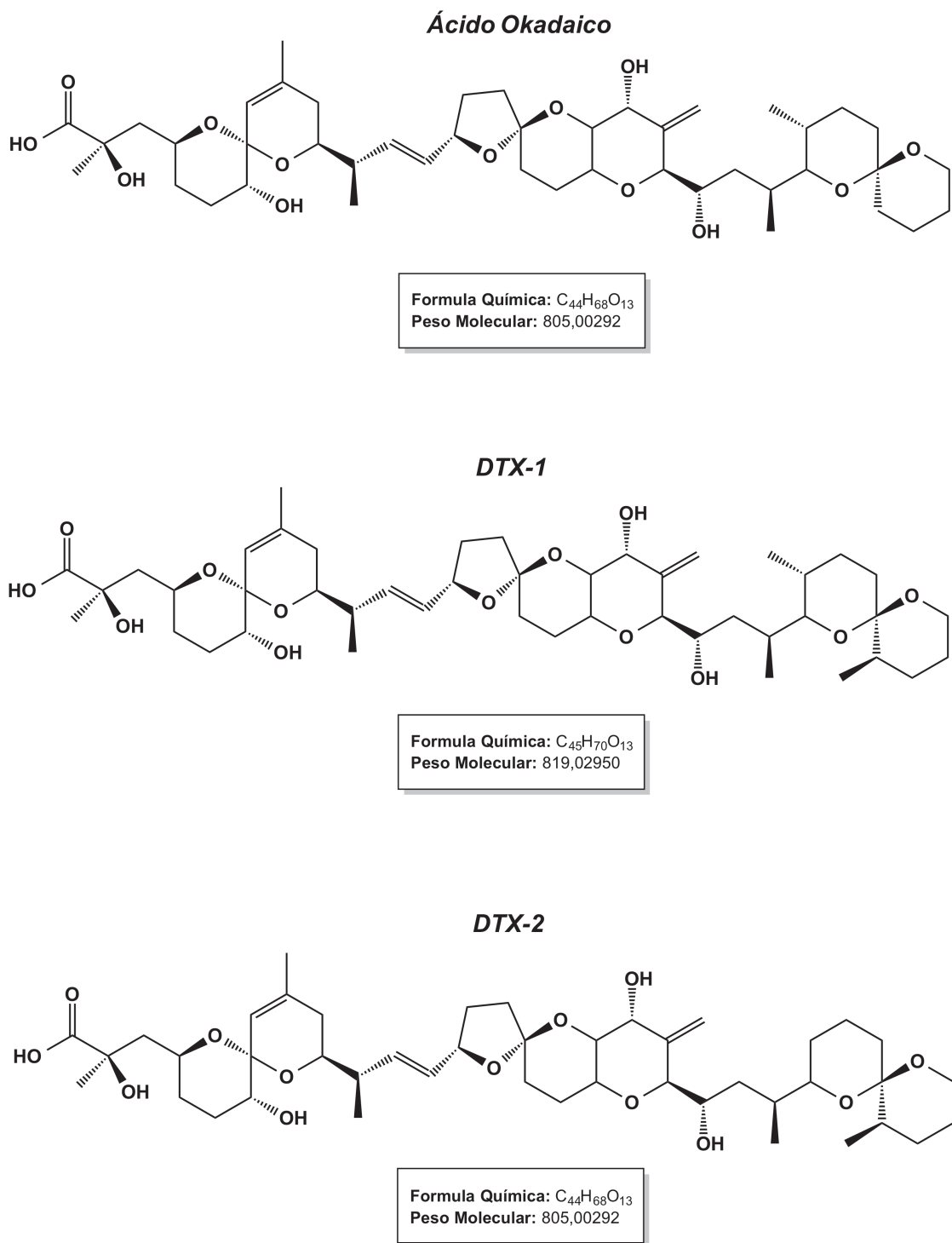


Figura 6: Estructura química del Ácido Okadaico y sus derivados DTX-1 y DTX-2

Es relevante comentar, que las DTX-3 solo se han encontrado en la glándula digestiva y hepatopáncreas de bivalvos y moluscos que acumulan OA, DTX-1 y

DTX-2 por lo que se consideran productos del metabolismo de dichos organismos y no toxinas producidas *de novo* por dinoflagelados. Además, se ha demostrado que estas DTX-3 poseen una liposolubilidad mayor respecto a los compuestos no esterificados de los que proceden [120,121]. Se han descrito también derivados con cambios en la cadena hidrocarbonada principal del OA como la norokadanona [122] encontrada en *Prorocentrum lima*, el 19-epi-ácido okadaico de *Prorocentrum belizeanum* [123,124], el ácido belizeanico [125] también de la misma especie de dinoflagelados. Quizás el más conocido de todos sea el metil okadaato, producido naturalmente por algunas cepas de *Prorocentrum lima* que posee una sustitución del grupo carboxilo en posición C-1 por un grupo metil-éster [122].

1.1.3.3 Mecanismo de acción

El OA y sus análogos se consideran potentes inhibidores de las proteína fosfatasa de serina y treonina (PP), principalmente de las tipo 1 (PP1) y 2A (PP2A) [126-128] aunque se ha demostrado que también ejercen efecto, en menor medida, sobre otras como las tipo 2B, 4 y 5 (PP2B, PP4 y PP5) [129]. Estas proteína fosfatasa son un grupo de enzimas que llevan a cabo la desfosforilación de numerosas proteínas, una función esencial para la mayoría de procesos metabólicos en células eucariotas incluyendo el transporte y secreción en la membrana, contractilidad, división celular, replicación de ADN, diferenciación celular y oncogénesis entre otras [130-133].

Las toxinas DSP tienen un mecanismo de acción común pero no son equipotentes [134]. Basándose en diversos estudios que determinan la potencia inhibitoria de las toxinas sobre las PP se establecieron los factores de equivalencia inhibitoria o IEFs (del inglés, Inhibitory Equivalency Factors). Estos

INTRODUCCIÓN

IEFs se calcularon tomando como compuesto de referencia al OA y su valor IC_{50} (concentración inhibitoria 50) para cada una de las PP estudiadas. Así pues, el IEF de la DTX-1 para la PP1 está entorno a 0.4-0.9 veces respecto al OA mientras que para la PP2A varía entre 0.9 y 2.4 veces indicando que la DTX-1 ejerce mayor inhibición sobre esta fosfatasa en concreto que el OA [135-138]. Respecto a la DTX-2, el IEF para la PP2A se sitúa entre 0.4 y 0.6 lo que significa que su actividad inhibitoria es prácticamente la mitad que la del OA [138,139] mientras que el resto de toxinas DSP presentan valores de inhibición mucho más bajos sobre ambas fosfatasas [116,117,135,140,141].

Es precisamente esta inhibición de fosfatasas la que llevó a postular que probablemente la diarrea que producen estas toxinas sea debida a la fosforilación de proteínas que controlan la secreción de sodio en las células intestinales [142], pero no existen todavía pruebas concluyentes que lo demuestren. En muchas publicaciones posteriores, esta hipótesis se ha tomado como cierta e incluso se ha extendido a que la inhibición de fosfatasas también es responsable de los efectos tóxicos agudos, promoción de tumores y hasta de la neurotoxicidad del OA y las DTXs, aún no existiendo pruebas experimentales definitivas que lo evidencien [134,143]. En la actualidad, existen numerosos estudios que sugieren que ciertos efectos del OA y las DTXs no podrían ser explicados simplemente por la inhibición de fosfatasas de serina y treonina y que existirían además otros mecanismos de acción todavía no esclarecidos [134,144-146].

A nivel celular se ha descrito que tanto OA como DTXs inducen apoptosis e inhibición del crecimiento en algunos modelos celulares intestinales, neuronales, hepáticos, pulmonares y sanguíneos. [147]. Los mecanismos

implicados en este proceso incluyen alteraciones en la expresión de determinados genes, desequilibrios en el potencial de membrana de mitocondrias, activación de múltiples isoformas de caspasas, liberación al citosol del citocromo *c* desde la membrana interna de mitocondrias, inhibición de la síntesis de proteínas y quizás lo más importante, alteraciones en el citoesqueleto [148 ,149-154].

Aunque no está clasificada como neurotoxina, diversos estudios han probado los efectos neurotóxicos del OA generalmente relacionados con apoptosis neuronal, alteraciones morfológicas debido a modificaciones en genes relacionados con citoesqueleto y neurotransmisión e incluso hiperfosforilación de la proteína *tau* (implicada en Alzheimer), tanto en cultivos *in vitro* como en modelos animales *in vivo* [155-158]. Esto último, hace que el OA y sus análogos sean herramientas útiles para el estudio del Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas ya que se ha demostrado que la exposición crónica de ciertos animales (ratas principalmente) a estas toxinas puede inducir síntomas similares a los de las enfermedades mencionadas [159,160].

Existen estudios *in vitro* que demuestran que el OA podría tener carácter inmunotóxico, concretamente, se ha probado que altera la producción de interleucinas 1 y 8 (IL-1 , IL-8) en monocitos periféricos y otros tipos celulares, produce la reducción de la expresión del receptor de linfocitos T (TCR) y la consiguiente desregulación de dichos linfocitos y de la respuesta inmune [161-163]. Los estudios *in vivo*, sin embargo son más escasos y apenas incluyen un par de publicaciones con ratones y ratas dónde se describen efectos inmunotóxicos, angiogénesis, expresión elevada de la citoquina proinflamatoria factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) y de la interleucina 1 beta (IL-1 β)

[160,164]. Se requiere más investigación para arrojar más luz sobre los efectos del OA y sus análogos en el sistema inmune humano.

Una gran variedad de experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* (con peces y ranas principalmente) han demostrado que el OA produce daños irreversibles en el desarrollo embrionario [165-174]. No obstante, no se han podido extrapolar estos datos al desarrollo del embrión humano.

El OA se considera un potente agente genotóxico tanto en líneas celulares humanas como de animales. Los efectos descritos incluyen daños en el ADN como la formación de micronúcleos, estrés oxidativo, intercambio de cromátidas hermanas, mutaciones en mini satélites, aductos de 8-hidroxi-deoxiguanina y rotura de cadenas de ADN [131,147,175-181]. Sin embargo, existen algunas contradicciones en estos estudios que hacen sospechar que los efectos genotóxicos del OA dependen más bien del tipo de línea celular y de las condiciones experimentales [182,183].

Aunque el OA y sus análogos no han sido clasificadas todavía como sustancias cancerígenas, existen publicaciones que demuestran que estas toxinas podrían ser potentes agentes promotores tumorales en piel de ratón y en la mucosa del estómago de rata después de una exposición dérmica y oral respectivamente. Así mismo, hay evidencias de una alteración de procesos celulares que regulan el paso de G_0 a G_1 en el ciclo celular e incluso indicios de tumores en el hígado de animales tratados con OA [184-187].

También, en otros estudios realizados mediante cuestionarios, esto es, sin datos experimentales, a distintos grupos de población humana, se han asociado distintos tipos de cáncer (específicamente de esófago, estómago,

páncreas e hígado), a una prolongada exposición al OA [188-190]. No obstante, se requieren más estudios epidemiológicos y experimentales para determinar que efectivamente el consumo de productos con OA y sus análogos pueden aumentar la incidencia de cáncer.

1.1.3.4 Sintomatología, vías de intoxicación y toxicidad

Los principales síntomas de la intoxicación por OA y análogos al margen de la característica diarrea incluyen náuseas, vómitos, dolor abdominal y en algunos casos fiebre, estremecimientos y dolor de cabeza [85]. Normalmente, estos síntomas aparecen muy pronto, entre 30 minutos y unas pocas horas después de ingerir comida contaminada y su intensidad depende de la cantidad de toxina ingerida. Así mismo, los síntomas suelen remitir después de 2 o 3 días por si solos sin necesidad de hospitalización, aunque en ciertos casos pueden surgir complicaciones derivadas de la deshidratación que causa la diarrea [85,115,191]. De momento, no hay datos disponibles de efectos a largo plazo de estas sustancias por lo que se necesitan más estudios de toxicidad crónica.

Los casos documentados de intoxicaciones en el hombre se produjeron tras el consumo de distintas especies de mejillones, vieiras, almejas, navajas y cangrejos contaminados con OA y/o DTXs. Así mismo, no se ha registrado la muerte de personas asociada a intoxicaciones por DSPs por lo que, a diferencia de la PLTX, se consideran toxinas no letales para el ser humano [192].

En los estudios en animales, el OA es altamente tóxico para ratones tratados por vía i.p. con valores DL_{50} entre 192-255 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Para la DTX-1 y la DTX-2 los valores DL_{50} se establecieron en 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente

[99,103,139,193-195]. Por vía oral la toxicidad es menor, las DL_{50} para el OA son entre 2 y 10 veces más altas que por vía i.p. pero los datos varían de manera considerable no solo entre experimentos realizados por diferentes investigadores sino incluso en los realizados dentro del mismo laboratorio. Las razones de esta inconsistencia de datos todavía no se conocen. [177,194,196,197]. La información acerca de la toxicidad por vía oral de los análogos del OA es muy escasa, pero algunos estudios han postulado que sería mayor la de DTX-1 que la del OA y que la diferencia de toxicidad con la vía i.p. sería mínima [198,199].

Por su parte, la EFSA tras un estudio exhaustivo de los casos existentes de intoxicación en humanos, estableció una ARfD oral de $0.3 \mu\text{g}$ de equivalentes de OA/kg de peso corporal tras aplicar un factor de incertidumbre de 3 al valor de LOAEL de $0.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal en adultos [192]. El límite actual de la Unión Europea para las toxinas del grupo del OA es de $160 \mu\text{g}$ de equivalentes de OA/kg de marisco [200], que es seguro con un consumo menor a 200 g de vianda. Sin embargo, con una porción media de 400 g de marisco diario, resultaría una ingesta de unos $64 \mu\text{g}$ de toxina. Para un adulto de unos 60 kg esto supondría aproximadamente $1 \mu\text{g}$ de equivalentes de OA/kg de peso corporal, es decir, superaría en más de 3 veces la ARfD de $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal con una probabilidad de ocurrencia del 20%. Es por ello que la EFSA propuso un límite de $45 \mu\text{g}$ de equivalentes de OA/kg de vianda para un consumo diario de 400 g. Por tanto, sería recomendable que los límites legales actuales fuesen revisados para proteger mejor la salud del consumidor.

1.1.3.5 Métodos de detección

Al igual que ocurre con la PLTX, para la detección del OA y DTXs también se ha empleado desde hace décadas el **bioensayo con ratón** [85] e incluso existen protocolos para **rata** [201]. El bioensayo en ratón se ha usado para el control de toxinas lipofílicas (como el OA y DTXs) en moluscos durante mucho tiempo. Sin embargo, los requisitos legales y la presión social para evitar el uso de animales de experimentación, junto con la falta de fiabilidad de los resultados producidos por el método biológico han llevado a la prohibición del bioensayo en ratón en el Reglamento de la Comisión (UE) No. 15/2011. Este reglamento establece LC-MS/MS como método de referencia para la detección de toxinas lipofílicas como OA y DTXs [192,202].

Uno de los métodos usados para detectar OA y DTXs es el **ensayo de inhibición de fosfatasas** basado en el mecanismo de acción de estas toxinas sobre las enzimas PP1 y PP2A. Es con esta última con la que se han desarrollado diversas variaciones del método incluyendo los colorimétricos [203-205], fluorimétricos [206,207] y los que se fundamentan en la competencia por receptores [208].

También existen numerosos métodos para determinar la presencia de OA y análogos mediante **immunodetección** y ensayos ELISA con anticuerpos especialmente diseñados para unirse a estas toxinas. Durante la parte experimental de la presente tesis doctoral se ha empleado un nuevo inmunoensayo de inhibición usando un sistema de microesferas y citometría de flujo. En él las toxinas en solución (OA, DTX-1 y DTX-2) compiten con el OA inmovilizado en la superficie de las microesferas por su unión a un anticuerpo monoclonal específico para OA. Este método novedoso permite además la

detección múltiple y simultánea de varias toxinas en una misma muestra si se emplean los anticuerpos adecuados [209].

Existen también métodos de detección basados en **citotoxicidad**, por ejemplo mediante el uso de células KB y empleando MTT como indicador [210]. También da una idea de la citotoxicidad de las muestras la medida fluorimétrica de la despolimerización de la F-actina en células de neuroblastoma BE(2)-M17 [211].

En cuanto a los **métodos físico-químicos** para detección, se utilizan los basados en cromatografía líquida acoplada a fluorescencia (LC-FLD) [212-214] y sobre todo a espectrometría de masas (MS) [215-217]. Además, la cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS/MS) se debe aplicar como método de referencia para la detección de las toxinas lipofílicas y se utiliza de forma habitual para los controles oficiales en cualquier etapa de la cadena alimentaria [202].

1.2. Cianotoxinas

1.2.1. Clasificación de las cianotoxinas

La clasificación actual de cianotoxinas (toxinas producidas por cianobacterias, principalmente de agua dulce) se puede hacer en base a dos criterios [218], su estructura química diferenciando entre: Péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos o bien en base a los principales efectos que producen: Hepatotoxinas que dañan el hígado, neurotoxinas que alteran la neurotransmisión muscular y dermatotoxinas que producen irritaciones en la piel. Los diferentes grupos de cianotoxinas, su clasificación química, mecanismos de acción y los principales organismos productores se muestran en la **Tabla 2**.



INTRODUCCIÓN

Tabla 2: Principales tipos de cianotoxinas.

Grupo	Estructura química	Mecanismo de acción	Organismo productor
Hepatotoxinas			
Microcistinas (MCs)	Heptapéptidos cíclicos	Inhibición proteína fosfatasas tipo 1 y 2A	<i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Anabaenopsis</i>
Nodularinas (NODs)	Pentapéptidos cíclicos		<i>Nodularia</i>
Cilindrospermopsinas (CYNs)	Alcaloides guanidina	Inhibición síntesis de glutatión, proteínas y citocromo P450	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> , <i>Aphanizomenon zflous-aquae</i>
Neurotoxinas			
Anatoxina-a	Alcaloide	Unión irreversible al receptor S nicotínico de acetilcolina	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Planktothrix</i>
Anatoxina-a(s)	Organofosfato	Inhibidor irreversible de acetilcolinesterasa	<i>Anabaena</i>
Saxitoxinas (STXs)	Alcaloides carbamato	Bloquea canales de sodio en axones nerviosos	<i>Anabaena circinalis</i> , <i>Aphanizomenon sp.</i> , <i>Aphanizomenon gracile</i> , <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Lyngbya wollei</i>
Dermotoxinas			
Lyngbyatoxina-a	Alcaloide	Potente promotor tumoral actuando a través de protein kinase C (PKC)	<i>Lyngbya</i>
Aplysiatoxina	Alcaloides		<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Planktothrix (Oscillatoria)</i>
Lipopolisacáridos (LPS)	Lipopolisacáridos	Agentes inflamatorios e irritantes gastrointestinales	Cianobacterias en general

Es relevante mencionar que un mismo compuesto, como es el caso de la Saxitoxina o la Anatoxina, puede ser producido tanto por cianobacterias como por dinoflagelados. Así mismo, algunas cepas de una misma especie pueden ser productoras de toxina y otras no, como ocurre con *Cylindrospermopsis raciborskii* y la producción de cilindrospermopsina (CYN).

1.2.2. Cilindrospermopsina

La enfermedad misteriosa de Palm Island (**Figura 7**) (en inglés “Palm Island Mystery Disease”) fue el nombre que recibió un suceso ocurrido en 1979 en esta zona tropical situada en la parte norte de Queensland, Australia. En Noviembre de aquel año, 138 niños de edades comprendidas entre los 2 y los 16 años así como 10 jóvenes adultos de las tribus Aborígenes de la zona, acudieron a la clínica local presentando síntomas de malestar general, hepatoenteritis, agrandamiento agudo del hígado, estreñimiento, vómitos y dolor de cabeza. A esto le siguieron diarreas sanguinolentas persistentes de hasta 3 semanas de duración con pérdida de proteínas, electrolitos, glucosa, cuerpos cetónicos en la orina y diferentes grados de deshidratación. Alrededor de 50 de los casos se trataron con cuidados paliativos en la clínica local mientras que los pacientes con cuadros más graves se trasladaron al Hospital General de Townsville dónde recibieron terapia de fluidos y cuidados intensivos. Afortunadamente, todos los pacientes se recuperaron y no hubo víctimas mortales [219]. Investigaciones posteriores encontraron un factor común en los pacientes afectados y era que todos ellos habían bebido agua del grifo procedente del embalse de la presa Solomon. Unos días antes del incidente, en este embalse había ocurrido una proliferación masiva de algas y la gente se quejaba del mal sabor y olor que presentaba el agua. Las autoridades locales decidieron tratar la proliferación con un alguicida (1 ppm de sulfato de cobre). Cinco días después de esto, se detectó el primer caso de hepatoenteritis. Así mismo, unas 50 personas que bebieron de un pozo cercano fuera del sistema de tuberías y por tanto de la masa de agua que había sido tratada con alguicida, no presentaron ningún síntoma. La

INTRODUCCIÓN

investigación descartó que se tratase de una enfermedad contagiosa y apuntaron hacia las cianobacterias causantes de la proliferación masiva y sus toxinas como responsables del brote [220].

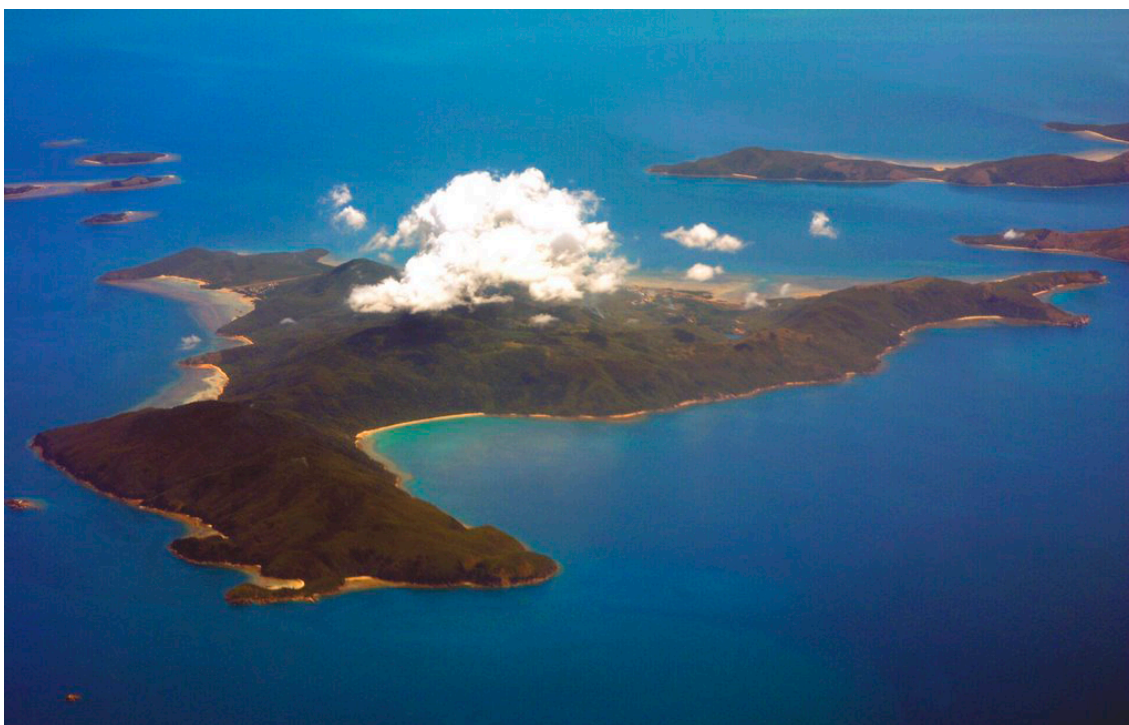


Figura 7: Vista aérea de Palm Island en Queensland, Australia.
Fotografía de P.J. Hamlin. 2008. <http://www.panoramio.com/photo/16315635>

Años después (entre 1981 y 1984) se comprobó que en el embalse Solomon se producían de manera periódica, proliferaciones algales nocivas de cianobacterias con *Anabaena circinalis* y *Cylindrospermopsis raciborskii* como especies predominantes, esta última no había sido encontrada antes en aguas Australianas [221]. Los estudios de toxicidad posteriores realizados con extractos liofilizados de ambas especies de cianobacterias concluyeron que los procedentes de *Cylindrospermopsis raciborskii* eran tóxicos y afectaban especialmente al hígado de los ratones tratados. Al comparar los síntomas de

los estudios en animales con los descritos en los pacientes de Palm Island se llegó a la conclusión de que probablemente estas cianobacterias fuesen una de las causas de la misteriosa enfermedad. Un años más tarde, se aisló de esta especie de cianobacteria un compuesto tóxico al que se denominó cilindrospermopsina (CYN) [222].

C. raciborskii y el resto de cianobacterias productoras de esta toxina de agua dulce solían encontrarse en lagos, embalses, ríos y presas de climas tropicales. En las últimas décadas se ha visto un incremento de su presencia en zonas templadas, incluyendo países de Europa como Alemania, Francia, Italia, Portugal y también España [223-225]. Entre los principales factores de este aumento se encuentran la contaminación antropogénica de sistemas acuáticos que favorece la eutrofización y el calentamiento global [226,227]

1.2.2.1 Organismo productor

La CYN se aisló y purificó por primera vez a partir de cianobacterias de la especie *Cylindrospermopsis raciborskii* (**Figura 8**) en 1992 [222] y actualmente se considera como la principal productora de esta toxina de agua dulce, aunque también existen otros géneros capaces de sintetizarla como *Anabaena bergii*, *Anabaena lapponica*, *Anabaena planctonica*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon gracile*, *Raphidiopsis curvata*, *Raphidiopsis mediterranea*, *Umezakia natans* y *Lyngbya wollei* [228,229]. Al igual que ocurre con el OA y las DTXs, no todas estas especies producen la misma cantidad de CYN ya que hay cepas incapaces de sintetizarla o que están relacionadas con otras toxinas de agua dulce como las microcistinas. La producción de toxina también depende de la expresión de los genes responsables de la biosíntesis de CYN que puede ser estimulada o

INTRODUCCIÓN

reprimida debido a factores ambientales tales como la intensidad lumínica y duración del día, condiciones de la masa de agua (turbidez, temperatura y salinidad entre otras) competición por recursos con otros organismos, división celular, tasa de crecimiento y otros [230].

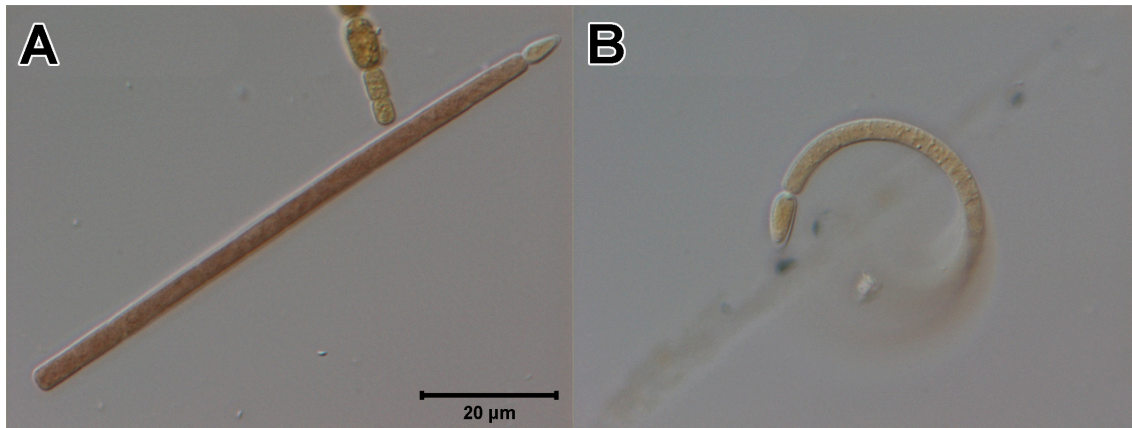


Figura 8: Cianobacterias de la especie *Cylandrospermopsis raciborskii* en sus dos formas predominantes, estirada (A) y combada (B).
Imágenes adaptadas de algaeBase. Fotografías originales y Copyright Karl Bruun.
http://www.algaebase.org/search/images/detail/?img_id=gdb13175d1b3071ca

Por norma general, las cianotoxinas pueden encontrarse acumuladas entre las paredes celulares de los organismos productores, en el citoplasma o ser liberadas al medio mediante excreción controlada, lisis celular o rotura de la célula [231]. En el caso de la CYN, cuando la población de cianobacterias se encuentra en fase exponencial de crecimiento, alrededor de un 80-90% del contenido total de toxina permanece en el interior celular mientras que en la fase post-exponencial, cuando ya no hay crecimiento activo, cerca de un 50% de la toxina se libera al medio de manera natural. El porcentaje de toxina expulsada al medio aumenta todavía más cuando las células entran en senescencia [232]. Por tanto, en el caso de la CYN, a la hora de diseñar sistemas para tratar de controlar las proliferaciones masivas de las algas que la

producen, es importante evitar el uso de compuestos que puedan lisar las células [233,234], para así evitar la liberación de la toxina al agua.

1.2.2.2 Estructura y propiedades químicas

La estructura de la CYN se dilucidó por primera vez en 1992 (**Figura 9**) a partir de extractos de *C. raciborskii* y empleando técnicas de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear [222].

La molécula posee un grupo funcional compuesto por una guanidina tricíclica combinada con hidroximetil-uracilo. La fórmula general es $C_{15}H_{21}N_5O_7S$ y su peso molecular se sitúa aproximadamente en los 415 Da, casi la mitad que el OA y DTXs y unas seis veces más pequeña que la PLTX.

Existen análogos estructurales de la misma como la 7-epi-CYN cuyo grupo hidroxilo de la posición C7 se encuentra en orientación distinta al de la CYN y es producida por algunas cepas de *Aphanizomenon ovalisporum* [235] y la 7-deoxi-CYN que carece de un oxígeno en dicha posición C7.

Aunque la molécula es eléctricamente neutra, posee cargas positivas y negativas (zwitterión) lo que la hace altamente soluble en agua aunque también lo es en DMSO y otros disolventes polares como el metanol. En disolventes apolares, sin embargo, presenta una solubilidad muy baja. Es estable a diversos rangos de pH, temperatura e intensidad de iluminación solar.

INTRODUCCIÓN

Así mismo, cabe señalar que a diferencia de otras ficotoxinas, desde el año 2000, se puede obtener de manera sintética, pero se necesitan muchos pasos de reacción (20) y tiene un índice de recuperación todavía bastante bajo (3.5%) [236].

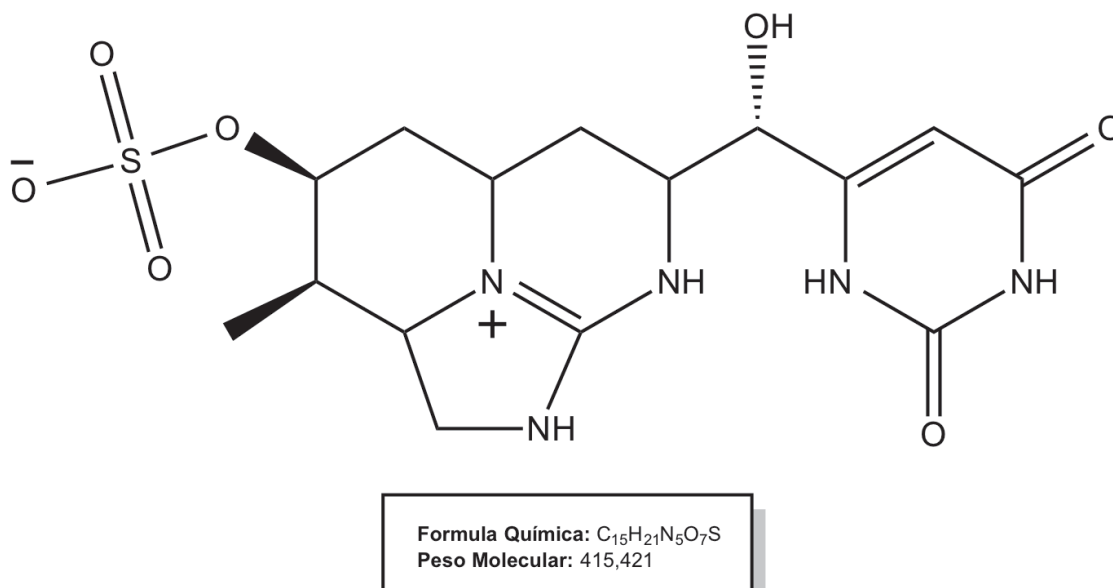


Figura 9: Estructura química de la cylindrospermopsina

1.2.2.3 Mecanismo de acción

Aunque el mecanismo de acción exacto de esta toxina todavía se está investigando, se ha postulado que la toxicidad a largo plazo de la CYN estaría relacionada con una inhibición de síntesis de proteínas que normalmente es irreversible [237-239]. Por otro lado, diversos estudios parecen indicar que la CYN es capaz de inhibir la síntesis de glutatión reducido (GSH) [240,241], molécula implicada en mantener al mínimo de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden provocar estrés oxidativo y por tanto daño a nivel celular. Sin embargo, a día de hoy tampoco se pueden descartar otros

mecanismos de acción. Además, por el momento se desconoce la vía de entrada de la toxina en las células por lo que son necesarios más estudios para perfilar mejor su actuación.

1.2.2.4 Sintomatología, vías de intoxicación y toxicidad

La CYN es una toxina hepatotóxica, es decir, que independientemente de la ruta de administración, afecta principalmente al hígado [242] aunque también en menor medida a riñones, pulmones, bazo, corazón, glándulas adrenales, timo, médula ósea y tracto gastrointestinal [221,243-245].

Se considera que la toxicidad aguda de la CYN está mediada por el citocromo P450 (CP450), que forma parte de una familia de proteínas implicadas directamente en el metabolismo de fármacos. La biotransformación de la CYN por parte del CP450 genera metabolitos todavía más tóxicos que el compuesto original [240]. Se ha demostrado en diversos estudios que organismos que tienen este CP450 dañado no sufren tanto los efectos tóxicos de la CYN; la carencia de CP450 ejerce cierto efecto protector frente a la toxina [241,246].

Los principales síntomas de intoxicación por CYN son variados y en las etapas iniciales incluyen malestar general, anorexia, vómitos, dolor de cabeza, dolor abdominal y fiebre. En etapas posteriores, se pueden agravar presentándose diarreas sanguinolentas, deshidratación, hepatomegalia y hepatoenteritis, fallo hepático con niveles elevados de ciertas enzimas, fallos renales con pérdida de electrolitos, cetonuria, glucosuria y hematuria [219,247].

Dentro de las rutas de exposición a CYN se incluyen la vía oral, la inhalación, vía dérmica por contacto e incluso la vía parenteral accidental [224,248,249].

INTRODUCCIÓN

La vía más común de intoxicación por CYN es la oral al beber agua potable contaminada o incluso por la ingestión accidental durante el baño, ducha u otras actividades recreativas y deportes relacionados con masas de agua que presenten proliferaciones masivas de algas productoras de toxina. Así mismo, la vía dérmica por contacto y la inhalación de aerosoles durante los supuestos anteriores también puede dar lugar a intoxicaciones [250].

La CYN se puede bioacumular en animales como peces y crustáceos expuestos a la misma afectando a la calidad y seguridad de este tipo de alimentos suponiendo un riesgo potencial para el consumidor. Incluso la ingesta de vegetales que han sido regados con agua procedente de lagos, estanques o embalses contaminados con CYN pueden provocar intoxicaciones [251]. Otra fuente potencial de exposición a la toxina son los llamados suplementos nutricionales procedentes de algas verde-azuladas, o en inglés “blue-green algae supplements” (BGAS) muy comunes en algunos países occidentales debido a los supuestos efectos beneficiosos para la salud. Principalmente se obtienen de las cianobacterias lacustres *Spirulina spp* y *Aphanizomenon flos-aquae*, esta última es una de las especies productoras de CYN [252-254].

Como ya se ha comentado antes, la CYN es tóxica para humanos pero también para muchas especies de bacterias, protozoos, plantas, invertebrados y vertebrados [251]. Los estudios de toxicidad efectuados en ratones mostraron que los valores DL₅₀ para administraciones i.p. eran de 2.1 mg/kg después de 24h de exposición o de 0.2 mg/kg si el tiempo de exposición era de 5 días [222,237,255]. Por su parte, administrada oralmente, los valores de DL₅₀ eran

más altos variando entre 4.4 y 6.9 mg/kg provocando la muerte de los ratones después de 2-6 días [243,256].

Existen a su vez estudios que al margen de la hepatotoxicidad extensamente descrita [224,257-262], indican que la CYN podría tener además efectos neurotóxicos [263-265], inmunotóxicos [237,242,256], genotóxicos [242,266,267], carcinogénicos [244], dermatotóxicos [268-271] e incluso presentar toxicidad fetal y riesgo durante el embarazo [272].

Debido al problema creciente que suponen las cianotoxinas en el agua de bebida, en zonas recreacionales o incluso en la agricultura, muchos países han desarrollado guías de seguridad para establecer ciertos límites de valores permitidos en agua dulce. Sin embargo, la mayoría de estos límites y regulaciones solo contemplan a las microcistinas (MCs) y no a la CYN.

Analizar agua de manera continua para detectar cianotoxinas es un trabajo costoso y es por ello que la World Health Organization (WHO), propuso un sistema de alerta basado en el número de células de cianobacterias presentes en el agua [231]. El primer nivel de alerta corresponde a 20.000 células/mL y prohíbe la bebida de esa agua. El segundo nivel, que prohíbe además el baño se alcanza cuando el conteo de células llega o supera las 100.000 células/mL.

Así mismo, un estudio realizado en 2003, basándose en nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) en ratones, propuso como referencia un límite de 1 µg/L de CYN en agua teniendo en cuenta el peso de un adulto de 60 kg y un consumo medio de agua diario de 2L [261].

En la actualidad, solamente cinco países tienen regulaciones específicas para la CYN en agua de bebida. Canadá, Australia y Nueva Zelanda han adoptado el límite descrito anteriormente de 1 µg/L. Brasil sin embargo lo eleva hasta los 15 µg/L mientras que Alemania lo restringe a 0.1 µg/L de CYN en agua de bebida [258,273]. Para el baño y actividades recreativas, hasta la fecha, ningún país tiene una legislación específica en vigor. Debido a la aparición cada vez más frecuente de los organismos productores de CYN en multitud de lugares del planeta y al riesgo sanitario que supone, conviene valorar la implementación de normativas que regulen la cantidad de toxina en el agua a nivel mundial.

1.2.2.5 Métodos de detección

Como ocurre con el resto de toxinas mencionadas en esta tesis, uno de los primeros métodos de detección de la CYN fue el **bioensayo en ratón**. Consistente en la inyección i.p. a un mínimo de 3 ratones de muestras contaminadas (ej. obtenidas de proliferaciones masivas de productores de CYN). A continuación se observan los síntomas que experimentan los animales (hepatotóxicos, neurotóxicos etc) y finalmente, tras 24 h se realiza la necropsia y se evalúa el daño en ciertos órganos o tipos celulares como por ejemplo hepatomegalia y las posibles alteraciones en células hepáticas [221,274]. Una vez más, este método de detección es objeto de numerosas críticas por sus implicaciones éticas por lo que su uso se está restringiendo.

Al margen del bioensayo con ratón, se han desarrollado **métodos in vivo alternativos** como por ejemplo los que emplean larvas de ciertos crustáceos de especies como *Daphnia magna* [275], *Artemia salina* [276] o *Thamnocephalus platyurus*. Estos métodos consisten básicamente en incubar

las larvas con medio de crecimiento, añadir la muestra contaminada con la toxina y comparar la mortalidad de las larvas frente a cantidades conocidas de CYN. Existen incluso kits comerciales (ThamnoToxkit or RapidToxkit) que suelen tener una buena correlación con el bioensayo en ratón [277,278]. Otros organismos como cobayas, insectos (*Locusta migratoria*) [279], caracoles (*Helix pomatia* y *Lymnaea stagnalis*) [263] y hasta la planta de la mostaza (*Sinapsis alba*) [280] se pueden emplear para detectar CYN.

En la detección de CYN mediante pruebas de **citotoxicidad** se emplean diversas líneas celulares. Al igual que para la PLTX, OA y DTXs, estos métodos se basan en la incubación de las células con cantidades conocidas de CYN y en la determinación de la muerte celular. Se consiguen curvas dosis-respuesta en las que a partir de la citotoxicidad obtenida con muestras se puede extrapolar la cantidad de CYN que contienen. La primera línea celular usada fue la CHO K1 derivada de ovario de rata [281] pero actualmente existen métodos desarrollados con células de distintos órganos tales como hígado (HepG2, C3A y Clone-9), riñón (Vero), cerebro (MNA), médula (BE-2), dermis (HDF), estómago (NCI-N87), íleo (HTC-8), duodeno (HuTu-80) y colon (Caco-2) [282-286].

Se ha desarrollado también un método bioquímico basado en las propiedades de **inhibición de proteínas** de la CYN usando un kit comercial de lisado de reticulocitos de conejo [287,288].

Se pueden usar también métodos de **inmunodetección** para la CYN ya que desde hace tiempo existen anticuerpos específicos contra la misma. Incluso se comercializan kits ya preparados para realizar detecciones mediante ELISA

[228,289-291]. Recientemente se ha desarrollado un método de multidetección novedoso para la CYN, STX (saxitoxina), MC (microcistina), AD (ácido domoico) y ANA (anatoxina) que emplea microesferas acopladas a un sistema de fluorimetría de flujo [292]. Este método se basa en la realización de cinco ensayos de inmunoinhibición simultáneos en los que se establece una competición entre las toxinas ligadas a las microesferas y las toxinas en solución en las muestras problema por su unión a los anticuerpos específicos. Se obtienen curvas de calibración que permiten la cuantificación de las toxinas en las muestras problema.

En cuanto a métodos **físico-químicos**, se puede cuantificar la CYN mediante técnicas de cromatografía líquida (LC), cromatografía de gases (GC) y electroforesis capilar (CE) [293] acopladas a detectores de ultravioleta (UV) [222,255,294], fluorescencia (FLD) [295,296] o espectrometría de masas (MS/MS) [297-299]. También existen métodos que no necesitan separación cromatográfica previa empleando técnicas de espectrometría de tiempo de vuelo (TOF) como los MALDI-TOF [296].

1.3 Viabilidad celular y citotoxicidad

Generalmente, se puede definir la viabilidad celular como la cantidad de células vivas en una muestra. Así mismo, entendemos por citotoxicidad la cualidad de resultar tóxico para las células. Esto aplica a cualquier tipo de sustancia (fármacos, toxinas) que pueda desencadenar un efecto nocivo en las mismas.

Los ensayos de citotoxicidad *in-vitro* se utilizan frecuentemente para determinar si un compuesto o grupo de compuestos afectan negativamente a una célula en concreto o a poblaciones celulares, es decir, si alteran el funcionamiento celular o la proliferación normal pudiendo conducir a su muerte. Como se explicará a continuación, existen varios métodos para cuantificar la potencia citotóxica de determinadas sustancias [300]. Normalmente en los estudios de citotoxicidad *in vitro* se emplean diferentes tinciones celulares con el fin de estimar el número de células viables después de un tratamiento. Algunos de estos métodos incluso permiten dilucidar cómo está afectando el compuesto a las células y discernir por ejemplo si la muerte celular se produce por necrosis o apoptosis, si la membrana celular se daña, si hay cambios en la actividad metabólica celular etc. En el siguiente apartado abordaremos algunos de los más habituales.

1.3.1 Métodos para el estudio de la citotoxicidad de sustancias

Uno de los primeros métodos para determinar la viabilidad celular, que además se sigue utilizando de manera habitual hoy en día es la exclusión celular con el colorante vital azul tripano. Este ensayo se basa en el principio de que las células viables tienen su membrana intacta y por tanto no captarían el azul tripano. En las células con membranas dañadas (no viables) el colorante llegaría al interior celular y se verían azules bajo el microscopio. Mediante un

recuento directo (manual o automático) se puede determinar de manera rápida y sencilla la cantidad de células viables en una muestra. Sin embargo, este procedimiento normalmente requiere que las células estén en suspensión para poder contarlas y no proporciona datos más allá del daño en la membrana celular [301].

Actualmente, los ensayos de citotoxicidad que más se emplean son los adaptados a placas de 96 o más pocillos ya que permiten probar de manera simultánea distintas condiciones experimentales. Se pueden realizar con células en suspensión o células adherentes (como las que crecen en monocapas). Los métodos existentes se pueden clasificar en varios grupos en función del principio empleado para medir la viabilidad [302], los más comunes son métodos basados en: la medida de ATP [303], marcadores de actividad de proteasas y otras enzimas celulares (GF-AFC) [304], la determinación de las propiedades eléctricas de la monocapa celular (xCELLIGENCE) [305] o la medida de las funciones metabólicas de las células usando sales de tetrazolio (MTT, MTS, XTT, WST) [306-312]. La mayoría de estos métodos son de punto final, al usarse de forma destructiva, lo cual imposibilita hacer un seguimiento del comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento. Una prueba *in vitro* ideal para evaluar tanto la citotoxicidad como la proliferación celular debe tener como características principales: ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de la población celular viable y que no muestre interferencias ni con las células ni con el compuesto a evaluar. Estas características las reúne el método que utiliza la resazurina (AlamarBlue) empleado durante la presente tesis doctoral y que a continuación se expondrá con más detalle.

La resazurina es un indicador redox hidrosoluble y permeable a través de la membrana celular. Este indicador, de color azul y no fluorescente, es reducido por las oxidoreductasas que se encuentran principalmente en las mitocondrias de las células viables convirtiéndose en resorufina, una molécula de color rosa y fluorescente (**Figura 10**). La resorufina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de las distintas sustancias sobre las células. La cantidad de resorufina producida es directamente proporcional al número de células viables [313]. Así pues, este método permite medir la viabilidad celular basándonos en la actividad metabólica bien sea empleando un lector de absorbancia (colorimetría a 570 nm) o de fluorescencia ($\lambda=560$ nm excitación / $\lambda=590$ nm emisión) ya que este colorante tiene propiedades tanto cromóforas como fluoróforas.

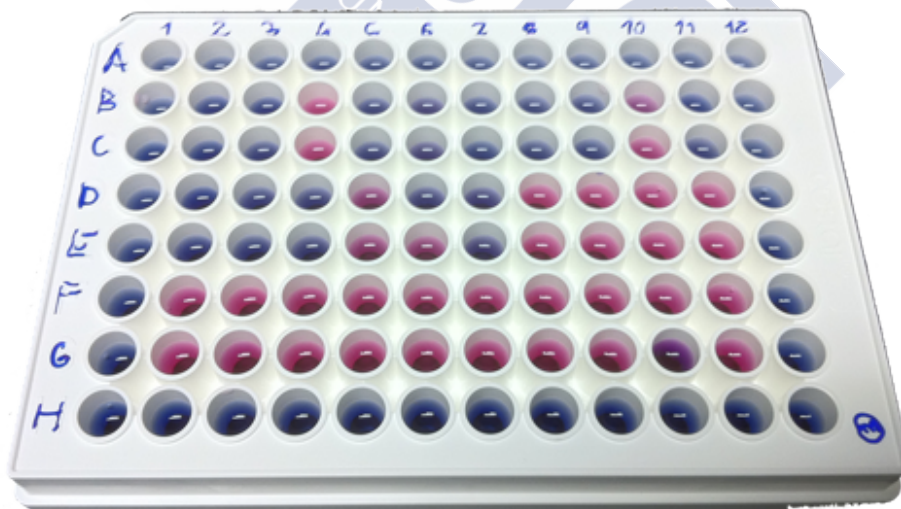


Figura 10: Ensayo de AlamarBlue en una placa de 96 pocillos sembrada con células neuroblastoma Be(2)-M17 incubadas con distintas concentraciones de PLTX durante 24 horas.

Entre las principales ventajas del método se encuentran: el colorante es poco tóxico para las células (a diferencia de los utilizados en las otras técnicas descritas), y permite un estudio continuo en las mismas células (incluso durante

INTRODUCCIÓN

varios días), economizando tiempo y dinero, especialmente cuando se evalúan compuestos escasos y preciados; es un método sensible y altamente reproducible [314,315].



1.4 Absorción y permeabilidad intestinal

El tracto gastrointestinal humano (**Figura 11**) es el conjunto de órganos responsable de la ingestión de sustancias, digestión de las mismas, absorción y excreción de residuos. Comúnmente, se distinguen dos partes, el tracto gastrointestinal superior que comprende la cavidad oral, faringe, esófago y estómago y el tracto gastrointestinal inferior compuesto por el intestino delgado, intestino grueso y ano. Así mismo también se consideran parte del tracto gastrointestinal otros órganos tales como el hígado, la vesícula biliar y el páncreas que intervienen en los importantes procesos fisiológicos que se desarrollan en el mismo.

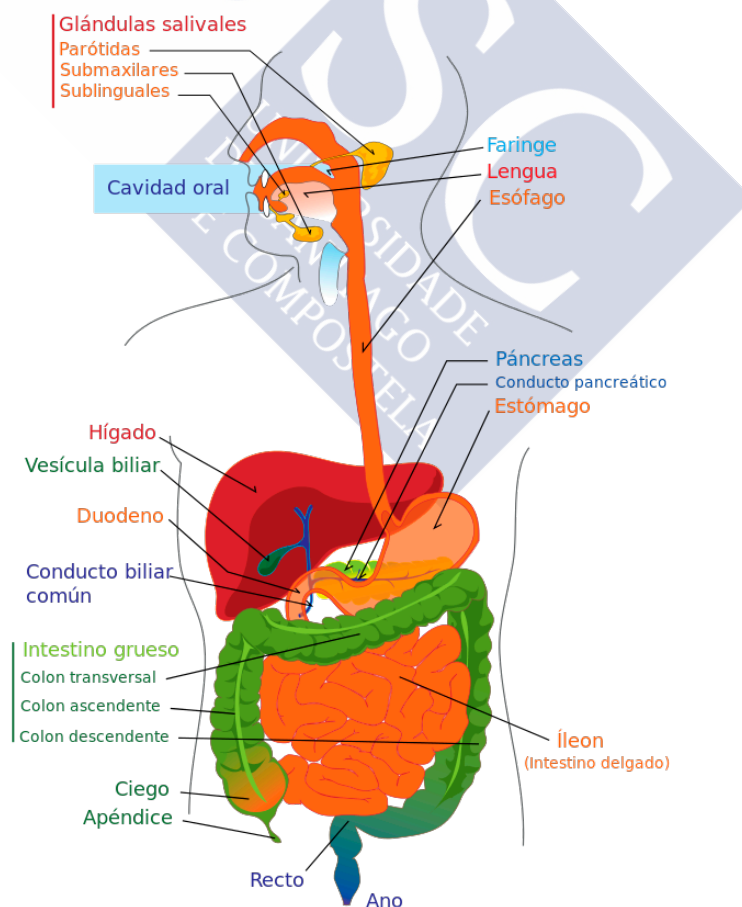


Figura 11: Diagrama del tracto gastrointestinal humano

INTRODUCCIÓN

El epitelio intestinal actúa como una barrera físico-química y biológica controlando la entrada de nutrientes y compuestos ajenos al organismo (fármacos, toxinas etc.) gracias a que está formado por células con distintas funciones entre las que se incluyen los enterocitos, células endocrinas y exocrinas, células de Paneth o células M. Los enterocitos, son el tipo celular más abundante en este epitelio (90% del total de células) y son los principales responsables de la absorción intestinal [316]. La absorción intestinal consiste en el paso de una sustancia desde intestino a la circulación sanguínea. Es en el intestino delgado dónde ocurre la mayor parte de dicho proceso. Así mismo, se puede definir la biodisponibilidad oral como la fracción de la dosis de compuesto administrado por vía oral que alcanza inalterada la circulación sistémica. Esta biodisponibilidad depende entre otros factores del metabolismo intestinal y hepático de ese compuesto [317] (**Figura 12**).

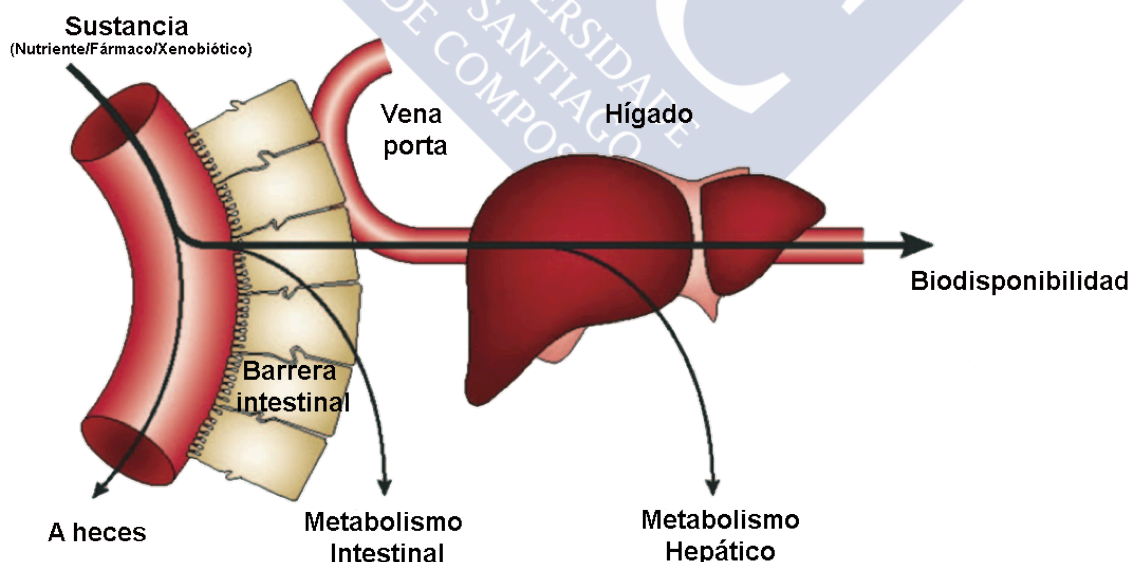


Figura 12: Ruta de las sustancias que pasan por el tracto gastrointestinal hasta alcanzar la circulación sistémica. Modificado de: H. van de Waterbeemd, E. Gifford, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2003, 2, 192.

La absorción de compuestos a través del epitelio intestinal es un proceso complejo que puede tener lugar por uno o varios mecanismos de transporte/rutas dependiendo de su estereoquímica, solubilidad, peso molecular, estabilidad química, carga eléctrica etc. Este transporte puede seguir dos rutas: paracelular o transcelular (**Figura 13**).

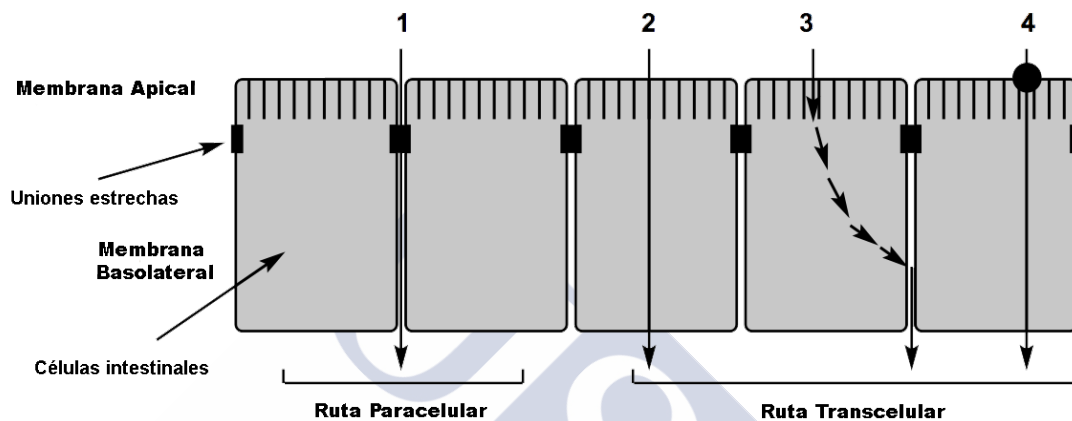


Figura 13 Transporte de moléculas a través del epitelio intestinal: Ruta paracelular y Ruta Transcelular. 1) Transporte extracelular, 2) Difusión pasiva a través de membrana, 3) Transcitosis, 4) Transporte mediante proteínas transportadoras

En la ruta paracelular, las sustancias atraviesan el epitelio intestinal por difusión pasiva a través de los espacios intercelulares (pueden atravesar las uniones estrechas) cuya permeabilidad depende de los componentes de las mismas, del estado fisiológico de las células y de las propiedades intrínsecas de las moléculas a transportar (tamaño, grupos reactivos, etc). Generalmente, los compuestos hidrofílicos y péptidos son transportados mediante esta ruta [318]. Estas sustancias no suelen ser metabolizadas por las enzimas intracelulares. Sin embargo, este transporte no supone una zona muy amplia ya que las uniones estrechas solamente representan el 0.1% de la superficie del intestino [319].

En la **ruta transcelular** el transporte tiene lugar a través de la propia célula por lo que los compuestos deben atravesar la membrana plasmática. La superficie de membrana es unas 1000 veces mayor a la que ocupan las uniones estrechas debido a los múltiples pliegues del microvilli apical de las células epiteliales [320]. Generalmente, las sustancias lipofílicas suelen seguir esta ruta aunque también algunas hidrofílicas de bajo peso molecular [321]. Dentro de la ruta transcelular podemos diferenciar los siguientes mecanismos de transporte:

- **Difusión pasiva a través de membrana:** Consiste en el paso de una sustancia a través de la membrana del enterocito en función de su gradiente de concentración. Este es el mecanismo de transporte que utilizan moléculas de muy bajo peso molecular. Viene determinado por ley de Fick según la cual la velocidad de difusión es directamente proporcional a la concentración de la sustancia y a la superficie de membrana mientras que es inversamente proporcional al grosor de la membrana [322].
- **Transcitosis:** Este transporte emplea vesículas (clatrina, caveolina) para transportar macromoléculas entre las membranas apical y basolateral de las células (o la basal). La transcitosis es una combinación entre los procesos de endocitosis y exocitosis. Al contrario que la difusión pasiva, necesita energía metabólica y según la sustancia a transportar, determinados receptores. No obstante, es un mecanismo de transporte lento y muy pocos fármacos lo siguen.
- **Mediado por proteínas transportadoras de membrana:** Este transporte requiere la interacción específica entre la molécula a

transportar y la proteína transportadora siendo un mecanismo saturable generalmente utilizado por pequeñas moléculas hidrofílicas. Se puede distinguir: **transporte activo** se efectúa en contra de gradiente de concentración o electroquímico del sustrato y requiere el consumo de energía metabólica (con frecuencia ATP), normalmente está ligado a transporte de iones como Na^+ o H^+ ; **transporte facilitado** sigue el mismo principio termodinámico que la difusión pasiva es decir, sin gasto de energía y a favor de gradiente del sustrato a transportar pero está mediado por una proteína que favorece el movimiento de las moléculas a través de la membrana.

1.4.1 Modelos de estudio de la absorción intestinal de sustancias

La mucosa gastrointestinal está caracterizada por la presencia de villi y microvilli. Los villi son múltiples proyecciones que salen al lumen y que están formadas por células epiteliales. Los enterocitos poseen además microvilli, es decir, microvellosidades celulares que aumentan la superficie de absorción de sustancias del intestino situándola por término medio en el cuerpo humano en unos 250 m^2 . Este villi constituye la unidad anatómica y funcional para la absorción y permeabilidad de nutrientes y compuestos ajenos al organismo [323]. La mucosa intestinal, está formada por una capa epitelial, la lamina propia compuesta de una matriz de colágeno que contiene vasos sanguíneos y linfáticos y la mucosa muscular. Por tanto, toda sustancia que entre a la circulación sanguínea tiene que pasar forzosamente por la capa epitelial, parte de la lamina propia y la pared del vaso sanguíneo en cuestión. Se han desarrollado multitud de métodos para estudiar la absorción intestinal de

INTRODUCCIÓN

fármacos que se pueden clasificar en base a su naturaleza en métodos *in vivo*, *in situ*, *in silico* o *in vitro* [321,324-326].

En los métodos *in vivo* se realiza el estudio en el organismo vivo. Se suelen utilizar animales de experimentación y el organismo que se toma como referencia es casi siempre la rata. Sin embargo, también se hacen estudios de perfusión intestinal en humanos con la ayuda de balones intestinales. La principal ventaja es que se realiza el proceso de absorción completo integrándose la respuesta fisiológica, el metabolismo y el transporte de sustancias. Como desventaja cabe decir que se usan poco debido a que son técnicas complejas que requieren anestesia y que el aumento de la presión luminal hidrostática puede influir en la permeabilidad intestinal.

Los métodos *in situ* son similares a los *in vivo* incluido el uso de anestesia salvo que la permeabilidad se mide solamente en ciertas zonas delimitadas del tracto gastrointestinal. Presentan ciertas ventajas frente a los métodos *in vivo* como la omisión de paso por el estómago evitando así que compuestos ácidos precipiten. A la vez puede ser una desventaja ya que normalmente toda sustancia administrada por vía oral, debe pasar por el estómago.

Los métodos *in silico* consisten en modelos informáticos para predecir la absorción intestinal de diversas sustancias en base a datos previos o a características de la propia molécula objeto de estudio.

Finalmente, dentro de los métodos en *in vitro*, se incluyen una variedad de técnicas entre las que cabe mencionar el uso de membranas artificiales, las cámaras de Ussing que utilizan trozos de intestino humano o animal, la técnica “everted gut sac” utilizando intestino delgado de rata (aunque realmente este

se considera un método *ex vivo*) o el empleo de células en cultivo como las MDCK de riñón canino, las HIEC-6 de intestino delgado humano o las HT-29 y Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano. Estas últimas, Caco-2, han sido el modelo celular utilizado para estudiar la permeabilidad intestinal de distintas toxinas a lo largo de la presente tesis doctoral.



1.4.2 Evaluación *in vitro* de la permeabilidad intestinal mediante células Caco-2

La línea celular Caco-2 fue establecida a mediados de la década de los 70 por Fogh [327]. Es modelo celular aislado de un paciente adulto caucásico de 72 años que padecía adenocarcinoma de colon. La particularidad de estas células es que expresan fenotípicamente características de colonocitos y de enterocitos, tanto bioquímica como morfológicamente [328]. Son adherentes, crecen formando monocapas (**Figura 14**) y se diferencian de manera espontánea a enterocitos. Cuando alcanzan la confluencia, el nivel de expresión de proteínas propias de colonocitos empieza a descender mientras que aumenta el de proteínas específicas de enterocitos de intestino delgado como la villina y ciertas hidrolasas [329].

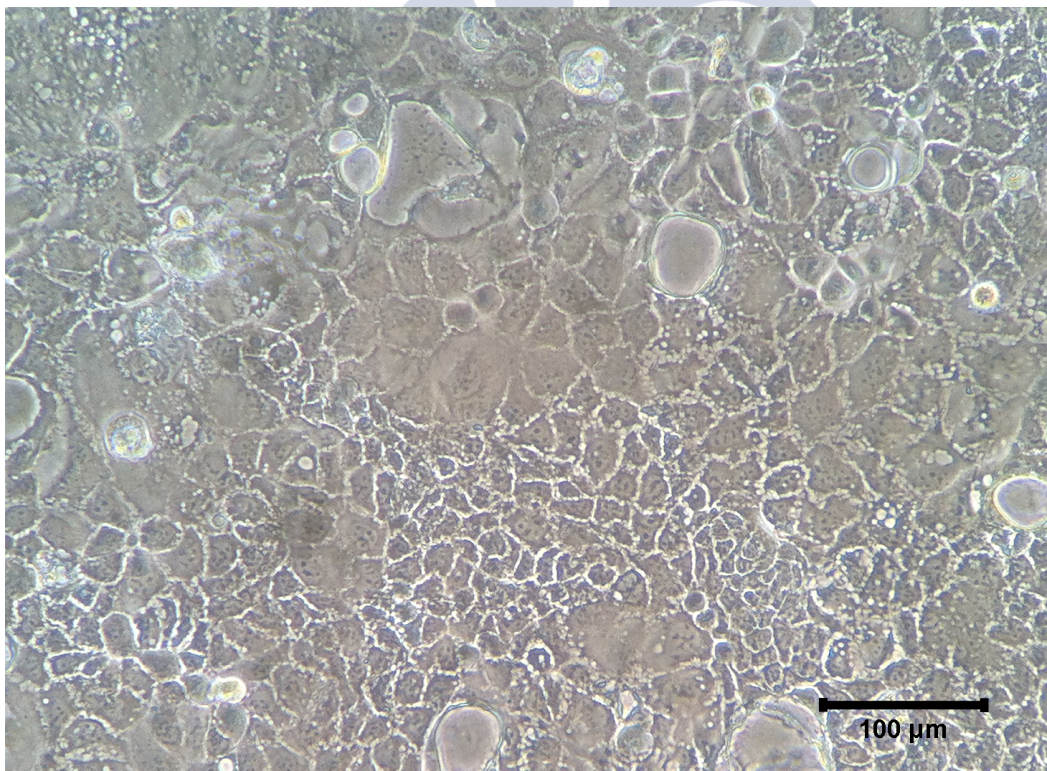


Figura 14: Imagen de microscopía de una monocapa de células Caco-2 en cultivo

Así pues, a partir de los 15 días en cultivo, las células están polarizadas presentando la estructura morfológica típica de enterocitos maduros con el borde en cepillo de la parte apical (microvilli) y uniones estrechas bien formadas entre células en la parte basolateral (**Figura 15**).

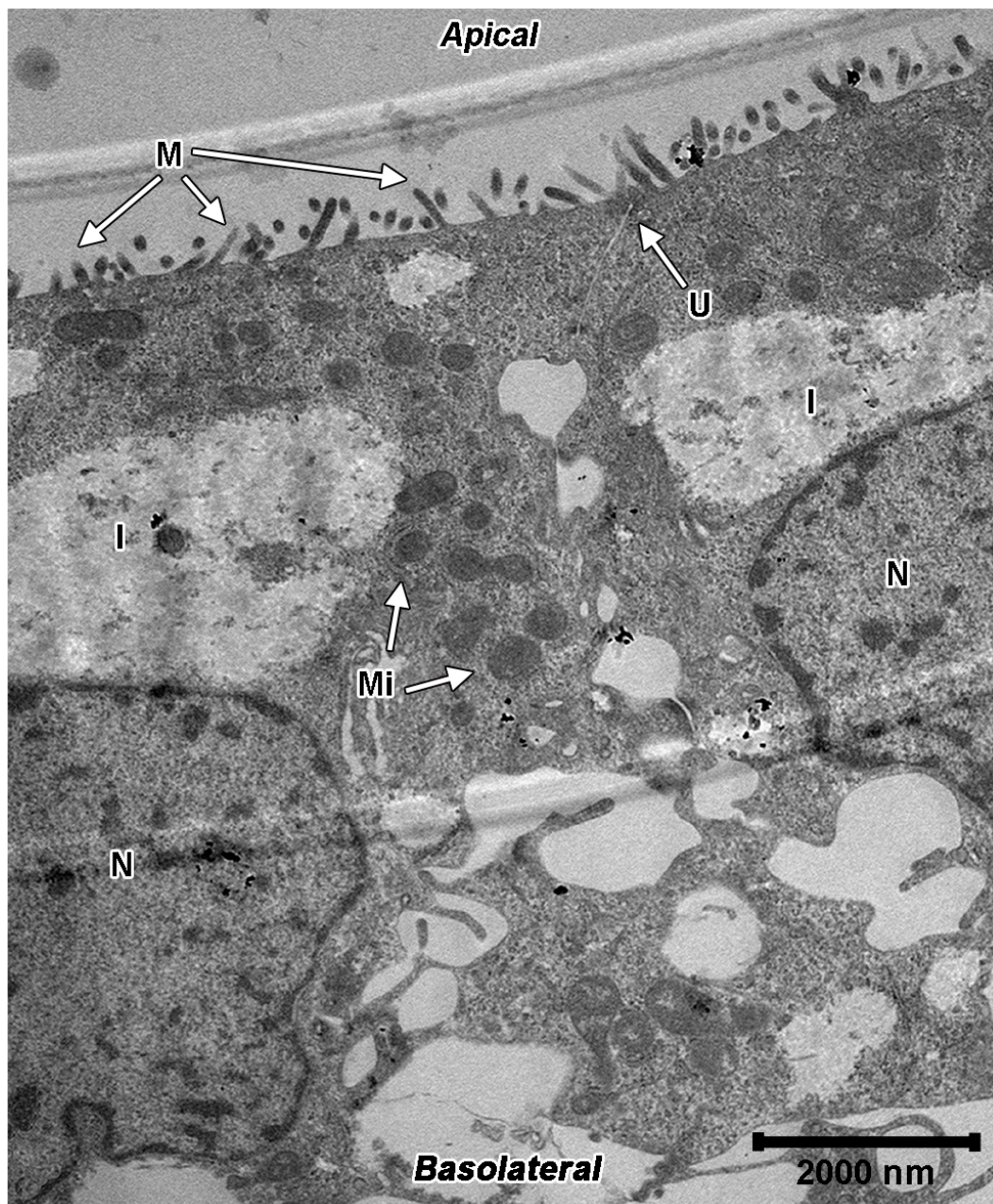


Figura 15: Imagen de microscopía electrónica de transmisión de dos células Caco-2 diferenciadas y polarizadas en corte transversal. Se indican la parte apical y basolateral y las siguientes estructuras celulares: Microvilli/borde en cepillo (**M**), uniones estrechas (**U**), inclusiones citoplasmáticas (**I**), núcleo (**N**), mitocondrias (**Mi**).

INTRODUCCIÓN

Originalmente, las células Caco-2, se aislaron con el objetivo de hacer estudios sobre el cáncer y terapias citostáticas. Años más tarde, debido a las dificultades en la obtención de líneas celulares intestinales diferenciadas a partir de tejidos normales [330], se usaron para estudiar la absorción y permeabilidad intestinal de fármacos. Su empleo se popularizó, sobre todo después de los ensayos llevados a cabo por Hidalgo y colaboradores en 1989 [331]. Para los estudios de permeabilidad, las células Caco-2 se suelen sembrar sobre soportes permeables que permiten el acceso de iones, nutrientes y fármacos por ambos lados de la monocapa celular. Por ejemplo, insertos con membranas semipermeables (filtros) con distintos tamaños de poro y fabricadas con diversos materiales entre los que destacan el tereftalato de polietileno (PET), poliestireno (PS) o el policarbonato (PC). Estos insertos se colocan en placas con pocillos (**Figura 16**) y se mantienen en cámaras de cultivo a 37°C para que las células crezcan hasta su diferenciación y polarización completa (> 15 días) con cambios de medio de cultivo frecuentes,



Figura 16: Monocapas de células Caco-2 sembradas en insertos con membrana semipermeable de PET colocados en una placa de 12 pocillos

tanto en el inserto como en el pocillo. Existen también algunas variantes del método que aceleran el proceso de diferenciación reduciéndolo a unos 3-7 días [332,333].

Algunos parámetros como el transporte de la molécula PEG 4000 o la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) se suelen usar como indicadores de la integridad de la monocapa de células Caco-2. En el caso del TEER permite el monitoreo de la confluencia, desarrollo e integridad de la monocapa celular. Se puede medir este parámetro haciendo uso de un electrodo especial cuyos bornes se sitúan en el inserto (compartimento apical) y el pocillo (compartimento basolateral) respectivamente (**Figura 17**). De esta forma, haciendo pasar una pequeña carga eléctrica se puede determinar la resistencia de la monocapa de células que básicamente viene condicionada por la formación de las uniones estrechas entre las mismas. El resultado se expresa en Ω/cm^2 . La formula general para el cálculo del TEER sería:

$$TEER = (R_i - R_b) \times S$$

Dónde **R_i** es la resistencia de los insertos con células Caco-2 expresada en ohmios (Ω), **R_b** la resistencia de un inserto en blanco, es decir sin células, usado para calibrar la resistencia eléctrica que ya de por si ofrecen el medio de cultivo y el propio inserto con la membrana al paso de corriente. Finalmente **S** es la superficie del inserto/membrana en cm^2 .

Generalmente se considera que la monocapa de células Caco-2 está formada cuando el TEER es próximo o superior a **300 Ω/cm^2** [334]. Durante el transcurso de los experimentos es también frecuente medir este parámetro

INTRODUCCIÓN

para comprobar si el compuesto objeto de estudio está afectando a la integridad de la monocapa de células.

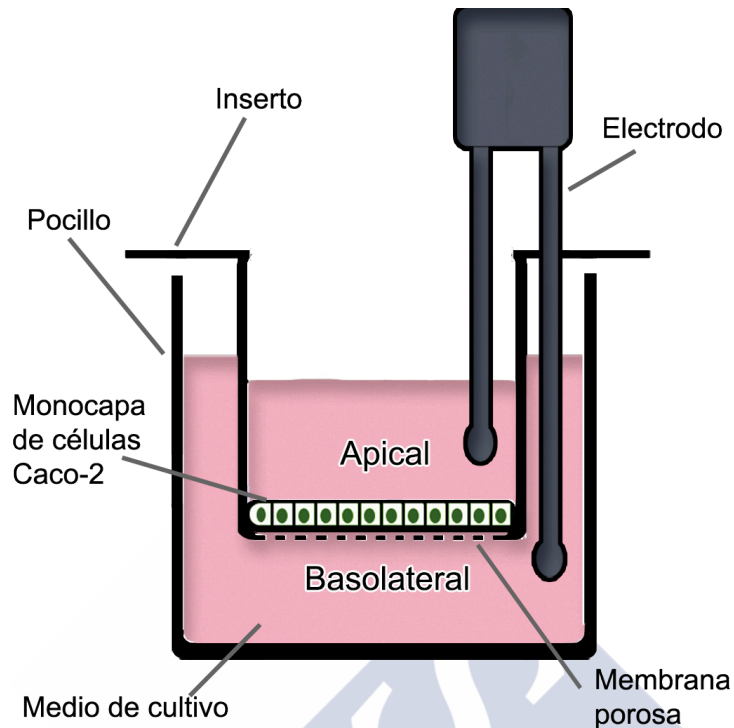


Figura 17: Esquema de la configuración de un inserto/pocillo típico en un estudio de permeabilidad intestinal con células Caco-2. Se representa la aplicación del electrodo para la determinación del TEER

La sustancia objeto de estudio habitualmente se deposita en el compartimento apical (inserto). Este compartimento apical correspondería al espacio luminal del intestino delgado, mientras que el compartimento basal (pocillo) sería el equivalente a la zona del intestino más próxima al torrente sanguíneo. Se pueden tomar muestras tanto del inserto como del pocillo que posteriormente se analizarán con diferentes métodos de cuantificación para determinar que cantidad de sustancia ha traspasado la monocapa celular, tanto por la ruta paracelular como por la ruta transcelular.

La mayor ventaja de este método, al margen de su sencillez en la puesta a punto es que se usan células humanas y no se ve condicionado por las diferencias interespecíficas de otros métodos *in vitro* en cuanto a morfología y características fisiológicas. La industria farmacéutica lo utiliza a menudo para hacer screening de la absorción intestinal de numerosos compuestos ya que puede proporcionar una valiosa información comparativa no solo de absorción sino también del metabolismo y toxicidad sobre la mucosa intestinal de los fármacos [321]. Por tanto, este método es adecuado para estudiar la permeabilidad intestinal de las toxinas marinas y de agua dulce [335,336].







2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal evaluar mediante sistemas *in vitro* la toxicidad y la permeabilidad intestinal de determinadas toxinas marinas y de agua dulce para una mejor comprensión de los efectos que pueden tener en la salud humana y animal. Con esta finalidad, el trabajo realizado se puede desglosar en los siguientes tres objetivos:

- Establecer los principales efectos citotóxicos y citomorfológicos de la palitoxina, así como determinar su permeabilidad intestinal usando un modelo *in vitro* de células intestinales humanas, Caco-2.
- Comparar la potencia tóxica y efectos celulares del ácido okadaico y sus análogos dinofisistoxina 1 y dinofisistoxina 2 en modelos intestinales humanos. Evaluar, en base a estudios *in vitro*, la toxicidad oral de estos compuestos.
- Estudiar los mecanismos de citotoxicidad intestinal y hepática de la toxina de agua dulce cilindrospermopsina y determinar su paso a través del epitelio intestinal.





3. PUBLICACIONES



3. PUBLICACIONES

En esta sección se recopilan los resultados de la presente tesis doctoral así como la descripción de la metodología seguida para realizar los experimentos pertinentes y las discusiones correspondientes, todo ello englobado en los siguientes artículos publicados en revistas internacionales:

- ***The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (Caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity*** (*FEBS Journal*, 2013, Volume 280, Issue 16, Pages 3906-3919) <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12390>
- ***Experimental Basis for the High Oral Toxicity of Dinophysistoxin 1: A Comparative Study of DSP*** (*Toxins*, 2014, Volume 6, Issue 1, Pages 211-228) <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6010211>
- ***Evaluation of the intestinal permeability and cytotoxic effects of cylindrospermopsin*** (*Toxicon*, 2014, Volume 91, Pages 23-34) <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.08.072>



The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (Caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity

Diego A. Fernández, M. Carmen Louzao, Natalia Vilariño, Begoña Espiña, María Fraga, Mercedes R. Vieytes, Albina Román, Mark Poli y Luis M. Botana

Abstract: Palytoxin is one of the most toxic marine toxins known. Distributed worldwide, it poses a potential human health risk linked to the consumption of contaminated seafood. Despite its high parenteral toxicity, the lethal oral dose of palytoxin is several times higher than the intraperitoneal lethal dose. In the present study, we investigated the passage of palytoxin through the human intestinal barrier by employing a well-characterized and accepted *in vitro* model of intestinal permeability that uses differentiated Caco-2 cell monolayers. Trans-epithelial electric resistance measurements showed that palytoxin disrupts the integrity of Caco-2 monolayers at concentrations > 0.135 nM. However, confocal microscopy imaging showed that the tight-junction protein occludin was not affected by palytoxin in the nanomolar range. This finding was supported by transmission electron microscopy imaging, where tight-junctions appeared to be unaffected by palytoxin treatment. In addition, the nuclear envelope does not appear to be altered by high concentrations of palytoxin. However, palytoxin-treated cells showed electron-dense and damaged mitochondria. Toxin exposure also induced the disappearance of the differentiated Caco-2 microvilli and organelles, as well as chromatin decondensation. Permeability assays showed that palytoxin could not significantly pass the Caco-2 monolayer, despite the lack of epithelium integrity, suggesting that palytoxins would be poorly transported to blood, which may explain its lower oral toxicity. These data can help to achieve a better understanding of palytoxin poisoning. However, more studies regarding its repeated administration and chronic effects are needed.

Los efectos cinéticos, mecánicos y citomorfológicos de la palitoxina en células intestinales humanas (Caco-2) explican su menor toxicidad oral que parenteral

Resumen: La palitoxina es una de las toxinas marinas conocidas más tóxicas. Está distribuida por todo el mundo y supone un riesgo potencial para la salud humana ligado al consumo de marisco contaminado. A pesar de su alta toxicidad parenteral, la dosis letal de palitoxina por vía oral es varias veces más alta que la dosis letal intraperitoneal. En el presente estudio hemos investigado el paso de palitoxina a través de la barrera intestinal humana utilizando un método de permeabilidad intestinal *in vitro* bien caracterizado y aceptado que emplea monocapas de células Caco-2 diferenciadas. Las medidas de resistencia eléctrica transepitelial mostraron que la palitoxina destruye la integridad de la monocapa de Caco-2 a concentraciones > 0.135 nM. Sin embargo, las imágenes de microscopía confocal revelaron que la proteína de las uniones estrechas occludina no estaba afectada por concentraciones de palitoxina en el rango nanomolar. Este hallazgo se confirmó con las imágenes de microscopía electrónica de transmisión en las que las uniones estrechas no parecían estar afectadas por el tratamiento con palitoxina. Además, la envuelta nuclear tampoco parecía estar alterada incluso con las concentraciones más altas de palitoxina. Sin embargo, las células tratadas con palitoxina mostraron mitocondrias electrodensas y dañadas. La exposición a la toxina también indujo la desaparición de las microvellosidades y orgánulos, así como la descondensación de la cromatina en las células Caco-2 diferenciadas. Los ensayos de permeabilidad mostraron que la palitoxina no pudo traspasar de manera significativa la monocapa de Caco-2, a pesar de la falta de integridad del epitelio, sugiriendo que el transporte de las palitoxinas al torrente sanguíneo sería reducido lo que puede explicar su menor toxicidad oral. Estos datos nos ayudan a entender mejor la intoxicación por palitoxina. Sin embargo, se necesitan más estudios sobre administraciones continuadas y efectos crónicos.



Experimental Basis for the High Oral Toxicity of Dinophysistoxin 1: A Comparative Study of DSP

Diego A. Fernández, M. Carmen Louzao, María Fraga, Natalia Vilariño, Mercedes R. Vieytes y Luis M. Botana

Abstract: Okadaic acid (OA) and its analogues, dinophysistoxin 1 (DTX1) and dinophysistoxin 2 (DTX2), are lipophilic and heat-stable marine toxins produced by dinoflagellates, which can accumulate in filter-feeding bivalves. These toxins cause diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in humans shortly after the ingestion of contaminated seafood. Studies carried out in mice indicated that DSP poisons are toxic towards experimental animals with a lethal oral dose 2–10 times higher than the intraperitoneal (i.p.) lethal dose. The focus of this work was to study the absorption of OA, DTX1 and DTX2 through the human gut barrier using differentiated Caco-2 cells. Furthermore, we compared cytotoxicity parameters. Our data revealed that cellular viability was not compromised by toxin concentrations up to 1 μM for 72 h. Okadaic acid and DTX2 induced no significant damage; nevertheless, DTX1 was able to disrupt the integrity of Caco-2 monolayers at concentrations above 50 nM. In addition, confocal microscopy imaging confirmed that the tight-junction protein, occludin, was affected by DTX1. Permeability assays revealed that only DTX1 was able to significantly cross the intestinal epithelium at concentrations above 100 nM. These data suggest a higher oral toxicity of DTX1 compared to OA and DTX2.

Bases experimentales para la mayor toxicidad oral de Dinofisistoxina-1: Estudio comparativo de DSP

Resumen: El ácido okadaico (OA) y sus análogos, dinofisistoxina 1 (DTX1) y dinofisistoxina 2 (DTX2), son toxinas marinas lipofílicas y termoestables producidas por dinoflagelados que se pueden acumular en bivalvos filtradores. Estas toxinas causan intoxicaciones diarreicas (DSP) en humanos poco después de la ingestión de marisco contaminado. Los estudios realizados en ratones indican que las DSP son tóxicas para los animales de experimentación con dosis orales letales de 2 a 10 veces más altas que la dosis letal intraperitoneal (i.p.). El objetivo de este trabajo fue estudiar la absorción de OA, DTX1 y DTX2 a través de la barrera intestinal humana usando células Caco-2 diferenciadas. Además, comparamos los parámetros de citotoxicidad. Nuestros datos revelaron que la viabilidad no se alteraba con concentraciones de toxina hasta 1 μM durante 72 h. El ácido okadaico y la DTX2 no indujeron un daño significativo, no obstante, la DTX1 alteró la integridad de las monocapas de Caco-2 a concentraciones superiores a 50 nM. Además, las imágenes de microscopía confocal confirmaron que la ocludina, una de las proteínas de las uniones estrechas, estaba afectada por la DTX1. Los estudios de permeabilidad revelaron que solo la DTX1 fue capaz de traspasar el epitelio intestinal de manera significativa a concentraciones superiores a 100 nM. Estos datos sugieren que la DTX1 presenta una toxicidad oral mayor que el OA y DTX2.



Evaluation of the intestinal permeability and cytotoxic effects of cylindrospermopsin

Diego A. Fernández, M. Carmen Louzao, Natalia Vilariño, María Fraga, Begoña Espiña, Mercedes R. Vieytes y Luis M. Botana

Abstract: Cylindrospermopsin is a freshwater and widespread cyanotoxin considered hazardous for human health. Climate change and eutrophication are the main factors influencing the increasing presence of cylindrospermopsin producers that can contaminate human and animal drinking waters, leading to a rise in ecological and human risk. In order to reach the bloodstream and thus the target receptor, an orally administered drug must first cross the intestinal barrier. The goal of this study was to examine the cylindrospermopsin intestinal permeability and its cellular effects on intestinal and hepatic cells. We explored the human intestinal permeability of cylindrospermopsin by performing *in vitro* permeation studies across the Caco-2 cell monolayer. Cell permeability data indicated a limited passage of the toxin through the intact intestinal epithelium in a time and concentration dependent way. Cylindrospermopsin induced neither damage on the integrity of the monolayer nor cytotoxicity in tests performed with Caco-2 even at micromolar concentration. Opposite, when hepatic Clone 9 cells were exposed to cylindrospermopsin, a noticeable cytotoxicity was observed being more marked at the higher concentrations used. In addition, this cell line showed alterations in reduced glutathione content due to cylindrospermopsin over time. Meanwhile glutamate cysteine ligase levels, the first rate-limiting enzyme of the glutathione route, showed a significant increase. Therefore our results indicate that cylindrospermopsin cytotoxicity is unrelated to protein inhibition or a decrease of reduced glutathione levels in Clone 9 cells.

Análisis de la permeabilidad intestinal y efectos citotóxicos de la cilindrospermopsina

Resumen: La cilindrospermopsina es una cianotoxina de agua dulce muy extendida y considerada peligrosa para la salud humana. El cambio climático y la eutrofización son los factores principales que influyen en la frecuente aparición de los productores de cilindrospermopsina que pueden contaminar el agua de bebida destinada tanto a personas como a animales, llevando a un aumento del riesgo ecológico y para las personas. Un fármaco administrado por la vía oral debe traspasar primero la barrera intestinal para llegar al torrente sanguíneo y por lo tanto a su receptor. El objetivo de este estudio fue examinar la permeabilidad intestinal de la cilindrospermopsina y sus efectos en células intestinales y hepáticas. Estudiamos la absorción intestinal de la cilindrospermopsina en el hombre, para ello desarrollamos un método *in vitro* basado en el estudio de la permeabilidad a través de monocapas de células Caco-2. Los datos de permeabilidad celular indicaron un paso limitado de toxina a través del epitelio intestinal intacto dependiente del tiempo y la concentración. La cilindrospermopsina no alteró la integridad de la monocapa ni provocó efectos citotóxicos en Caco-2 incluso a concentraciones micromolares. Al contrario, cuando las células hepáticas Clone 9 se expusieron a la cilindrospermopsina se observaron efectos citotóxicos apreciables, sobre todo con las concentraciones más altas. Además, en esta línea celular se observó que la cilindrospermopsina provocaba alteraciones en el contenido de glutatión reducido a lo largo del tiempo. Mientras que los niveles de la glutamato cisteína ligasa, la primera enzima limitante de la ruta del glutatión, mostraron un aumento significativo. Por tanto, nuestros resultados indican que la citotoxicidad producida por cilindrospermopsina en células Clone 9 no está relacionada con una inhibición de proteínas o un descenso de los niveles de glutatión.





4. DISCUSIÓN



4. DISCUSIÓN

La aparición cada vez más frecuente de toxinas marinas y de agua dulce en zonas del planeta en las cuales no se habían descrito episodios tóxicos anteriormente, hace necesario un profundo estudio de su impacto medioambiental, socioeconómico y sanitario [11,12,337].

La palitoxina (PLTX) descubierta en aguas de Hawái y Japón [22,23] se ha extendido por todo el mundo y se considera una toxina emergente en las costas mediterráneas de Francia, Italia, Grecia o España [24-28]. Las intoxicaciones debidas al consumo de sardinas o cangrejos con PLTX provocan en el hombre síntomas muy variados abarcando desde mialgia y debilidad a náuseas o vómitos [21,67], incluso algunas han llegado a ser letales [23,33,34]. La ingestión de moluscos que han acumulado toxinas DSP [85,115,191] produce alteraciones gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal principalmente), sin embargo, a pesar de su frecuente aparición y de su amplia distribución no se han registrado intoxicaciones mortales [102,192].

También existen casos de intoxicaciones debidas a la ingestión de agua contaminada. Diversos factores que van desde el cambio climático hasta la capacidad de adaptación a nuevos hábitats, han permitido la extensión de los microorganismos productores de toxinas a lagos, ríos, pantanos, depósitos y presas [226,251,338]. Una toxina cada vez más frecuente en agua dulce es la cilindrospermopsina (CYN) cuyo órgano diana es el hígado, aunque también puede afectar a riñones, pulmón, corazón o intestino [221,242-245]. Provoca

síntomas que van desde malestar general, vómitos y dolor abdominal hasta diarreas, deshidratación, y fallo hepático.

Debido al riesgo para la salud humana que supone la aparición de estas toxinas en el alimento, la Unión Europea a través del Reglamento (EC) N° 853/2004, establece que el nivel máximo de toxinas lipofílicas (OA y DTXs) en moluscos bivalvos es de 160 µg de equivalentes de OA/Kg de vianda [200]. La Autoridad Europea de seguridad Alimentaria, EFSA (del inglés European Food and Safety Authority) también ha sugerido unos límites de 30 µg/Kg de carne de marisco para la mezcla de PLTX y uno de sus análogos, la ostreocina-D [28,192]. En base a estudios toxicológicos en ratón, para la CYN se ha propuesto una concentración máxima de 1 µg/L de CYN en agua de bebida [261]. Sin embargo todavía se necesitan datos precisos y fiables para establecer unos límites seguros.

Las principales vías de exposición a las toxinas marinas y de agua dulce son la ingestión del alimento y/o agua contaminada sin un tratamiento adecuado. La absorción intestinal es una etapa determinante ya que va a ser la responsable de la cantidad de toxina que llegue al torrente sanguíneo y ejerza su efecto tóxico. Con esta premisa en la presente tesis doctoral se ha estudiado la permeabilidad intestinal de la PLTX, de las toxinas DSP: OA, DTX-1, DTX-2 y de la toxina de agua dulce CYN así como los efectos que ejercen sobre los enterocitos, utilizando para ello las células Caco-2 como modelo *in vitro* de epitelio intestinal.

Los resultados obtenidos revelaron que en células intestinales Caco-2 diferenciadas, la PLTX ejerce un efecto citotóxico que conduce a una reducción

dosis/tiempo dependiente del metabolismo celular y por tanto de la viabilidad con concentraciones superiores a 13.5 nM después de 10 h de incubación o 1.35 nM transcurridas 24 h. Estas alteraciones en las monocapas celulares corroboran las lesiones descritas en estudios *in vivo* en ratones dónde se observaba erosión y edema en el intestino delgado después de administraciones intratraqueales y orales de PLTX [81].

Además, en nuestros estudios, las imágenes de microscopía electrónica de transmisión permitieron apreciar que el primer signo visible de lesión celular tras el tratamiento con PLTX era la presencia de mitocondrias electrodensas incluso a concentraciones de toxina que no rompían la monocapa celular, ni descendían la viabilidad celular. Esta alteración en las mitocondrias puede ser debida a la acumulación de iones provocada por la toxina ya que el desequilibrio electrolítico es una de las principales causas de daño mitocondrial [339]. La PLTX al inhibir a la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa y transformarla en un poro no selectivo, permite un transporte pasivo de iones modificando el gradiente iónico normal [339-341]. La cadena de acontecimientos que la PLTX genera en la célula comienza por una modificación de la permeabilidad de membrana que a su vez produce una despolarización y una entrada de iones incluyendo Ca^{2+} hacia el interior celular [66]. Los efectos de todo esto serían los cambios citomorfológicos y de desensamblaje de la F-actina [64], que a su vez explicarían la destrucción del microvilli y de los orgánulos del citoplasma que observamos en los tratamientos a las concentraciones más altas; estructuras tales como la envuelta nuclear o los desmosomas entre células todavía permanecen visibles a estas concentraciones.

En el estudio de la evaluación de la permeabilidad a la PLTX se obtuvo una significativa reducción de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) [342] dosis/tiempo dependiente. La medida del TEER es una práctica común en los experimentos de permeabilidad y básicamente permite conocer el movimiento iónico por la vía paracelular. Una reducción en el TEER indica una alteración en la estabilidad e integridad de la monocapa e incluso puede reflejar una expresión temprana de lesión celular. Este efecto se relaciona con alteraciones en el estado fisiológico de las uniones estrechas entre células [343]. Estas uniones estrechas, en estado normal impiden el paso descontrolado de moléculas (sobre todo hidrofílicas) a través del espacio intercelular [344]. Una de las principales proteínas que forman las uniones estrechas y por tanto que regula este paso de sustancias por la vía paracelular es la ocludina [345-347]. Sorprendentemente, las imágenes de microscopía confocal de células Caco-2 mostraron que la distribución de esta proteína no se veía afectada por ninguno de los tratamientos con PLTX, incluso con concentraciones de 270 nM.

Por lo tanto la PLTX no afecta a la integridad de las uniones estrechas y el descenso del TEER puede ser debido a daños en la membrana plasmática de las células Caco-2 como ya habían postulado Lindgren y colaboradores en un estudio con ciertos péptidos (penetratin, transportan y transportan 10) que aumentan el flujo paracelular de iones a través de la monocapa celular [348]. El desprendimiento del sustrato de la monocapa de Caco-2 desencadenado por la PLTX sugiere que esta toxina actúa sobre el citoesqueleto de actina como se ha descrito en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio [63,64,349-351]. La PLTX despolimeriza los microfilamentos de actina y una de las zonas de la membrana plasmática donde alcanzan mayor concentración es

precisamente en los sitios de adhesión al sustrato [352]. La acción específica de la PLTX sobre el citoesqueleto de actina explicaría la permanencia de los desmosomas, descrita anteriormente, en células extremadamente dañadas ya que éstos están formados principalmente por filamentos intermedios y no por microtúbulos ni por microfilamentos de actina [353].

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral han puesto de manifiesto que la PLTX no es capaz de traspasar de manera significativa el epitelio intestinal, incluso a concentraciones que afectan a la integridad de la monocapa. La mayor parte de la toxina permanecería en la zona apical (lumen intestinal) y casi no se detectaría a nivel de la membrana basolateral (en contacto con los vasos sanguíneos) o en el interior celular. Nuestros datos explicarían los resultados obtenidos en los experimentos realizados por Ito y colaboradores [81] en los que no se observaron casos de muerte en ratones que habían sido tratados oralmente con 200 µg/kg de PLTX. Tampoco se detectó un aumento de la absorción de la toxina; incluso usando componentes lipídicos en el vehículo donde iba disuelta la PLTX o ratones con úlceras en el tejido gastrointestinal. Sin embargo, la administración intratraqueal de la toxina hacía que los ratones muriesen con dosis de tan solo 2 µg/kg mostrando mayor toxicidad.

Sosa y colaboradores [77] demostraron que la potencia oral de la PLTX (DL₅₀ de 767 µg/kg) en ratones era tres veces menor que la intraperitoneal. Esto sugiere que la toxina no tiene una buena absorción intestinal y que se necesitan grandes cantidades de la misma para que llegue al torrente sanguíneo. Factores como el grado de biodisponibilidad de la toxina e incluso a

la naturaleza hidrofílica de esta sustancia unido a su gran tamaño molecular contribuirían a ello. Nuestros datos explican la diferencia que existe en los experimentos *in vivo* entre las dosis letales intraperitoneal, intratraqueal e intravenosa respecto a la oral [78-83] confirmando a esta última vía como menos tóxica que las anteriores [35,77].

Todos estos resultados se recogen en el artículo titulado ***“The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (Caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity”*** (*FEBS Journal*, 2013, Volume 280, Issue 16, Pages 3906-3919) <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12390> [354,355].

Las toxinas diarreicas (DSP), en contraposición a la PLTX que se considera una toxina marina emergente, son los compuestos causantes de las intoxicaciones alimentarias que aparecen con más frecuencia en las costas Españolas.

Al contrario de lo que sucede con la PLTX, ni el ácido Okadaico (OA) ni las Dinofisistoxinas 1 y 2 (DTX-1 y DTX-2) mostraron un efecto citotóxico, registrado como alteraciones en el metabolismo celular, en las células Caco-2 diferenciadas. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Tripuraneni y colaboradores en células T84 (células de colon como las Caco-2) tratadas con OA [143] y con los de Ehlers y colaboradores [336] que revelan que la viabilidad de células Caco-2 tras 24 h de incubación con 500 nM de OA no se veía reducida de manera significativa. En nuestro ensayos, tampoco se registraron indicios de apoptosis en los tratamientos con las toxinas durante 24 h.

A pesar de que no se detecta citotoxicidad con DTX-1, esta toxina fue capaz de reducir los valores de TEER de manera significativa (un 70% respecto al control al cabo de 24 h con un tratamiento de 100 nM) indicando una clara alteración de la integridad de la monocapa que no se observa con DTX-2 ni OA. En estudios previos se vio que el OA no causa ningún tipo de descenso en el TEER con tratamientos de hasta 200 nM durante 24 h [336]. Tripuraneni y colaboradores demostraron que la integridad de la monocapa solo se ve afectada a concentraciones superiores a 600 nM de OA [143]. La alteración del TEER no implica necesariamente toxicidad celular como se demostró en los ensayos de Okada y colaboradores [335] en los que a pesar de la reducción rápida del TEER en Caco-2 con 1 y 2 μ M de OA no se evidenciaron signos de pérdida de viabilidad celular. Estos resultados coinciden con las observaciones *in vivo* en las que la ultraestructura del intestino de los ratones aparecía dañada tras la administración oral de OA, sin embargo al cabo de 24 h estaba reparada [356]. Datos que se confirmaban en un estudio *in vivo* con ratones realizado en el Departamento de Farmacología de Lugo, que indicaba que transcurridas 24 horas de un tratamiento por vía oral con 1000 μ g/kg de OA, el intestino delgado no presentaba una clara alteración estructural según reflejaban las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) obtenidas [357].

En el caso de la DTX-1 y al contrario de lo que ocurre con la PLTX, la reducción del TEER en Caco-2 probablemente se deba a alteraciones en las uniones estrechas de la vía paracelular como muestran las imágenes de microscopía confocal. En ellas se aprecia que la ocludina en los tratamientos con DTX-1 100 nM aparece más fragmentada, a veces en vesículas y menos

uniforme en comparación con los controles o los tratamientos con OA y DTX-2. *A priori*, estas toxinas afectarían a la permeabilidad paracelular inhibiendo a las proteína fosfatasa PP1 y PP2A, enzimas clave en los procesos de fosforilación y desfosforilación de los componentes de las uniones estrechas, sobre todo de la ocludina, [358-360]. No obstante, ya se ha descrito la alteración del citoesqueleto de actina por parte del OA (estructura fundamental para la estabilidad mecánica e integridad de las células epiteliales) en diversos experimentos *in vitro* [145,335,361-363]. Por tanto el desprendimiento de las células del sustrato provocado por DTX-1, el descenso de los valores de TEER en la monocapa de Caco-2 y también el aumento de la permeabilidad intestinal se podrían explicar por una destrucción del citoesqueleto de actina.

Como ya se ha mencionado en la introducción de este trabajo de investigación, los datos de toxicidad oral de las toxinas DSP son escasos y controvertidos existiendo mucha variedad entre estudios realizados por diferentes investigadores [177,194,196-199].

En la presente tesis doctoral se realizó un estudio comparativo de la permeabilidad de las células Caco-2 al OA, DTX-1 y DTX-2. El OA y la DTX-2 no fueron capaces de pasar al compartimento basolateral de manera significativa. En concordancia con esto, un estudio en el que también se investigaba el paso del OA usando monocapas de Caco-2 determinó que la permeabilidad intestinal de esta toxina era muy baja [336]. Sin embargo, nuestros resultados de permeabilidad revelaron que, al contrario que el OA y la DTX-2, la cantidad de DTX-1 se va incrementando en el compartimento basolateral de manera paralela al descenso del TEER anteriormente

mencionado especialmente tras 24 h de incubación. Teniendo en cuenta la potencia inhibitoria de las DSP sobre las PP [116,117,135-141,192], los resultados obtenidos podrían sugerir una relación entre la permeabilidad intestinal de la DTX-1 y su potencia inhibitoria sobre PP2A. Sin embargo, la toxicidad de estos compuestos es compleja y diversos autores apuntan a que sus efectos no se pueden explicar exclusivamente por su acción sobre las PP [134,145].

Teniendo en cuenta todo esto, el estudio comparativo realizado en el presente trabajo de investigación apunta a que el proceso diarreico desencadenado por las toxinas DSP se debe a las alteraciones en las uniones estrechas entre células unido a su acción inhibitoria sobre las PP. Además no hay que olvidar su efecto sobre la ultraestructura del citoesqueleto de actina, que también se había observado con las PLTX, y que la potencia a nivel intestinal de la DTX-1 es mayor que la de las otras toxinas DSP. Esta potencia intestinal constituye una evidencia más de la superior toxicidad oral de la DTX-1 frente al OA o a DTX-2 y supone una base experimental para sugerir la revisión de los actuales factores de equivalencia tóxica (TEFs) establecidos por la EFSA que actualmente otorgan la misma potencia tóxica al OA que a la DTX-1 en función de la toxicidad i.p. y asumiendo un mecanismo de acción común [192].

Todos estos resultados se recopilan en el artículo "***Experimental Basis for the High Oral Toxicity of Dinophysistoxin 1: A Comparative Study of DSP***" (Toxins, 2014, Volume 6, Issue 1, Pages 211-228) <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6010211> [364].

Las toxinas presentes en agua dulce también representan un importante riesgo sanitario. Comparada con otras toxinas, la clindrospermopsina (CYN) se libera en cantidades elevadas al espacio extracelular favoreciendo su ingestión tanto por el hombre como por los animales a través del agua de bebida [231,232,248,365]. Sin embargo, la carencia de datos precisos sobre su toxicidad oral dificulta el establecimiento de unos límites adecuados. En diversos trabajos se observó que la CYN podría tener efectos sobre células de origen animal y humano [250,251,365,366]. A pesar de ello, los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, tal y como ocurría con OA y DTXs, indican una ausencia de efecto citotóxico de la CYN sobre células Caco-2 diferenciadas incluso con tratamientos de 10 μ M durante 72 h. Estos datos coinciden con estudios previos en los que las células intestinales son las menos sensibles al efecto de la CYN [282]. A diferencia de toxinas como PLTX, OA o DTX-2, la CYN si mostró una cierta permeabilidad intestinal dosis/tiempo dependiente. Cerca de un 16-20% de la CYN inicial pasó a través de la monocapa de Caco-2 tras 24 h de incubación, lo que significa que se necesita una cantidad de toxina relativamente grande para que ésta alcance el torrente sanguíneo desde el intestino y se desencadenen efectos tóxicos. Estas conclusiones estarían en consonancia con los estudios de toxicidad *in vivo* en los que se establece que la DL₅₀ por vía oral de la CYN es de 10 a 20 veces más grande que la vía i.p. [222,237,243,255,256]. Sin embargo, el mecanismo de captación de CYN por parte de las células no se conoce con exactitud por lo que se requieren más trabajos de investigación para dilucidarlo.

La baja permeabilidad de la CYN podría ser debida a su relativamente bajo peso molecular (415 Da) y sobre todo a su carácter extremadamente hidrofílico

que no le permite atravesar la membrana celular con facilidad y por lo tanto se vería obligada a penetrar con ayuda de transportadores de membrana o por difusión pasiva mediante la vía paracelular [367,368]. Por otro lado, en los tratamientos realizados no se aprecian modificaciones en las uniones estrechas entre células ya que no se detectan descensos en el TEER, descartando alteraciones en la estabilidad o en la integridad de la monocapa de células Caco-2.

Algunos autores han descrito a la CYN como una hepatotoxina [242]. De acuerdo con esto, en la presente tesis doctoral, se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad en células Clone 9. Clone 9 es una línea celular hepática procedente de células epiteliales normales de hígado de rata de la especie *Rattus norvegicus*. Los estudios de citotoxicidad mostraron que, al contrario de lo que ocurría con las células intestinales Caco-2, la viabilidad de las células Clone 9 si se veía disminuida por la acción de la CYN con valores de IC₅₀ 1,1-1,9 µM. Las líneas celulares hepáticas son más sensibles que las de otros órganos, siendo las Caco-2 una de las menos sensibles a la acción tóxica de la CYN confirmando nuestros resultados [239,282,283,367-370]. Además, estudios previos indican que los cultivos celulares primarios de hepatocitos son más susceptibles a los efectos citotóxicos que las líneas celulares hepáticas establecidas debido a su mayor actividad metabólica [242,367]. Se refuerza entonces la hipótesis de que la bioactivación y por tanto los metabolitos de la CYN pueden contribuir al efecto citotóxico *in vivo* [239,240,371].

La toxicología de la CYN es compleja. Uno de los mecanismos de acción propuestos para esta toxina ha sido la inhibición de síntesis de proteínas en

cultivos primarios hepáticos [237,238,372]. También se ha descrito que la CYN afecta a la síntesis de glutatión, inhibiéndola incluso antes de producir citotoxicidad tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* [240,241,373]. La molécula de glutatión en su forma reducida (GSH) protege del estrés oxidativo amortiguando a las especies reactivas de oxígeno (ROS) que aparecen cuando las células sufren algún tipo de daño. En nuestros experimentos con células Clone 9, los niveles de GSH no solo no se redujeron sino que incluso aumentaron de manera gradual tras el tratamiento con CYN, coincidiendo con el comportamiento descrito en un estudio reciente en células Caco-2 [286]. Esto nos lleva a postular que la subida de los niveles de GSH se debe a mecanismos de protección de la célula para intentar minimizar el daño que sufre por acción de la CYN.

La glutamato cisteína ligasa (GCL) es una de las enzimas clave en la ruta de la síntesis del GSH celular ya que cataliza la primera reacción limitante de dicha ruta [374,375]. En nuestro trabajo, el estudio de la expresión de la subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa (GCLC) en Clone 9 reveló que los niveles de GCLC aumentaban de manera significativa con el tratamiento más alto de CYN (5 μ M) dando una posible explicación al aumento de la síntesis de GSH. También en esta misma línea celular pudimos observar que los niveles de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) estaban aumentados, esto sería consistente con una lesión en el ADN como postularon recientemente Busu *et al* [376]. Se detectó también un incremento progresivo de β -tubulina en el tratamiento de las células con CYN que ya había sido descrito previamente y que puede causar alteraciones mitóticas [377,378].

Por tanto, nuestros datos indican que al menos en este tipo celular hepático, Clone 9, los mecanismos de citotoxicidad de la CYN no están mediados ni por la inhibición de síntesis de proteínas ni por el descenso de los niveles de GSH. Por el contrario, el tratamiento con CYN provoca que las células hepáticas aumenten sus niveles de GSH con un efecto citoprotector.

Los resultados de toda esta investigación sobre la CYN se recopilan en el artículo *“Evaluation of the intestinal permeability and cytotoxic effects of cylindrospermopsin”* (Toxicol, 2014, Volume 91, Pages 23-34) <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.2014.08.072> [379].







5. CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

De los trabajos contenidos en la presente tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1) La PLTX ejerce un efecto citotóxico dosis-dependiente en células intestinales Caco-2 diferenciadas.
- 2) La PLTX tiene una menor toxicidad por vía oral que por otras vías de administración debido a su baja permeabilidad intestinal.
- 3) La DTX-1 tiene mayor potencia citotóxica que el OA o la DTX-2.
- 4) La DTX-1 atraviesa la monocapa de células Caco-2 lo que favorece su toxicidad oral.
- 5) La toxicidad de la CYN en la línea celular hepática Clone 9 no está relacionado con una inhibición de la síntesis de proteínas o una reducción de los niveles de GSH.
- 6) La CYN tiene una permeabilidad intestinal moderada.





6. BIBLIOGRAFÍA



6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hallegraeff, G., Harmful algal blooms: A global overview. In *Manual on harmful marine microalgae*, Cembella, A., Ed. UNESCO: Paris, 2003; pp 25-49.
- [2] Maso, M.; Garces, E., Harmful microalgae blooms (hab); problematic and conditions that induce them. *Mar Pollut Bull* **2006**, *53*, 620-630.
- [3] Sellner, K.G.; Doucette, G.J.; Kirkpatrick, G.J., Harmful algal blooms: Causes, impacts and detection. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **2003**, *30*, 383-406.
- [4] Van Dolah, F.M., Diversity of marine and freshwater algal toxins. In *Seafood toxicology pharmacology, physiology and detection*, Botana, L.M., Ed. Marcel Dekker: New York, 2000; pp 19-43.
- [5] Mitra, A.; Flynn, K.J., Promotion of harmful algal blooms by zooplankton predatory activity. *Biology letters* **2006**, *2*, 194-197.
- [6] Paul, V.J.; Puglisi, M.P.; Ritson-Williams, R., Marine chemical ecology. *Natural product reports* **2006**, *23*, 153-180.
- [7] Tillmann, U.; John, U.; Cembella, A., On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate alexandrium ostenfeldii against heterotrophic and autotrophic protists. *Journal of Plankton Research* **2007**, *29*, 527-543.
- [8] Prince, E.K.; Myers, T.L.; Naar, J.; Kubanek, J., Competing phytoplankton undermines allelopathy of a bloom-forming dinoflagellate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2008**, *275*, 2733-2741.
- [9] Barlaan, E.A.; Furukawa, S.; Takeuchi, K., Detection of bacteria associated with harmful algal blooms from coastal and microcosm environments using electronic microarrays. *Environmental microbiology* **2007**, *9*, 690-702.
- [10] Shimizu, Y., Microalgal metabolites: A new perspective. *Annual review of microbiology* **1996**, *50*, 431-465.
- [11] Miraglia, M.; Marvin, H.J.; Kleter, G.A.; Battilani, P.; Brera, C.; Coni, E.; Cubadda, F.; Croci, L.; De Santis, B.; Dekkers, S., *et al.*, Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on europe. *Food Chem Toxicol* **2009**, *47*, 1009-1021.
- [12] Anderson, D.M.; Cembella, A.D.; Hallegraeff, G.M., Progress in understanding harmful algal blooms: Paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annual review of marine science* **2012**, *4*, 143-176.
- [13] Otero, J.J.G., Epidemiology of marine toxins. In *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology, and detection*, 3rd ed.; Botana, L.M., Ed. CRC Press: Boca Raton, FL 33487-2742, 2014; pp 123-126.
- [14] James, K.J.; Carey, B.; O'Halloran, J.; van Pelt, F.N.; Skrabakova, Z., Shellfish toxicity: Human health implications of marine algal toxins. *Epidemiology and infection* **2010**, *138*, 927-940.
- [15] Landsberg, J.H., The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* **2002**, *10*, 113-390.
- [16] Carmichael, W.W., Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The cyanohabs". *Human and ecological risk assessment: An International Journal* **2001**, *7*, 1393-1407.
- [17] Rubiolo, J.A.; Alonso, E.; Cagide, E., Marine compounds as a starting point to drugs. In *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology, and detection*, 3rd ed.; Botana, L.M., Ed. CRC Press: 2014; pp 1141-1178.
- [18] FAO/IOC/WHO Report of the joint fao/ioc/who ad hoc expert consultation on biotoxins in bivalve molluscs ; Oslo, Norway, September 26-30, 2004.

- [19] Malo, D.; Emerson, N.B., *Hawaiian antiquities (moololo hawaii)*. 2nd ed.; Bishop Museum: Honolulu, 1951; p 278.
- [20] Wals, G.E.; Bowers, R.L., A review of hawaiian zoanthids with descriptions of three new species. *Zoological Journal of the Linnean Society* **1971**, *50*, 161-180.
- [21] Tubaro, A.; Durando, P.; Del Favero, G.; Ansaldi, F.; Icardi, G.; Deeds, J.R.; Sosa, S., Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon* **2011**, *57*, 478-495.
- [22] Kodama, A.M.; Hokama, Y.; Yasumoto, T.; Fukui, M.; Manea, S.J.; Sutherland, N., Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to decapтерus macrosoma (mackerel). *Toxicon* **1989**, *27*, 1051-1053.
- [23] Taniyama, S.; Mahmud, Y.; Terada, M.; Takatani, T.; Arakawa, O.; Noguchi, T., Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid epinephelus sp. In japan. *Journal of natural toxins* **2002**, *11*, 277-282.
- [24] Ramos, V.; Vasconcelos, V., Palytoxin and analogs: Biological and ecological effects. *Mar Drugs* **2010**, *8*, 2021-2037.
- [25] Aligizaki, K.; Katikou, P.; Milandri, A.; Diogène, J., Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon* **2011**, *57*, 390-399.
- [26] Ciminiello, P.; Dell'aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Grauso, L.; Tartaglione, L., A 4-decade-long (and still ongoing) hunt for palytoxins chemical architecture. *Toxicon* **2011**, *57*, 362-367.
- [27] Paredes, I.; Rietjens, I.M.; Vieites, J.M.; Cabado, A.G., Update of risk assessments of main marine biotoxins in the european union. *Toxicon* **2011**, *58*, 336-354.
- [28] EFSA, Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish – palytoxin group. *The EFSA Journal* **2009**, *7*, 40.
- [29] Louzao, M.C.; Espiña, B.; Cagide, E.; Ares, I.R.; Alfonso, A.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Cytotoxic effect of palytoxin on mussel. *Toxicon* **2010**, *56*, 842-847.
- [30] Malagoli, D.; Casarini, L.; Ottaviani, E., Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis. *Fish & shellfish immunology* **2008**, *24*, 180-186.
- [31] Gorbi, S.; Bocchetti, R.; Binelli, A.; Bacchiocchi, S.; Orletti, R.; Nanetti, L.; Raffaelli, F.; Vignini, A.; Accoroni, S.; Totti, C., *et al.*, Biological effects of palytoxin-like compounds from *ostreopsis cf. Ovata*: A multibiomarkers approach with mussels *mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* **2012**, *89*, 623–632.
- [32] Amzil, Z.; Sibat, M.; Chomerat, N.; Grosse, H.; Marco-Miralles, F.; Lemee, R.; Nezan, E.; Sechet, V., Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *ostreopsis cf. Ovata* blooms on the french mediterranean coast. *Mar Drugs* **2012**, *10*, 477-496.
- [33] Alcalá, A.C.; Alcalá, L.C.; Garth, J.S.; Yasumura, D.; Yasumoto, T., Human fatality due to ingestion of the crab *demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon* **1988**, *26*, 105-107.
- [34] Onuma, Y.; Satake, M.; Ukena, T.; Roux, J.; Chanteau, S.; Rasolofonirina, N.; Ratsimaloto, M.; Naoki, H.; Yasumoto, T., Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* **1999**, *37*, 55-65.
- [35] Deeds, J.R.; Schwartz, M.D., Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon* **2010**, *56*, 150-162.
- [36] Aligizaki, K.; Katikou, P.; Nikolaidis, G.; Panou, A., First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *ostreopsis* species (aegean sea, greece). *Toxicon* **2008**, *51*, 418-427.

- [37] Moore, R.E.; Scheuer, P.J., Palytoxin: A new marine toxin from a coelenterate. *Science* **1971**, *172*, 495-498.
- [38] Kimura, S.; Hashimoto, Y.; Yamazato, K., Toxicity of the zoanthid palythoa tuberculosa. *Toxicon* **1972**, *10*, 611-617.
- [39] Quinn, R.J.; Kashiwagi, M.; Moore, R.E.; Norton, T.R., Anticancer activity of zoanthids and the associated toxin, palytoxin, against ehrlich ascites tumor and p-388 lymphocytic leukemia in mice. *J Pharm Sci* **1974**, *63*, 257-260.
- [40] Beress, L.; Zwick, J.; Kolkenbrock, H.J.; Kaul, P.N.; Wassermann, O., A method for the isolation of the caribbean palytoxin (c-ptx) from the coelenterate (zoanthid) palythoa caribaeorum. *Toxicon* **1983**, *21*, 285-290.
- [41] Moore, R.E.; Bartolini, G., Structure of palytoxin. *J Am Chem Soc* **1981**, *103*, 2491-2494.
- [42] Moore, R.E.; Woolard, F.X.; Bartolini, G., Periodate oxidation of n-(p-bromobenzoyl)palytoxin. *J Am Chem Soc* **1980**, *102*, 7370-7372.
- [43] Oku, N.; Sata, N.U.; Matsunaga, S.; Uchida, H.; Fusetani, N., Identification of palytoxin as a principle which causes morphological changes in rat 3y1 cells in the zoanthid palythoa aff. Margaritae. *Toxicon* **2004**, *43*, 21-25.
- [44] Deeds, J.R.; Handy, S.M.; White, K.D.; Reimer, J.D., Palytoxin found in palythoa sp. Zoanthids (anthozoa, hexacorallia) sold in the home aquarium trade. *PLoS One* **2011**, *6*, e18235.
- [45] Moore, R.; Helfrich, P.; Patterson, G., The deadly seaweed of hana. *Oceanus* **1982**, *25*, 54-63.
- [46] Carballeira, N.M.; Emiliano, A.; Sostre, A.; Restituyo, J.A.; González, I.M.; Colon, G.M.; Tosteson, C.G.; Tosteson, T.R., Fatty acid composition of bacteria associated with the toxic dinoflagellate *ostreopsis lenticularis* and with caribbean palythoa species. *Lipids* **1998**, *33*, 627-632.
- [47] Kerbrat, A.S.; Amzil, Z.; Pawlowicz, R.; Golubic, S.; Sibat, M.; Darius, H.T.; Chinain, M.; Laurent, D., First evidence of palytoxin and 42-hydroxy-palytoxin in the marine cyanobacterium *trichodesmium*. *Mar Drugs* **2011**, *9*, 543-560.
- [48] Mebs, D., Occurrence and sequestration of toxins in food chains. *Toxicon* **1998**, *36*, 1519-1522.
- [49] Gleibs, S.; Mebs, D., Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon* **1999**, *37*, 1521-1527.
- [50] Usami, M.; Satake, M.; Ishida, S.; Inoue, A.; Kan, Y.; Yasumoto, T., Palytoxin analogs from the dinoflagellate *ostreopsis siamensis*. *J Am Chem Soc* **1995**, *117*, 5389-5390.
- [51] Ukena, T.; Satake, M.; Usami, M.; Oshima, Y.; Naoki, H.; Fujita, T.; Kan, Y.; Yasumoto, T., Structure elucidation of ostreocin d, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *ostreopsis siamensis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2001**, *65*, 2585-2588.
- [52] Taniyama, S.; Arakawa, O.; Terada, M.; Nishio, S.; Takatani, T.; Mahmud, Y.; Noguchi, T., *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (ptx) in parrotfish *scarus ovifrons*. *Toxicon* **2003**, *42*, 29-33.
- [53] Lenoir, S.; Ten-Hage, L.; Turquet, J.; Quod, J.-P.; Bernard, C.; Hennion, M.-C., First evidence of palytoxin analogues from an *ostreopsis mascarenensis* (dinophyceae) benthic bloom in southwestern indian ocean. *Journal of Phycology* **2004**, *40*, 1042-1051.
- [54] Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, G.S.; Tartaglione, L.; Grillo, C.; Melchiorre, N., The genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in mediterranean *ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Anal Chem* **2006**, *78*, 6153-6159.
- [55] Riobó, P.; Paz, B.; Franco, J., Analysis of palytoxin-like in *ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *566*, 217-223.

- [56] Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L., Lc-ms of palytoxin and its analogues: State of the art and future perspectives. *Toxicon* **2011**, *57*, 376-389.
- [57] Habermann, E., Palytoxin acts through na⁺,k⁺-atpase. *Toxicon* **1989**, *27*, 1171-1187.
- [58] Habermann, E.; Chhatwal, G.S., Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1982**, *319*, 101-107.
- [59] Muramatsu, I.; Nishio, M.; Kigoshi, S.; Uemura, D., Single ionic channels induced by palytoxin in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* **1988**, *93*, 811-816.
- [60] Ikeda, M.; Mitani, K.; Ito, K., Palytoxin induces a nonselective cation channel in single ventricular cells of rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1988**, *337*, 591-593.
- [61] Bellocchi, M.; Sala, G.L.; Prandi, S., The cytolytic and cytotoxic activities of palytoxin. *Toxicon* **2011**, *57*, 449-459.
- [62] Panagiota, K.; Aristidis, V., Palytoxin and analogs: Ecobiology and origin, chemistry, and chemical analysis. In *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology, and detection*, 3rd ed.; Botana, L.M., Ed. CRC Press: Boca Raton, FL 33487-2742, 2014; pp 695-740.
- [63] Rossini, G.P.; Hess, P., Phycotoxins: Chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning. *Exs* **2010**, *100*, 65-122.
- [64] Louzao, M.C.; Ares, I.R.; Vieytes, M.R.; Valverde, I.; Vieites, J.M.; Yasumoto, T.; Botana, L.M., The cytoskeleton, a structure that is susceptible to the toxic mechanism activated by palytoxins in human excitable cells. *FEBS J* **2007**, *274*, 1991-2004.
- [65] Wattenberg, E.V., Palytoxin: Exploiting a novel skin tumor promoter to explore signal transduction and carcinogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology* **2007**, *292*, C24-32.
- [66] Wattenberg, E.V., Modulation of protein kinase signaling cascades by palytoxin. *Toxicon* **2011**, *57*, 440-448.
- [67] Tubaro, A.; Del Favero, G.; Pelin, M.; Bignami, G.; Poli, M., Palytoxin and analogues: Biological effects and detection. In *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology, and detection*, 3rd ed.; Botana, L.M., Ed. CRC Press: Boca Raton, FL 33487-2742, 2014; pp 741-772.
- [68] Gallitelli, M.; Ungaro, N.; Addante, L.M.; Procacci, V.; Silveri, N.G.; Sabba, C., Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *Jama* **2005**, *293*, 2599-2600.
- [69] Durando, P.; Ansaldi, F.; Oreste, P.; Moscatelli, P.; Marensi, L.; Grillo, C.; Gasparini, R.; Icardi, G.; Collaborative Group for the Ligurian Syndromic Algal, S., *Ostreopsis ovata* and human health: Epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-year syndromic surveillance, 2005-06, in north-west italy. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **2007**, *12*, E070607 070601.
- [70] Tichadou, L.; Glaizal, M.; Armengaud, A.; Grosse, H.; Lemee, R.; Kantin, R.; Lasalle, J.L.; Drouet, G.; Rambaud, L.; Malfait, P., *et al.*, Health impact of unicellular algae of the *ostreopsis* genus blooms in the mediterranean sea: Experience of the french mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clinical toxicology* **2010**, *48*, 839-844.
- [71] Graber, S.; Tango, M. Personal experiences with palytoxin poisoning: "Almost killed myself, wife and dogs". <http://www.advancedaquarist.com/blog/personal-experiences-with-palytoxin-poisoning-almost-killed-myself-wife-and-dogs> (25-06-2014),

- [72] Hoffmann, K.; Hermanns-Clausen, M.; Buhl, C.; Buchler, M.W.; Schemmer, P.; Mebs, D.; Kaufenstein, S., A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury. *Toxicon* **2008**, *51*, 1535-1537.
- [73] Nordt, S.P.; Wu, J.; Zahller, S.; Clark, R.F.; Cantrell, F.L., Palytoxin poisoning after dermal contact with zoanthid coral. *J Emerg Med* **2011**, *40*, 397-399.
- [74] Kermarec, F.; Dor, F.; Armengaud, A.; Charlet, F.; Kantin, R.; Sauzade, D.; De Haro, L., Health risks related to *ostreopsis ovata* in recreational waters. *ENVIRONNEMENT RISQUES & SANTE* **2008**, *7*, 357-363.
- [75] Moshirfar, M.; Khalifa, Y.M.; Espandar, L.; Mifflin, M.D., Aquarium coral keratoconjunctivitis. *Archives of ophthalmology* **2010**, *128*, 1360-1362.
- [76] Deeds, J.R.; Wiles, K.; Heideman, G.B.t.; White, K.D.; Abraham, A., First u.S. Report of shellfish harvesting closures due to confirmed okadaic acid in texas gulf coast oysters. *Toxicon* **2010**, *55*, 1138-1146.
- [77] Sosa, S.; Del Favero, G.; De Bortoli, M.; Vita, F.; Soranzo, M.R.; Beltramo, D.; Ardizzone, M.; Tubaro, A., Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. *Toxicology letters* **2009**, *191*, 253-259.
- [78] Ito, E.; Ohkusu, M.; Yasumoto, T., Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice. *Toxicon* **1996**, *34*, 643-652.
- [79] Wiles, J.S.; Vick, J.A.; Christensen, M.K., Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. *Toxicon* **1974**, *12*, 427-433.
- [80] Munday, R., Palytoxin toxicology: Animal studies. *Toxicon* **2011**, *57*, 470-477.
- [81] Ito, E.; Yasumoto, T., Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-d administered to mice by three different routes. *Toxicon* **2009**, *54*, 244-251.
- [82] Munday, R., Toxicological requirements for risk assessment of shellfish contaminants: A review. *African Journal of Marine Science* **2006**, *28*, 447-449.
- [83] Tubaro, A.; Del Favero, G.; Beltramo, D.; Ardizzone, M.; Forino, M.; De Bortoli, M.; Pelin, M.; Poli, M.; Bignami, G.; Ciminiello, P., *et al.*, Acute oral toxicity in mice of a new palytoxin analog: 42-hydroxy-palytoxin. *Toxicon* **2011**, *57*, 755-763.
- [84] EFSA-Panel, Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish – palytoxin group. *EFSA Journal* **2009**, *7*, 40.
- [85] Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Yamaguchi, M., Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the tohoku district. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* **1978**, *44*, 1249-1255.
- [86] Rhodes, L.; Towers, N.; Briggs, L.; Munday, R.; Adamson, J., Uptake of palytoxin - like compounds by shellfish fed *ostreopsis siamensis* (dinophyceae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **2002**, *36*, 631-636.
- [87] Riobó, P.; Paz, B.; Franco, J.M.; Vázquez, J.A.; Murado, M.A.; Cacho, E., Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships. *Food Chem Toxicol* **2008**, *46*, 2639-2647.
- [88] Bignami, G.S., A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon* **1993**, *31*, 817-820.
- [89] Bellocchi, M.; Ronzitti, G.; Milandri, A.; Melchiorre, N.; Grillo, C.; Poletti, R.; Yasumoto, T.; Rossini, G.P., A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line. *Anal Biochem* **2008**, *374*, 48-55.
- [90] Cañete, E.; Diogène, J., Comparative study of the use of neuroblastoma cells (neuro-2a) and neuroblastomaxglioma hybrid cells (ng108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon* **2008**, *52*, 541-550.
- [91] Ledreux, A.; Krysz, S.; Bernard, C., Suitability of the neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon* **2009**, *53*, 300-308.
- [92] Espiña, B.; Cagide, E.; Louzao, M.C.; Fernandez, M.M.; Vieytes, M.R.; Katikou, P.; Villar, A.; Jaen, D.; Maman, L.; Botana, L.M., Specific and dynamic detection of palytoxins by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells. *Biosci Rep* **2009**, *29*, 13-23.

- [93] Levine, L.; Fujiki, H.; Gjika, H.B.; Van Vunakis, H., A radioimmunoassay for palytoxin. *Toxicon* **1988**, *26*, 1115-1121.
- [94] Bignami, G.S.; Raybould, T.J.; Sachinvala, N.D.; Grothaus, P.G.; Simpson, S.B.; Lazo, C.B.; Byrnes, J.B.; Moore, R.E.; Vann, D.C., Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassays for the measurement of palytoxin in biological samples. *Toxicon* **1992**, *30*, 687-700.
- [95] Fraga, M.; Vilaríño, N.; Louzao, M.C.; Fernandez, D.A.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Detection of palytoxin-like compounds by an inhibition immunoassay using a microsphere-flow cytometry system supported by it-tof analysis. In *6th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis (RAFA)*, Institute of Chemical Technology Prague & Rikilt Wageningen UR: Prague, Czech Republic, 2013.
- [96] Penna, A.; Vila, M.; Fraga, S.; Giacobbe, M.G.; Andreoni, F.; Riobó, P.; Vernesi, C., Characterization of ostreopsis and coolia (dinophyceae) isolates in the western mediterranean sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8 s rDNA sequences. *Journal of phycology* **2005**, *41*, 212-225.
- [97] Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, S.; Santelia, F.; Tsoukatou, M., Investigation of the toxin profile of greek mussels *mytilus galloprovincialis* by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* **2006**, *47*, 174-181.
- [98] Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L.; Grillo, C.; Melchiorre, N., Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *ostreopsis ovata* collected along the ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 111-120.
- [99] Murata, M.; Shimatani, M.; Sugitani, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T., Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning [from the mussel *mytilus edulis*]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **1982**, *48*.
- [100] Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Sano, M.; Matsumoto, G.K.; Clardy, J., Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1019-1025.
- [101] Reguera, B.; Velo-Suárez, L.; Raine, R.; Park, M.G., Harmful dinophysis species: A review. *Harmful Algae* **2012**, *14*, 87-106.
- [102] Reguera, B.; Riobo, P.; Rodriguez, F.; Diaz, P.A.; Pizarro, G.; Paz, B.; Franco, J.M.; Blanco, J., Dinophysis toxins: Causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Mar Drugs* **2014**, *12*, 394-461.
- [103] Tachibana, K.; Scheuer, P.J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Gopichand, Y.; Schmitz, F.J., Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *halichondria*. *J Am Chem Soc* **1981**, *103*, 2469-2471.
- [104] Schmitz, F.J.; Prasad, R.S.; Gopichand, Y.; Hossain, M.B.; Van der Helm, D.; Schmidt, P., Acanthifolicin, a new episulfide-containing polyether carboxylic acid from extracts of the marine sponge *pandaros acanthifolium*. *J Am Chem Soc* **1981**, *103*, 2467-2469.
- [105] Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Sugawara, W.; Fukuyo, Y.; Oguri, H.; Igarashi, T.; Fujita, N., Identification of *dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* **1980**, *46*, 1405-1411.
- [106] Blanco, J.; Marino, C.; Martin, H.; Acosta, C.P., Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (dsp) toxins in the mussel *mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* **2007**, *50*, 1011-1018.
- [107] Bauder, A.G.; Cembella, A.D.; Bricelj, V.M.; Quilliam, M.A., Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *prorocentrum lima* in the bay scallop *argopecten irradians*. *Marine ecology. Progress series* **2001**, *213*, 39-52.

- [108] Pillet, S.; Pereira, A.; Braekman, J.; Houvenaghel, G., Patterns in long term accumulation of okadaic acid and dtx1 in blue mussels, *mytilus edulis*, experimentally fed with the dsp-containing alga *prorocentrum lima*. *Harmful Marine Algal Blooms* **1995**, 487-492.
- [109] McCarron, P.; Kilcoyne, J.; Hess, P., Effects of cooking and heat treatment on concentration and tissue distribution of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in mussels (*mytilus edulis*). *Toxicon* **2008**, *51*, 1081-1089.
- [110] Reboreda, A.; Lago, J.; Chapela, M.J.; Vieites, J.M.; Botana, L.M.; Alfonso, A.; Cabado, A.G., Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes. *Toxicon* **2010**, *55*, 235-243.
- [111] Murakami, Y.; Oshima, Y.; Yasumoto, T., Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *prorocentrum lima*. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* **1982**, *48*, 69-72.
- [112] Hu, T.; Doyle, J.; Jackson, D.; Marr, J.; Nixon, E.; Pleasance, S.; Quilliam, M.A.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C., Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from irish mussels. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1992**, 39-41.
- [113] Larsen, K.; Petersen, D.; Wilkins, A.L.; Samdal, I.A.; Sandvik, M.; Rundberget, T.; Goldstone, D.; Arcus, V.; Hovgaard, P.; Rise, F., *et al.*, Clarification of the c-35 stereochemistries of dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 and its consequences for binding to protein phosphatase. *Chem Res Toxicol* **2007**, *20*, 868-875.
- [114] Murata, M.; Sano, M.; Iwashita, T.; Naoki, H.; Yasumoto, T., The structure of pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins. *Agricultural and Biological Chemistry* **1986**, *50*, 2693-2695.
- [115] Dominguez, H.J.; Paz, B.; Daranas, A.H.; Norte, M.; Franco, J.M.; Fernandez, J.J., Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications. *Toxicon* **2010**, *56*, 191-217.
- [116] Hu, T.; Curtis, J.M.; Walter, J.A.; McLachlan, J.L.; Wright, J.L.C., Two new water-soluble dsp toxin derivatives from the dinoflagellate *prorocentrum maculosum*: Possible storage and excretion products. *Tetrahedron letters* **1995**, *36*, 9273-9276.
- [117] Hu, T.; Curtis, J.M.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C., Identification of dtx-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *prorocentrum lima*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, *0*, 597-599.
- [118] Cruz, P.G.; Daranas, A.H.; Fernandez, J.J.; Souto, M.L.; Norte, M., Dtx5c, a new oa sulphate ester derivative from cultures of *prorocentrum belizeanum*. *Toxicon* **2006**, *47*, 920-924.
- [119] Suarez-Gomez, B.; Souto, M.L.; Norte, M.; Fernandez, J.J., Isolation and structural determination of dtx-6, a new okadaic acid derivative. *Journal of natural products* **2001**, *64*, 1363-1364.
- [120] Suzuki, T.; Ota, H.; Yamasaki, M., Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-o-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *patinopecten yessoensis*. *Toxicon* **1999**, *37*, 187-198.
- [121] Vale, P.; Sampayo, M.A., Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon* **1999**, *37*, 1109-1121.
- [122] Fernandez, J.J.; Suarez-Gomez, B.; Souto, M.L.; Norte, M., Identification of new okadaic acid derivatives from laboratory cultures of *prorocentrum lima*. *Journal of natural products* **2003**, *66*, 1294-1296.
- [123] Cruz, P.G.; Daranas, A.H.; Fernandez, J.J.; Norte, M., 19-epi-okadaic acid, a novel protein phosphatase inhibitor with enhanced selectivity. *Organic letters* **2007**, *9*, 3045-3048.

- [124] Paz, B.; Daranas, A.H.; Cruz, P.G.; Franco, J.M.; Norte, M.; Fernandez, J.J., Identification of 19-epi-okadaic acid, a new diarrhetic shellfish poisoning toxin, by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Mar Drugs* **2008**, *6*, 489-495.
- [125] Cruz, P.G.; Fernandez, J.J.; Norte, M.; Daranas, A.H., Belizeanic acid: A potent protein phosphatase 1 inhibitor belonging to the okadaic acid class, with an unusual skeleton. *Chemistry* **2008**, *14*, 6948-6956.
- [126] Takai, A.; Bialojan, C.; Troschka, M.; Ruegg, J.C., Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS letters* **1987**, *217*, 81-84.
- [127] Honkanen, R.E.; Codispoti, B.A.; Tse, K.; Boynton, A.L.; Honkanan, R.E., Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon* **1994**, *32*, 339-350.
- [128] Dawson, J.F.; Holmes, C.F., Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **1999**, *4*, D646-658.
- [129] Louzao, M.C.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Effect of okadaic acid on glucose regulation. *Mini Rev Med Chem* **2005**, *5*, 207-215.
- [130] Aonuma, S.; Ushijima, T.; Nakayasu, M.; Shima, H.; Sugimura, T.; Nagao, M., Mutation induction by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, in chl cells, but not in *s. Typhimurium*. *Mutation research* **1991**, *250*, 375-381.
- [131] Tohda, H.; Nagao, M.; Sugimura, T.; Oikawa, A., Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, induces sister-chromatid exchanges depending on the presence of bromodeoxyuridine. *Mutation research* **1993**, *289*, 275-280.
- [132] van den Heuvel, J.P., Xenobiotic receptor systems. Introduction and overview. In *Comprehensive toxicology*, Elsevier Science BV: Amsterdam, 2002; Vol. XIV, p 646.
- [133] Daranas, A.H.; Cruz, P.G.; Creus, A.H.; Norte, M.; Fernandez, J.J., Self-assembly of okadaic acid as a pathway to the cell. *Organic letters* **2007**, *9*, 4191-4194.
- [134] Munday, R., Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic acid in animals? *Toxins* **2013**, *5*, 267-285.
- [135] Takai, A.; Murata, M.; Torigoe, K.; Isobe, M.; Mieskes, G.; Yasumoto, T., Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship. *The Biochemical journal* **1992**, *284 (Pt 2)*, 539-544.
- [136] Holmes, C.F.; Luu, H.A.; Carrier, F.; Schmitz, F.J., Inhibition of protein phosphatases-1 and -2a with acanthifolicin. Comparison with diarrhetic shellfish toxins and identification of a region on okadaic acid important for phosphatase inhibition. *FEBS letters* **1990**, *270*, 216-218.
- [137] Rivas, M.; Garcia, C.; Liberona, J.L.; Lagos, N., Biochemical characterization and inhibitory effects of dinophysistoxin-1, okadaic acid and microcystine 1-r on protein phosphatase 2a purified from the mussel *mytilus chilensis*. *Biological research* **2000**, *33*, 197-206.
- [138] Garibo, D.; de la Iglesia Gonzalez, P.; Diogene, J.; Campas, M., Inhibition equivalency factors for dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 in protein phosphatase assays, applicability to the analysis of shellfish samples and comparison with lc-ms/ms. *J Agric Food Chem* **2013**.
- [139] Aune, T.; Larsen, S.; Aasen, J.A.; Rehmann, N.; Satake, M.; Hess, P., Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (dtx-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice. *Toxicon* **2007**, *49*, 1-7.
- [140] Yanagi, T.; Murata, M.; Torigoe, K.; Yasumoto, T., Biological activities of semisynthetic analogs of dinophysistoxin-3, the major diarrhetic shellfish toxin. *Agricultural and Biological Chemistry* **1989**, *53*, 525-529.

- [141] Nishiwaki, S.; Fujiki, H.; Suganuma, M.; Furuya-Suguri, H.; Matsushima, R.; Iida, Y.; Ojika, M.; Yamada, K.; Uemura, D.; Yasumoto, T., *et al.*, Structure-activity relationship within a series of okadaic acid derivatives. *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 1837-1841.
- [142] Cohen, P.; Holmes, C.F.; Tsukitani, Y., Okadaic acid: A new probe for the study of cellular regulation. *Trends in biochemical sciences* **1990**, *15*, 98-102.
- [143] Tripuraneni, J.; Koutsouris, A.; Pestic, L.; De Lanerolle, P.; Hecht, G., The toxin of diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology* **1997**, *112*, 100-108.
- [144] Kikuchi, K.; Shima, H.; Mitsuhashi, S.; Suzuki, M.; Oikawa, H., The apoptosis-inducing activity of the two protein phosphatase inhibitors, tautomycin and thyriferyl 23-acetate, is not due to the inhibition of protein phosphatases pp1 and pp2a (review). *International journal of molecular medicine* **1999**, *4*, 395-401.
- [145] Espina, B.; Louzao, M.C.; Cagide, E.; Alfonso, A.; Vieytes, M.R.; Yasumoto, T.; Botana, L.M., The methyl ester of okadaic acid is more potent than okadaic acid in disrupting the actin cytoskeleton and metabolism of primary cultured hepatocytes. *Br J Pharmacol* **2010**, *159*, 337-344.
- [146] Valdíglesias, V.; Prego-Faraldo, M.V.; Pasaro, E.; Mendez, J.; Laffon, B., Okadaic acid: More than a diarrhetic toxin. *Mar Drugs* **2013**, *11*, 4328-4349.
- [147] Valdíglesias, V.; Laffon, B.; Pasaro, E.; Mendez, J., Okadaic acid induces morphological changes, apoptosis and cell cycle alterations in different human cell types. *Journal of environmental monitoring : JEM* **2011**, *13*, 1831-1840.
- [148] Lago, J.; Santaclara, F.; Vieites, J.M.; Cabado, A.G., Collapse of mitochondrial membrane potential and caspases activation are early events in okadaic acid-treated caco-2 cells. *Toxicol* **2005**, *46*, 579-586.
- [149] Ao, L.; Liu, J.Y.; Gao, L.H.; Liu, S.X.; Yang, M.S.; Huang, M.H.; Cao, J., Differential expression of genes associated with cell proliferation and apoptosis induced by okadaic acid during the transformation process of balb/c 3t3 cells. *Toxicol In Vitro* **2008**, *22*, 116-127.
- [150] Leira, F.; Alvarez, C.; Vieites, J.M.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Study of cytoskeletal changes induced by okadaic acid in be(2)-m17 cells by means of a quantitative fluorimetric microplate assay. *Toxicol In Vitro* **2001**, *15*, 277-282.
- [151] Cabado, A.G.; Leira, F.; Vieytes, M.R.; Vieites, J.M.; Botana, L.M., Cytoskeletal disruption is the key factor that triggers apoptosis in okadaic acid-treated neuroblastoma cells. *Arch Toxicol* **2004**, *78*, 74-85.
- [152] Leira, F.; Louzao, M.C.; Vieites, J.M.; Botana, L.M.; Vieytes, M.R., Fluorescent microplate cell assay to measure uptake and metabolism of glucose in normal human lung fibroblasts. *Toxicol In Vitro* **2002**, *16*, 267-273.
- [153] Riordan, F.A.; Foroni, L.; Hoffbrand, A.V.; Mehta, A.B.; Wickremasinghe, R.G., Okadaic acid-induced apoptosis of hl60 leukemia cells is preceded by destabilization of bcl-2 mRNA and downregulation of bcl-2 protein. *FEBS letters* **1998**, *435*, 195-198.
- [154] Rossini, G.P.; Sgarbi, N.; Malaguti, C., The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms. *Toxicol* **2001**, *39*, 763-770.
- [155] Arias, C.; Sharma, N.; Davies, P.; Shafit-Zagardo, B., Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *Journal of neurochemistry* **1993**, *61*, 673-682.
- [156] Nuydens, R.; de Jong, M.; Van Den Kieboom, G.; Heers, C.; Dispersyn, G.; Cornelissen, F.; Nuyens, R.; Borgers, M.; Geerts, H., Okadaic acid-induced apoptosis in neuronal cells: Evidence for an abortive mitotic attempt. *Journal of neurochemistry* **1998**, *70*, 1124-1133.

- [157] Tapia, R.; Pena, F.; Arias, C., Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *Neurochemical research* **1999**, *24*, 1423-1430.
- [158] Opsahl, J.A.; Ljostveit, S.; Solstad, T.; Risa, K.; Roepstorff, P.; Fladmark, K.E., Identification of dynamic changes in proteins associated with the cellular cytoskeleton after exposure to okadaic acid. *Mar Drugs* **2013**, *11*, 1763-1782.
- [159] Kamat, P.K.; Tota, S.; Rai, S.; Shukla, R.; Ali, S.; Najmi, A.K.; Nath, C., Okadaic acid induced neurotoxicity leads to central cholinergic dysfunction in rats. *Eur J Pharmacol* **2012**, *690*, 90-98.
- [160] Kamat, P.K.; Tota, S.; Rai, S.; Swarnkar, S.; Shukla, R.; Nath, C., A study on neuroinflammatory marker in brain areas of okadaic acid (icv) induced memory impaired rats. *Life Sci* **2012**, *90*, 713-720.
- [161] Hokama, Y.; Scheuer, P.J.; Yasumoto, T., Effect of a marine toxin on human peripheral blood monocytes. *Journal of clinical laboratory analysis* **1989**, *3*, 215-221.
- [162] Hurme, M.; Matikainen, S., Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, enhances the phorbol ester-induced interleukin-1 beta expression via an ap-1-mediated mechanism. *Scandinavian journal of immunology* **1993**, *38*, 570-574.
- [163] Pshenichkin, S.P.; Wise, B.C., Okadaic acid stimulates nerve growth factor production via an induction of interleukin-1 in primary cultures of cortical astroglial cells. *Neurochem Int* **1997**, *30*, 507-514.
- [164] Franchini, A.; Marchesini, E.; Poletti, R.; Ottaviani, E., Swiss mice cd1 fed on mussels contaminated by okadaic acid and yessotoxins: Effects on thymus and spleen. *European journal of histochemistry : EJH* **2005**, *49*, 179-188.
- [165] Goris, J.; Hermann, J.; Hendrix, P.; Ozon, R.; Merlevede, W., Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and mpf formation in xenopus laevis oocytes. *FEBS letters* **1989**, *245*, 91-94.
- [166] Picard, A.; Capony, J.P.; Brautigan, D.L.; Doree, M., Involvement of protein phosphatases 1 and 2a in the control of m phase-promoting factor activity in starfish. *J Cell Biol* **1989**, *109*, 3347-3354.
- [167] Escoffier, N.; Gaudin, J.; Mezhoud, K.; Huet, H.; Chateau-Joubert, S.; Turquet, J.; Crespeau, F.; Edery, M., Toxicity to medaka fish embryo development of okadaic acid and crude extracts of prorocentrum dinoflagellates. *Toxicon* **2007**, *49*, 1182-1192.
- [168] Casarini, L.; Franchini, A.; Malagoli, D.; Ottaviani, E., Evaluation of the effects of the marine toxin okadaic acid by using fetax assay. *Toxicology letters* **2007**, *169*, 145-151.
- [169] Franchini, A.; Malagoli, D.; Ottaviani, E., Targets and effects of yessotoxin, okadaic acid and palytoxin: A differential review. *Mar Drugs* **2010**, *8*, 658-677.
- [170] Ehlers, A.; Stempin, S.; Al-Hamwi, R.; Lampen, A., Embryotoxic effects of the marine biotoxin okadaic acid on murine embryonic stem cells. *Toxicon* **2010**, *55*, 855-863.
- [171] Ariu, F.; Fois, S.; Bebbere, D.; Ledda, S.; Rosati, I.; Zedda, M.T.; Pau, S.; Bogliolo, L., The effect of okadaic acid on meiotic maturation of canine oocytes of different size. *Theriogenology* **2012**, *77*, 46-52.
- [172] Srsen, V.; Kalous, J.; Nagyova, E.; Sutovsky, P.; King, W.A.; Motlik, J., Effects of follicle-stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (alopex lagopus) oocytes in vitro. *Zygote* **1998**, *6*, 299-309.
- [173] de Vantery Arrighi, C.; Campana, A.; Schorderet-Slatkine, S., A role for the mek-mapk pathway in okadaic acid-induced meiotic resumption of incompetent growing mouse oocytes. *Biology of reproduction* **2000**, *63*, 658-665.
- [174] Sun, Q.Y.; Wu, G.M.; Lai, L.; Bonk, A.; Cabot, R.; Park, K.W.; Day, B.N.; Prather, R.S.; Schatten, H., Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle

- progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of reproduction* **2002**, *66*, 580-588.
- [175] Carvalho, P.S.; Catian, R.; Moukha, S.; Matias, W.G.; Creppy, E.E., Comparative study of domoic acid and okadaic acid induced-chromosomal abnormalities in the caco-2 cell line. *International journal of environmental research and public health* **2006**, *3*, 4-10.
- [176] Fessard, V.; Grosse, Y.; Pfohl-Leszkwicz, A.; Puiseux-Dao, S., Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in bhk21 c13 fibroblasts and heshv keratinocytes. *Mutation research* **1996**, *361*, 133-141.
- [177] Le Hegarat, L.; Jacquin, A.G.; Bazin, E.; Fessard, V., Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid, in human caco-2 cells and in mice gut cells. *Environ Toxicol* **2006**, *21*, 55-64.
- [178] Le Hegarat, L.; Fessard, V.; Poul, J.M.; Dragacci, S.; Sanders, P., Marine toxin okadaic acid induces aneuploidy in cho-k1 cells in presence of rat liver postmitochondrial fraction, revealed by cytokinesis-block micronucleus assay coupled to fish. *Environ Toxicol* **2004**, *19*, 123-128.
- [179] Nakagama, H.; Kaneko, S.; Shima, H.; Inamori, H.; Fukuda, H.; Kominami, R.; Sugimura, T.; Nagao, M., Induction of minisatellite mutation in nih 3t3 cells by treatment with the tumor promoter okadaic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 10813-10816.
- [180] Rogers, C.G.; Heroux-Metcalf, C.; Langlois, I., Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid, a non-phorbol ester type tumour promoter, in v79 chinese hamster lung cells. *Toxicol In Vitro* **1994**, *8*, 269-276.
- [181] Valdiglesias, V.; Laffon, B.; Pasaro, E.; Mendez, J., Evaluation of okadaic acid-induced genotoxicity in human cells using the micronucleus test and gammah2ax analysis. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* **2011**, *74*, 980-992.
- [182] Soud-Mensi, G.; Moukha, S.; Mobio, T.A.; Maaroufi, K.; Creppy, E.E., The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicol* **2008**, *51*, 1338-1344.
- [183] Valdiglesias, V.; Laffon, B.; Pasaro, E.; Cemeli, E.; Anderson, D.; Mendez, J., Induction of oxidative DNA damage by the marine toxin okadaic acid depends on human cell type. *Toxicol* **2011**, *57*, 882-888.
- [184] Fujiki, H.; Suganuma, M.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Takagi, K.; Uda, N.; Wakamatsu, K.; Yamada, K.; Murata, M.; Yasumoto, T., *et al.*, Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Japanese journal of cancer research : Gann* **1988**, *79*, 1089-1093.
- [185] Suganuma, M.; Fujiki, H.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Nakayasu, M.; Ojika, M.; Wakamatsu, K.; Yamada, K.; Sugimura, T., Okadaic acid: An additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 1768-1771.
- [186] Messner, D.J.; Ao, P.; Jagdale, A.B.; Boynton, A.L., Abbreviated cell cycle progression induced by the serine/threonine protein phosphatase inhibitor okadaic acid at concentrations that promote neoplastic transformation. *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 1163-1172.
- [187] Fujiki, H.; Suganuma, M., Carcinogenic aspects of protein phosphatase 1 and 2a inhibitors. *Progress in molecular and subcellular biology* **2009**, *46*, 221-254.
- [188] Cordier, S.; Monfort, C.; Miossec, L.; Richardson, S.; Belin, C., Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of france. *Environmental research* **2000**, *84*, 145-150.
- [189] López-Rodas, V.; Maneiro, E.; Martínez, J.; Navarro, M.; Costas, E. In *Harmful algal blooms, red tides and human health: Diarrhetic shellfish poisoning and colorectal cancer*, Anales-Real Academia Nacional De Farmacia, 2006; Instituto De Espana: P 391.

- [190] Manerio, E.; Rodas, V.L.; Costas, E.; Hernandez, J.M., Shellfish consumption: A major risk factor for colorectal cancer. *Medical hypotheses* **2008**, *70*, 409-412.
- [191] Toyofuku, H., Joint fao/who/ioc activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Mar Pollut Bull* **2006**, *52*, 1735-1745.
- [192] EFSA, 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* **2008**, 1-62.
- [193] Dickey, R.W.; Bobzin, S.C.; Faulkner, D.J.; Bencsath, F.A.; Andrzejewski, D., Identification of okadaic acid from a caribbean dinoflagellate, *prorocentrum concavum*. *Toxicon* **1990**, *28*, 371-377.
- [194] Tubaro, A.; Sosa, S.; Carbonatto, M.; Altinier, G.; Vita, F.; Melato, M.; Satake, M.; Yasumoto, T., Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon* **2003**, *41*, 783-792.
- [195] Yasumoto, T.; Murata, M., Polyether toxins involved in seafood poisoning. In *Marine toxins*, American Chemical Society: 1990; Vol. 418, pp 120-132.
- [196] Ito, E.; Yasumoto, T.; Takai, A.; Imanishi, S.; Harada, K., Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method. *Toxicon* **2002**, *40*, 159-165.
- [197] Aune, T.; Espenes, A.; Aasen, J.A.; Quilliam, M.A.; Hess, P.; Larsen, S., Study of possible combined toxic effects of azaspiracid-1 and okadaic acid in mice via the oral route. *Toxicon* **2012**, *60*, 895-906.
- [198] Ito, E.; Terao, K., Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds. *Natural toxins* **1994**, *2*, 371-377.
- [199] Ogino, H.; Kumagai, M.; Yasumoto, T., Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Natural toxins* **1997**, *5*, 255-259.
- [200] Union, T.E.P.a.t.c.o.t.E., Regulation (ec) no. 853/2004 of the european parliament and of the council of 29 april 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Oj L 139/55, 30.4.2004. Official Journal of the European Union Official Journal of the European Union 2004.
- [201] Kat, M., Diarrhetic mussel poisoning in the netherlands related to the dinoflagellate *dinophysis acuminata*. *Antonie van Leeuwenhoek* **1983**, *49*, 417-427.
- [202] UE, Reglamento (ue) nº 15/2011 de la comisión, de 10 de enero de 2011, por el que se modifica el reglamento (ce) nº 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos. Europea, C., Ed. Boletín Oficial del Estado, 2011; Vol. DOUE-L-2011-80010.
- [203] Takai, A.; Mieskes, G., Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases. *The Biochemical journal* **1991**, *275 (Pt 1)*, 233-239.
- [204] Simon, J.F.; Vernoux, J.P., Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphate. *Natural toxins* **1994**, *2*, 293-301.
- [205] Tubaro, A.; Florio, C.; Luxich, E.; Sosa, S.; Della Loggia, R.; Yasumoto, T., A protein phosphatase 2a inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon* **1996**, *34*, 743-752.
- [206] Vieytes, M.R.; Fontal, O.I.; Leira, F.; Baptista de Sousa, J.M.; Botana, L.M., A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Anal Biochem* **1997**, *248*, 258-264.
- [207] González, J.; Leira, F.; Fontal, O.; Vieytes, M.; Arévalo, F.; Vieites, J.; Bermúdez-Puente, M.; Muniz, S.; Salgado, C.; Yasumoto, T., 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* **2002**, *466*, 233-246.

- [208] Serres, M.H.; Fladmark, K.E.; Doskeland, S.O., An ultrasensitive competitive binding assay for the detection of toxins affecting protein phosphatases. *Toxicon* **2000**, *38*, 347-360.
- [209] Fraga, M.; Vilarino, N.; Louzao, M.C.; Rodriguez, P.; Campbell, K.; Elliott, C.T.; Botana, L.M., Multidetecion of paralytic, diarrhetic, and amnesic shellfish toxins by an inhibition immunoassay using a microsphere-flow cytometry system. *Anal Chem* **2013**, *85*, 7794-7802.
- [210] Tubaro, A.; Florio, C.; Luxich, E.; Vertua, R.; Della Loggia, R.; Yasumoto, T., Suitability of the mtt-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels. *Toxicon* **1996**, *34*, 965-974.
- [211] Leira, F.; Alvarez, C.; Cabado, A.G.; Vieites, J.M.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Development of a f actin-based live-cell fluorimetric microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Anal Biochem* **2003**, *317*, 129-135.
- [212] Lee, J.S.; Yanagi, T.; Kenma, R.; YASUMOTO, T., Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography (analytical chemistry). *Agricultural and biological chemistry* **1987**, *51*, 877-881.
- [213] Lee, J.-S.; Igarashi, T.; Fraga, S.; Dahl, E.; Hovgaard, P.; Yasumoto, T., Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of Applied Phycology* **1989**, *1*, 147-152.
- [214] Akasaka, K.; Ohrui, H.; Meguro, H.; Yasumoto, T., Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins in scallops and mussels by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1996**, *729*, 381-386.
- [215] Stobo, L.A.; Lacaze, J.P.; Scott, A.C.; Gallacher, S.; Smith, E.A.; Quilliam, M.A., Liquid chromatography with mass spectrometry--detection of lipophilic shellfish toxins. *Journal of AOAC International* **2005**, *88*, 1371-1382.
- [216] McNabb, P.; Selwood, A.I.; Holland, P.T.; Aasen, J.; Aune, T.; Eaglesham, G.; Hess, P.; Igarishi, M.; Quilliam, M.; Slattery, D., *et al.*, Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: Single-laboratory validation and interlaboratory study. *Journal of AOAC International* **2005**, *88*, 761-772.
- [217] Fux, E.; McMillan, D.; Bire, R.; Hess, P., Development of an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins. *J Chromatogr A* **2007**, *1157*, 273-280.
- [218] Zanchett, G.; Oliveira-Filho, E.C., Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins* **2013**, *5*, 1896-1917.
- [219] Byth, S., Palm island mystery disease. *The Medical journal of Australia* **1980**, *2*, 40, 42.
- [220] Bourke, A.; Hawes, R.; Neilson, A.; Stallman, N., An outbreak of hepato-enteritis (the palm island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon* **1983**, *21*, 45-48.
- [221] Hawkins, P.R.; Runnegar, M.T.; Jackson, A.R.; Falconer, I.R., Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *cylindrospermopsis raciborskii* (woloszynska) seenaya and subba raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ Microbiol* **1985**, *50*, 1292-1295.
- [222] Ohtani, I.; Moore, R.E.; Runnegar, M.T.C., Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* **1992**, *114*, 7941-7942.
- [223] Quesada, A.; Moreno, E.; Carrasco, D.; Paniagua, T.; Wormer, L.; Hoyos, C.d.; Sukenik, A., Toxicity of aphanizomenon ovalisporum (cyanobacteria) in a spanish water reservoir. *European Journal of Phycology* **2006**, *41*, 39-45.
- [224] Poniedzialek, B.; Rzymiski, P.; Kokocinski, M., Cylindrospermopsin: Water-linked potential threat to human health in europe. *Environmental toxicology and pharmacology* **2012**.

- [225] de la Cruz, A.A.; Hiskia, A.; Kaloudis, T.; Chernoff, N.; Hill, D.; Antoniou, M.G.; He, X.; Loftin, K.; O'Shea, K.; Zhao, C., *et al.*, A review on cylindrospermopsin: The global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environmental science. Processes & impacts* **2013**.
- [226] Bonilla, S.; Aubriot, L.; Soares, M.C.; Gonzalez-Piana, M.; Fabre, A.; Huszar, V.L.; Lurling, M.; Antoniadou, D.; Padisak, J.; Kruk, C., What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria planktothrix agardhii and cylindrospermopsis raciborskii? *FEMS microbiology ecology* **2012**, *79*, 594-607.
- [227] Berger, C.; Ba, N.; Gugger, M.; Bouvy, M.; Rusconi, F.; Coute, A.; Troussellier, M.; Bernard, C., Seasonal dynamics and toxicity of cylindrospermopsis raciborskii in lake guiers (senegal, west africa). *FEMS microbiology ecology* **2006**, *57*, 355-366.
- [228] Blahova, L.; Oravec, M.; Marsalek, B.; Sejnohova, L.; Simek, Z.; Blaha, L., The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the czech republic as determined by immunochemical and lc/ms methods. *Toxicon* **2009**, *53*, 519-524.
- [229] Pearson, L.; Mihali, T.; Moffitt, M.; Kellmann, R.; Neilan, B., On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs* **2010**, *8*, 1650-1680.
- [230] Merel, S.; Villarin, M.; Chung, K.; Chicana, R.; Snyder, S., Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins. *Toxicon* **2013**.
- [231] Chorus, I.; Bartram, J., *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Spon Press: 1999.
- [232] Griffiths, D.J.; Saker, M.L., The palm island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* **2003**, *18*, 78-93.
- [233] Hitzfeld, B.C.; Hoger, S.J.; Dietrich, D.R., Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental health perspectives* **2000**, *108 Suppl 1*, 113-122.
- [234] Ho, L.; Sawade, E.; Newcombe, G., Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal--a review. *Water Res* **2012**, *46*, 1536-1548.
- [235] Banker, R.; Teltsch, B.; Sukenik, A.; Carmeli, S., 7-epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium aphanizomenon ovalisporum from lake kinneret, israel. *Journal of natural products* **2000**, *63*, 387-389.
- [236] Xie, C.; Runnegar, M.T.C.; Snider, B.B., Total synthesis of (±)-cylindrospermopsin. *J Am Chem Soc* **2000**, *122*, 5017-5024.
- [237] Terao, K.; Ohmori, S.; Igarashi, K.; Ohtani, I.; Watanabe, M.F.; Harada, K.I.; Ito, E.; Watanabe, M., Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga umezakia natans. *Toxicon* **1994**, *32*, 833-843.
- [238] Runnegar, M.T.; Xie, C.; Snider, B.B.; Wallace, G.A.; Weinreb, S.M.; Kuhlenskamp, J., In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicol Sci* **2002**, *67*, 81-87.
- [239] Froschio, S.M.; Humpage, A.R.; Burcham, P.C.; Falconer, I.R., Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol* **2003**, *18*, 243-251.
- [240] Runnegar, M.T.; Kong, S.M.; Zhong, Y.Z.; Lu, S.C., Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **1995**, *49*, 219-225.
- [241] Norris, R.L.; Seawright, A.A.; Shaw, G.R.; Senogles, P.; Eaglesham, G.K.; Smith, M.J.; Chiswell, R.K.; Moore, M.R., Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin in vivo in the mouse. *Toxicon* **2002**, *40*, 471-476.

- [242] Shaw, G.R.; Seawright, A.A.; Moore, M.R.; Lam, P.K., Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: Evaluation of its toxicologic activity. *Therapeutic drug monitoring* **2000**, *22*, 89-92.
- [243] Falconer, I.R.; Hardy, S.J.; Humpage, A.R.; Froscio, S.M.; Tozer, G.J.; Hawkins, P.R., Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) cylindrospermopsis raciborskii in male swiss albino mice. *Environmental Toxicology* **1999**, *14*, 143-150.
- [244] Falconer, I.R.; Humpage, A.R., Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga cylindrospermopsis raciborskii containing the toxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* **2001**, *16*, 192-195.
- [245] Bazin, E.; Huet, S.; Jarry, G.; Le Hegarat, L.; Munday, J.S.; Humpage, A.R.; Fessard, V., Cytotoxic and genotoxic effects of cylindrospermopsin in mice treated by gavage or intraperitoneal injection. *Environ Toxicol* **2012**, *27*, 277-284.
- [246] Runnegar, M.T.; Kong, S.M.; Zhong, Y.Z.; Ge, J.L.; Lu, S.C., The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, *201*, 235-241.
- [247] Carmichael, W.W.; Azevedo, S.M.; An, J.S.; Molica, R.J.; Jochimsen, E.M.; Lau, S.; Rinehart, K.L.; Shaw, G.R.; Eaglesham, G.K., Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental health perspectives* **2001**, *109*, 663-668.
- [248] Merel, S.; Walker, D.; Chicana, R.; Snyder, S.; Baures, E.; Thomas, O., State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ Int* **2013**, *59C*, 303-327.
- [249] Moreira, C.; Azevedo, J.; Antunes, A.; Vasconcelos, V., Cylindrospermopsin: Occurrence, methods of detection and toxicology. *Journal of applied microbiology* **2012**.
- [250] Zegura, B.; Straser, A.; Filipic, M., Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutation research* **2011**, *727*, 16-41.
- [251] Kinnear, S., Cylindrospermopsin: A decade of progress on bioaccumulation research. *Mar Drugs* **2010**, *8*, 542-564.
- [252] Dietrich, D.; Hoeger, S., Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): A reasonable or misguided approach? *Toxicology and applied pharmacology* **2005**, *203*, 273-289.
- [253] Saker, M.L.; Jungblut, A.D.; Neilan, B.A.; Rawn, D.F.; Vasconcelos, V.M., Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium aphanizomenon flos-aquae. *Toxicon* **2005**, *46*, 555-562.
- [254] Liu, H.; Scott, P.M., Determination of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in algal food supplements. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2011**, *28*, 786-790.
- [255] Harada, K.I.; Ohtani, I.; Iwamoto, K.; Suzuki, M.; Watanabe, M.F.; Watanabe, M.; Terao, K., Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium umezakia natans and its screening method. *Toxicon* **1994**, *32*, 73-84.
- [256] Seawright, A.A.; Nolan, C.C.; Shaw, G.R.; Chiswell, R.K.; Norris, R.L.; Moore, M.R.; Smith, M.J., The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium cylindrospermopsis raciborskii (woloszynska). *Environmental Toxicology* **1999**, *14*, 135-142.
- [257] Duy, T.N.; Lam, P.K.; Shaw, G.R.; Connell, D.W., Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Reviews of environmental contamination and toxicology* **2000**, *163*, 113-185.

- [258] van Apeldoorn, M.E.; van Egmond, H.P.; Speijers, G.J.; Bakker, G.J., Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition & food research* **2007**, *51*, 7-60.
- [259] Bernard, C.; Harvey, M.; Briand, J.F.; Bire, R.; Krys, S.; Fontaine, J.J., Toxicological comparison of diverse cylindrospermopsis raciborskii strains: Evidence of liver damage caused by a french c raciborskii strain. *Environ Toxicol* **2003**, *18*, 176-186.
- [260] Reisner, M.; Carmeli, S.; Werman, M.; Sukenik, A., The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. *Toxicol Sci* **2004**, *82*, 620-627.
- [261] Humpage, A.R.; Falconer, I.R., Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environ Toxicol* **2003**, *18*, 94-103.
- [262] Oliveira, V.R.; Carvalho, G.M.; Avila, M.B.; Soares, R.M.; Azevedo, S.M.; Ferreira, T.S.; Valenca, S.S.; Faffe, D.S.; Zin, W.A., Time-dependence of lung injury in mice acutely exposed to cylindrospermopsin. *Toxicol* **2012**, *60*, 764-772.
- [263] Kiss, T.; Vehovszky, A.; Hiripi, L.; Kovacs, A.; Voros, L., Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, cylindrospermopsis raciborskii, on identified molluscan neurones. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* **2002**, *131*, 167-176.
- [264] Schoeb, T.R.; Heaton-Jones, T.G.; Clemmons, R.M.; Carbonneau, D.A.; Woodward, A.R.; Shelton, D.; Poppenga, R.H., Clinical and necropsy findings associated with increased mortality among american alligators of lake griffin, florida. *Journal of wildlife diseases* **2002**, *38*, 320-337.
- [265] Zagatto, P.A.; Buratini, S.V.; Aragao, M.A.; Ferrao-Filho, A.S., Neurotoxicity of two cylindrospermopsis raciborskii (cyanobacteria) strains to mice, daphnia, and fish. *Environ Toxicol Chem* **2012**, *31*, 857-862.
- [266] Shen, X.; Lam, P.K.; Shaw, G.R.; Wickramasinghe, W., Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicol* **2002**, *40*, 1499-1501.
- [267] Chernoff, N.; Rogers, E.H.; Zehr, R.D.; Gage, M.I.; Malarkey, D.E.; Bradfield, C.A.; Liu, Y.; Schmid, J.E.; Jaskot, R.H.; Richards, J.H., *et al.*, Toxicity and recovery in the pregnant mouse after gestational exposure to the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *J Appl Toxicol* **2011**, *31*, 242-254.
- [268] Torokne, A.; Palovics, A.; Bankine, M., Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria--experimental evidence. *Environ Toxicol* **2001**, *16*, 512-516.
- [269] Stewart, I.; Seawright, A.A.; Schluter, P.J.; Shaw, G.R., Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium cylindrospermopsis raciborskii and its associated toxin cylindrospermopsin. *BMC dermatology* **2006**, *6*, 5.
- [270] Stewart, I.; Schluter, P.J.; Shaw, G.R., Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environmental health : a global access science source* **2006**, *5*, 7.
- [271] Rzymyski, P.; Poniedziałek, B., Dermatotoxins synthesized by blue-green algae (cyanobacteria). *Adv. Dermatol. Allergol* **2012**, *29*, 47-50.
- [272] Rogers, E.H.; Zehr, R.D.; Gage, M.I.; Humpage, A.R.; Falconer, I.R.; Marr, M.; Chernoff, N., The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicol* **2007**, *49*, 855-864.
- [273] Chorus, I., Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. *Texte/Umweltbundesamt* **2012**.

- [274] Falconer, I.R., Chapter 10 - measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. In *Algal toxins in seafood and drinking water*, Falconer, I.R., Ed. Academic Press: San Diego, 1993; pp 165-175.
- [275] Nogueira, I.C.; Saker, M.L.; Pflugmacher, S.; Wiegand, C.; Vasconcelos, V.M., Toxicity of the cyanobacterium *cylindrospermopsis raciborskii* to *daphnia magna*. *Environ Toxicol* **2004**, *19*, 453-459.
- [276] Metcalf, J.S.; Lindsay, J.; Beattie, K.A.; Birmingham, S.; Saker, M.L.; Torokne, A.K.; Codd, G.A., Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *artemia salina*: Comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicol* **2002**, *40*, 1115-1120.
- [277] Törökné, A.K., A new culture-free microbiotest for routine detection of cyanobacterial toxins. *Environmental Toxicology* **1999**, *14*, 466-472.
- [278] Torokne, A.; Vasdinnyei, R.; Asztalos, B.M., A rapid microbiotest for the detection of cyanobacterial toxins. *Environ Toxicol* **2007**, *22*, 64-68.
- [279] Hiripi, L.; Nagy, L.; Kalmar, T.; Kovacs, A.; Voros, L., Insect (*locusta migratoria migratorioides*) test monitoring the toxicity of cyanobacteria. *Neurotoxicology* **1998**, *19*, 605-608.
- [280] Vasas, G.; Gaspar, A.; Suranyi, G.; Batta, G.; Gyemant, G.; M, M.H.; Mathe, C.; Grigorszky, I.; Molnar, E.; Borbely, G., Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (blue-green *sinapis* test). *Anal Biochem* **2002**, *302*, 95-103.
- [281] Fessard, V.; Bernard, C., Cell alterations but no DNA strand breaks induced in vitro by cylindrospermopsin in cho k1 cells. *Environ Toxicol* **2003**, *18*, 353-359.
- [282] Froscio, S.M.; Fanok, S.; Humpage, A.R., Cytotoxicity screening for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* **2009**, *72*, 345-349.
- [283] Bain, P.; Shaw, G.; Patel, B., Induction of p53-regulated gene expression in human cell lines exposed to the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* **2007**, *70*, 1687-1693.
- [284] Neumann, C.; Bain, P.; Shaw, G., Studies of the comparative in vitro toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycylindrospermopsin. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* **2007**, *70*, 1679-1686.
- [285] Lankoff, A.; Wojcik, A.; Lisowska, H.; Bialczyk, J.; Dziga, D.; Carmichael, W.W., No induction of structural chromosomal aberrations in cylindrospermopsin-treated cho-k1 cells without and with metabolic activation. *Toxicol* **2007**, *50*, 1105-1115.
- [286] Gutierrez-Praena, D.; Pichardo, S.; Jos, A.; Moreno, F.J.; Camean, A.M., Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin cylindrospermopsin on the human cell line caco-2. *Water Res* **2012**, *46*, 1566-1575.
- [287] Froscio, S.M.; Humpage, A.R.; Burcham, P.C.; Falconer, I.R., Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* **2001**, *16*, 408-412.
- [288] Froscio, S.M.; Humpage, A.R.; Wickramasinghe, W.; Shaw, G.; Falconer, I.R., Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicol* **2008**, *51*, 191-198.
- [289] Graham, J.L.; Loftin, K.A.; Meyer, M.T.; Ziegler, A.C., Cyanotoxin mixtures and taste-and-odor compounds in cyanobacterial blooms from the midwestern united states. *Environ Sci Technol* **2010**, *44*, 7361-7368.
- [290] Yilmaz, M.; Phlips, E.J.; Szabo, N.J.; Badylak, S., A comparative study of florida strains of *cylindrospermopsis* and *aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicol* **2008**, *51*, 130-139.
- [291] Berry, J.P.; Lind, O., First evidence of "paralytic shellfish toxins" and cylindrospermopsin in a mexican freshwater system, lago catemaco, and

- apparent bioaccumulation of the toxins in "tegogolo" snails (*pomacea patula catemacensis*). *Toxicon* **2010**, *55*, 930-938.
- [292] Fraga, M.; Vilariño, N.; Louzao, M.C.; Rodríguez, L.P.; Alfonso, A.; Campbell, K.; Elliott, C.T.; Taylor, P.; Ramos, V.; Vasconcelos, V., Multi-detection method for five common microalgal toxins based on the use of microspheres coupled to a flow-cytometry system. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *850*, 57-64.
- [293] Vasas, G.; Gaspar, A.; Pager, C.; Suranyi, G.; Mathe, C.; Hamvas, M.M.; Borbely, G., Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-Lr) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 108-115.
- [294] Hawkins, P.R.; Chandrasena, N.R.; Jones, G.J.; Humpage, A.R.; Falconer, I.R., Isolation and toxicity of cylindrospermopsis raciborskii from an ornamental lake. *Toxicon* **1997**, *35*, 341-346.
- [295] Harada, K.; Oshikata, M.; Shimada, T.; Nagata, A.; Ishikawa, N.; Suzuki, M.; Kondo, F.; Shimizu, M.; Yamada, S., High-performance liquid chromatographic separation of microcystins derivatized with a highly fluorescent dienophile. *Natural toxins* **1997**, *5*, 201-207.
- [296] Kaushik, R.; Balasubramanian, R., Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **2012**, *43*, 1349-1383.
- [297] Eaglesham, G.K.; Norris, R.L.; Shaw, G.R.; Smith, M.J.; Chiswell, R.K.; Davis, B.C.; Neville, G.R.; Seawright, A.A.; Moore, M.R., Use of hplc-ms/ms to monitor cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, for public health purposes. *Environmental Toxicology* **1999**, *14*, 151-154.
- [298] Stirling, D.J.; Quilliam, M.A., First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in new zealand. *Toxicon* **2001**, *39*, 1219-1222.
- [299] Bogialli, S.; Bruno, M.; Curini, R.; Di Corcia, A.; Fanali, C.; Lagana, A., Monitoring algal toxins in lake water by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol* **2006**, *40*, 2917-2923.
- [300] Riss, T.L.; Moravec, R.A., Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and drug development technologies* **2004**, *2*, 51-62.
- [301] Stoddart, M.J., *Mammalian cell viability: Methods and protocols*. Humana Press: 2011.
- [302] Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L., Cell viability assays. In *Assay guidance manual*, Sittampalam, G.S.; Gal-Edd, N.; Arkin, M.; Auld, D.; Austin, C.; Bejcek, B.; Glicksman, M.; Inglese, J.; Lemmon, V.; Li, Z., *et al.*, Eds. Bethesda MD, 2004.
- [303] Auld, D.S.; Zhang, Y.Q.; Southall, N.T.; Rai, G.; Landsman, M.; MacLure, J.; Langevin, D.; Thomas, C.J.; Austin, C.P.; Inglese, J., A basis for reduced chemical library inhibition of firefly luciferase obtained from directed evolution. *J Med Chem* **2009**, *52*, 1450-1458.
- [304] Niles, A.L.; Moravec, R.A.; Eric Hesselberth, P.; Scurria, M.A.; Daily, W.J.; Riss, T.L., A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem* **2007**, *366*, 197-206.
- [305] Ke, N.; Wang, X.; Xu, X.; Abassi, Y.A., The xcelligence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods in molecular biology* **2011**, *740*, 33-43.
- [306] Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- [307] Scudiero, D.A.; Shoemaker, R.H.; Paull, K.D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T.H.; Currens, M.J.; Seniff, D.; Boyd, M.R., Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research* **1988**, *48*, 4827-4833.

- [308] Cory, A.H.; Owen, T.C.; Barltrop, J.A.; Cory, J.G., Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications* **1991**, *3*, 207-212.
- [309] Goodwin, C.J.; Holt, S.J.; Downes, S.; Marshall, N.J., Microculture tetrazolium assays: A comparison between two new tetrazolium salts, xtt and mts. *J Immunol Methods* **1995**, *179*, 95-103.
- [310] Marshall, N.J.; Goodwin, C.J.; Holt, S.J., A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth regulation* **1995**, *5*, 69-84.
- [311] Berridge, M.V.; Tan, A.S., Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (mtt): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in mtt reduction. *Archives of biochemistry and biophysics* **1993**, *303*, 474-482.
- [312] Berridge, M.V.; Tan, A.S.; McCoy, K.D.; Wang, R., The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* **1996**, *4*, 15-19.
- [313] O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F., Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry / FEBS* **2000**, *267*, 5421-5426.
- [314] Ahmed, S.A.; Gogal, R.M.; Walsh, J.E., A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to [3h]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* **1994**, *170*, 211-224.
- [315] Shum, D.; Radu, C.; Kim, E.; Cajuste, M.; Shao, Y.; Seshan, V.E.; Djaballah, H., A high density assay format for the detection of novel cytotoxic agents in large chemical libraries. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2008**, *23*, 931-945.
- [316] Engman, H.; Tannergren, C.; Artursson, P.; Lennernas, H., Enantioselective transport and cyp3a4-mediated metabolism of r/s-verapamil in caco-2 cell monolayers. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2003**, *19*, 57-65.
- [317] Keldenich, J., Measurement and prediction of oral absorption. *Chemistry & biodiversity* **2009**, *6*, 2000-2013.
- [318] Jackson, M.J., Drug transport across gastrointestinal epithelia. In *Physiology of the gastrointestinal tract, 2nd ed*, Johnson, L.R., Ed. Raven Press: New York, 1987; pp 1597-1621.
- [319] Nellans, H.N., (b) mechanisms of peptide and protein absorption: (1) paracellular intestinal transport: Modulation of absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1991**, *7*, 339-364.
- [320] Pappenheimer, J.R.; Reiss, K.Z., Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J Membr Biol* **1987**, *100*, 123-136.
- [321] Barthe, L.; Woodley, J.; Houin, G., Gastrointestinal absorption of drugs: Methods and studies. *Fundamental & clinical pharmacology* **1999**, *13*, 154-168.
- [322] Fick, A., Ueber diffusion. *Annalen der Physik* **1855**, *170*, 59-86.
- [323] Pacha, J., Development of intestinal transport function in mammals. *Physiological reviews* **2000**, *80*, 1633-1667.
- [324] Le Ferrec, E.; Chesne, C.; Artusson, P.; Brayden, D.; Fabre, G.; Gires, P.; Guillou, F.; Rousset, M.; Rubas, W.; Scarino, M.L., In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ecvam workshop 46. European centre for the validation of alternative methods. *Altern Lab Anim* **2001**, *29*, 649-668.
- [325] Fagerholm, U., Prediction of human pharmacokinetics--gastrointestinal absorption. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **2007**, *59*, 905-916.

- [326] Cencic, A.; Langerholc, T., Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology--a review. *International journal of food microbiology* **2010**, *141 Suppl 1*, S4-14.
- [327] Fogh, J.; Fogh, J.M.; Orfeo, T., One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* **1977**, *59*, 221-226.
- [328] Engle, M.J.; Goetz, G.S.; Alpers, D.H., Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *Journal of Cellular Physiology* **1998**, *174*, 362-369.
- [329] Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simon-Assmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J., *et al.*, Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line caco-2 in culture. *Biol. Cell* **1983**, *47*, 323-330.
- [330] Sambuy, Y.; De Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M.L.; Stammati, A.; Zucco, F., The caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* **2005**, *21*, 1-26.
- [331] Hidalgo, I.J.; Raub, T.J.; Borchardt, R.T., Characterization of the human colon carcinoma cell line (caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **1989**, *96*, 736-749.
- [332] Chong, S.; Dando, S.; Morrison, R., Evaluation of biocoat® intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity. *Pharmaceutical Research* **1997**, *14*, 1835-1837.
- [333] Yamashita, S.; Konishi, K.; Yamazaki, Y.; Taki, Y.; Sakane, T.; Sezaki, H.; Furuyama, Y., New and better protocols for a short-term caco-2 cell culture system. *J Pharm Sci* **2002**, *91*, 669-679.
- [334] Artursson, P., Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (caco-2) cells. *J Pharm Sci* **1990**, *79*, 476-482.
- [335] Okada, T.; Narai, A.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Shimizu, M., Assessment of the marine toxins by monitoring the integrity of human intestinal caco-2 cell monolayers. *Toxicol In Vitro* **2000**, *14*, 219-226.
- [336] Ehlers, A.; Scholz, J.; These, A.; Hessel, S.; Preiss-Weigert, A.; Lampen, A., Analysis of the passage of the marine biotoxin okadaic acid through an in vitro human gut barrier. *Toxicology* **2011**, *279*, 196-202.
- [337] Hallegraef, G.M., A review of harmful algal blooms and their apparent global increase*. *Phycologia* **1993**, *32*, 79-99.
- [338] Sinha, R.; Pearson, L.A.; Davis, T.W.; Muenchhoff, J.; Pratama, R.; Jex, A.; Burford, M.A.; Neilan, B.A., Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BMC genomics* **2014**, *15*, 83.
- [339] Pelin, M.; Zanette, C.; De Bortoli, M.; Sosa, S.; Loggia, R.D.; Tubaro, A.; Florio, C., Effects of the marine toxin palytoxin on human skin keratinocytes: Role of ionic imbalance. *Toxicology* **2011**, *282*, 30-38.
- [340] Somlyo, A.P.; Somlyo, A.V.; Devine, C.E.; Peters, P.D.; Hall, T.A., Electron microscopy and electron probe analysis of mitochondrial cation accumulation in smooth muscle. *J Cell Biol* **1974**, *61*, 723-742.
- [341] Vale, C.; Gómez-Limia, B.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Mitogen-activated protein kinases regulate palytoxin-induced calcium influx and cytotoxicity in cultured neurons. *Br J Pharmacol* **2007**, *152*, 256-266.
- [342] Fernandez, D.A.; Espina, B.; Vilariño, N.; Louzao, M.C.; Vieytes, M.R.; Poli, M.; Botana, L.M., Study of in vitro human intestinal palytoxin absorption. In *6th European Congress of Pharmacology*, British Pharmacological Society: Granada, Spain, 2012.

- [343] Blume, L.F.; Denker, M.; Gieseler, F.; Kunze, T., Temperature corrected transepithelial electrical resistance (teer) measurement to quantify rapid changes in paracellular permeability. *Die Pharmazie* **2010**, *65*, 19-24.
- [344] Pinto da Silva, P.; Kachar, B., On tight-junction structure. *Cell* **1982**, *28*, 441-450.
- [345] Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S., Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **1993**, *123*, 1777-1788.
- [346] Furuse, M.; Fujita, K.; Hiragi, T.; Fujimoto, K.; Tsukita, S., Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* **1998**, *141*, 1539-1550.
- [347] Al-Sadi, R.; Khatib, K.; Guo, S.; Ye, D.; Youssef, M.; Ma, T., Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2011**, *300*, G1054-1064.
- [348] Lindgren, M.E.; Hällbrink, M.M.; Elmquist, A.M.; Langel, U., Passage of cell-penetrating peptides across a human epithelial cell layer in vitro. *The Biochemical journal* **2004**, *377*, 69-76.
- [349] Valverde, I.; Lago, J.; Vieites, J.M.; Cabado, A.G., In vitro approaches to evaluate palytoxin-induced toxicity and cell death in intestinal cells. *J Appl Toxicol* **2008**, *28*, 294-302.
- [350] Louzao, M.C.; Ares, I.R.; Cagide, E.; Espiña, B.; Vilariño, N.; Alfonso, A.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Palytoxins and cytoskeleton: An overview. *Toxicon* **2011**, *57*, 460-469.
- [351] Espiña, B.; Louzao, M.C.; Ares, I.R.; Fonfria, E.S.; Vilariño, N.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Disruption of the actin cytoskeleton induces fluorescent glucose accumulation on the rat hepatocytes clone 9. *Cell Physiol Biochem* **2011**, *27*, 653-660.
- [352] Small, J.V.; Kaverina, I., Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* **2003**, *15*, 40-47.
- [353] Garrod, D.R., Desmosomes and hemidesmosomes. *Curr Opin Cell Biol* **1993**, *5*, 30-40.
- [354] Fernandez, D.A.; Louzao, M.C.; Vilarino, N.; Espina, B.; Fraga, M.; Vieytes, M.R.; Roman, A.; Poli, M.; Botana, L.M., The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity. *FEBS J* **2013**, *280*, 3906-3919.
- [355] Fernandez, D.A.; Louzao, M.C.; Vilarino, N.; Espina, B.; Fraga, M.; Vieytes, M.R.; Roman, A.; Poli, M.; Botana, L.M. Key scientific article - the kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity. <https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/kinetic-mechanistic-cytomorphological-effects-palytoxin-human-intestinal-cells-caco-2-explain-lower-parenteral-oral-toxicity/> (08/11/2014),
- [356] Wang, J.; Wang, Y.Y.; Lin, L.; Gao, Y.; Hong, H.S.; Wang, D.Z., Quantitative proteomic analysis of okadaic acid treated mouse small intestines reveals differentially expressed proteins involved in diarrhetic shellfish poisoning. *Journal of proteomics* **2012**, *75*, 2038-2052.
- [357] Fernandez, D.A.; Vieira, A.C.; Louzao, M.C.; Cifuentes, J.M.; Vilarino, N.; Rubiolo, J.A.; Roman, A.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Preliminary study of the effects of okadaic acid in the intestinal tract of mouse. *Frontiers in Marine Science* **2014**.
- [358] Seth, A.; Sheth, P.; Elias, B.C.; Rao, R., Protein phosphatases 2a and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the caco-2 cell monolayer. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 11487-11498.
- [359] Sheth, P.; Samak, G.; Shull, J.A.; Seth, A.; Rao, R., Protein phosphatase 2a plays a role in hydrogen peroxide-induced disruption of tight junctions in caco-2 cell monolayers. *The Biochemical journal* **2009**, *421*, 59-70.

- [360] Rao, R., Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**, *1165*, 62-68.
- [361] Vale, C.; Botana, L.M., Marine toxins and the cytoskeleton: Okadaic acid and dinophysistoxins. *FEBS J* **2008**, *275*, 6060-6066.
- [362] Vilarino, N.; Ares, I.R.; Cagide, E.; Louzao, M.C.; Vieytes, M.R.; Yasumoto, T.; Botana, L.M., Induction of actin cytoskeleton rearrangement by methyl okadaate--comparison with okadaic acid. *FEBS J* **2008**, *275*, 926-934.
- [363] Martin-Lopez, A.; Gallardo-Rodriguez, J.J.; Sanchez-Miron, A.; Garcia-Camacho, F.; Molina-Grima, E., Cytotoxicity of yessotoxin and okadaic acid in mouse t lymphocyte cell line el-4. *Toxicon* **2012**, *60*, 1049-1056.
- [364] Fernandez, D.A.; Louzao, M.C.; Fraga, M.; Vilarino, N.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Experimental basis for the high oral toxicity of dinophysistoxin 1: A comparative study of dsp. *Toxins* **2014**, *6*, 211-228.
- [365] Poniedzialek, B.; Rzymiski, P.; Kokocinski, M., Cylindrospermopsin: Water-linked potential threat to human health in europe. *Environmental toxicology and pharmacology* **2012**, *34*, 651-660.
- [366] Rubiolo, J.A.; Fernández, D.A.; López-Alonso, H.; Louzao, M.C., 14. Pharmacology of cylindrospermopsin. In *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry*, 2nd ed.; Botana, L.M.; Alfonso, A., Eds. Wiley-Blackwell: 2015.
- [367] Chong, M.W.; Wong, B.S.; Lam, P.K.; Shaw, G.R.; Seawright, A.A., Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. *Toxicon* **2002**, *40*, 205-211.
- [368] Froscio, S.M.; Cannon, E.; Lau, H.M.; Humpage, A.R., Limited uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin by vero cells. *Toxicon* **2009**, *54*, 862-868.
- [369] Fastner, J.; Heinze, R.; Humpage, A.R.; Mischke, U.; Eaglesham, G.K.; Chorus, I., Cylindrospermopsin occurrence in two german lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of cylindrospermopsis raciborskii (cyanobacteria) isolates. *Toxicon* **2003**, *42*, 313-321.
- [370] Young, F.M.; Micklem, J.; Humpage, A.R., Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (cyn) on human granulosa cells in vitro. *Reproductive toxicology* **2008**, *25*, 374-380.
- [371] Bazin, E.; Mourot, A.; Humpage, A.R.; Fessard, V., Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and heparg. *Environmental and molecular mutagenesis* **2010**, *51*, 251-259.
- [372] Lopez-Alonso, H.; Rubiolo, J.A.; Vega, F.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Protein synthesis inhibition and oxidative stress induced by cylindrospermopsin elicit apoptosis in primary rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* **2013**, *26*, 203-212.
- [373] Gutierrez-Praena, D.; Jos, A.; Pichardo, S.; Camean, A.M., Oxidative stress responses in tilapia (*oreochromis niloticus*) exposed to a single dose of pure cylindrospermopsin under laboratory conditions: Influence of exposure route and time of sacrifice. *Aquat Toxicol* **2011**, *105*, 100-106.
- [374] Snoke, J.E.; Bloch, K., Formation and utilization of gamma-glutamylcysteine in glutathione synthesis. *J Biol Chem* **1952**, *199*, 407-414.
- [375] Snoke, J.E.; Yanari, S.; Bloch, K., Synthesis of glutathione from gamma-glutamylcysteine. *J Biol Chem* **1953**, *201*, 573-586.
- [376] Busu, C.; Li, W.; Caldito, G.; Aw, T.Y., Inhibition of glutathione synthesis in brain endothelial cells lengthens s-phase transit time in the cell cycle: Implications for proliferation in recovery from oxidative stress and endothelial cell damage. *Redox biology* **2013**, *1*, 131-139.
- [377] Beyer, D.; Suranyi, G.; Vasas, G.; Roszik, J.; Erdodi, F.; M, M.H.; Bacsi, I.; Batori, R.; Serfozo, Z.; Szigeti, Z.M., *et al.*, Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*phragmites australis*) plantlets cultured in vitro. *Toxicon* **2009**, *54*, 440-449.

- [378] Brinkley, B.R.; Cox, S.M.; Pepper, D.A.; Wible, L.; Brenner, S.L.; Pardue, R.L., Tubulin assembly sites and the organization of cytoplasmic microtubules in cultured mammalian cells. *J Cell Biol* **1981**, *90*, 554-562.
- [379] Fernandez, D.A.; Louzao, M.C.; Vilarino, N.; Fraga, M.; Espina, B.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M., Evaluation of the intestinal permeability and cytotoxic effects of cylindrospermopsin. *Toxicon* **2014**, *91*, 23-34.

