



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

Lucía Soliño Alonso

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

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

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

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

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

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

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

Conclusión

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

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

2. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN

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

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

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

2.1.1. *Amphidinium*

2.1.1.1. Toxicidad de extractos crudos de cultivos y muestras naturales

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

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

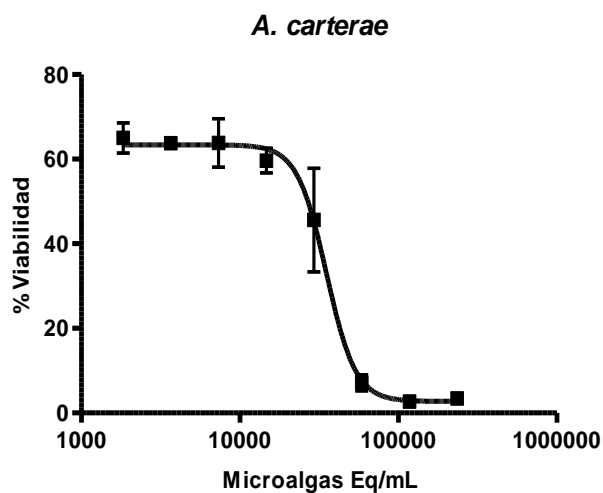


Figura 28. Curva dosis-respuesta del extracto crudo de *A. carterae* en células Neuro-2a.

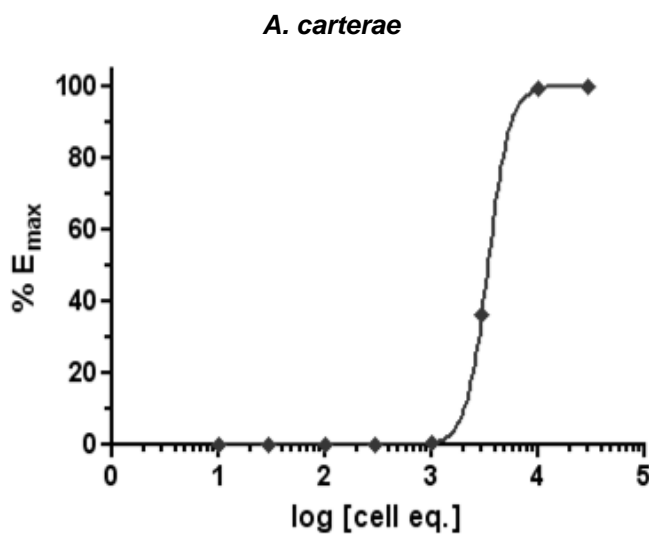


Figura 29. Curva dosis-respuesta del efecto del extracto crudo de *A. carterae* sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ en CGC.

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

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

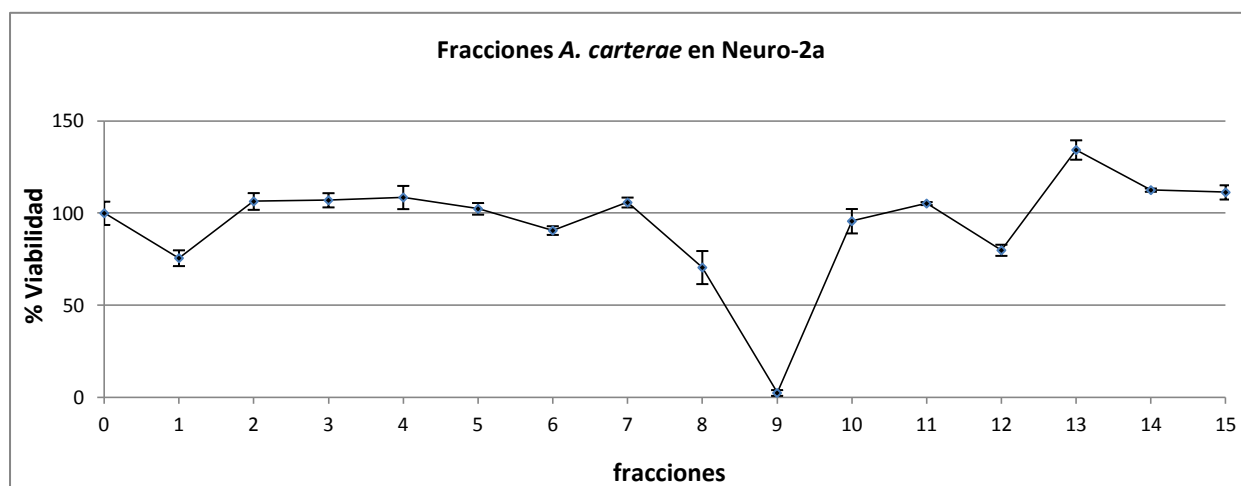


Figura 30. Toxicidad exhibida por las fracciones del extracto de *A. carterae* sobre células Neuro-2a.

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

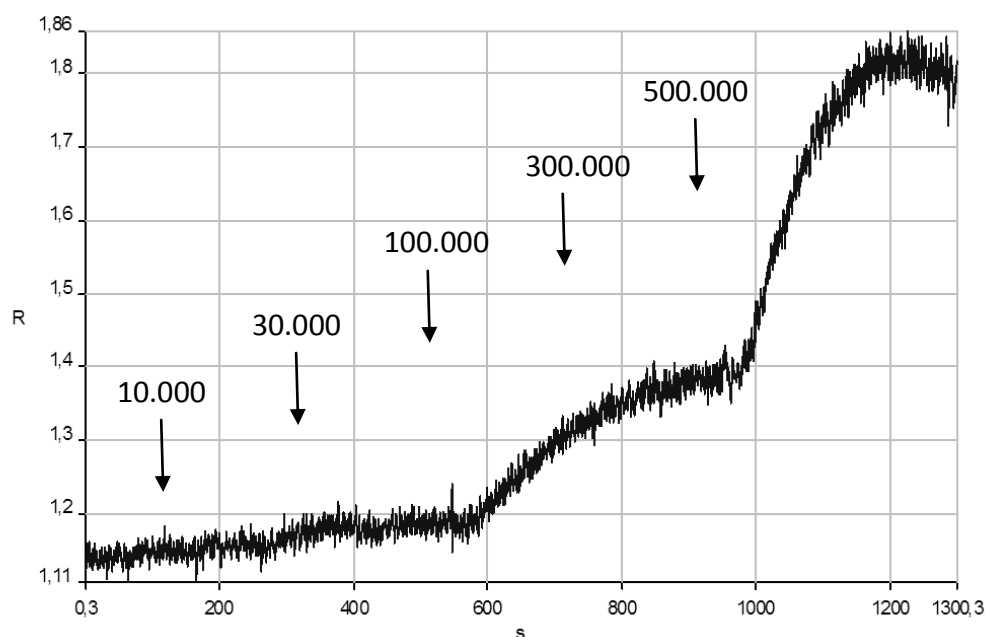


Figura 31. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de F9 sobre la concentración intracelular de calcio en CGC. En el gráfico se observa el incremento de fluorescencia (R) que indica el incremento del $[Ca^{2+}]_i$ a lo largo del tiempo cuando se añaden concentraciones de F9 en incremento desde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

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

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

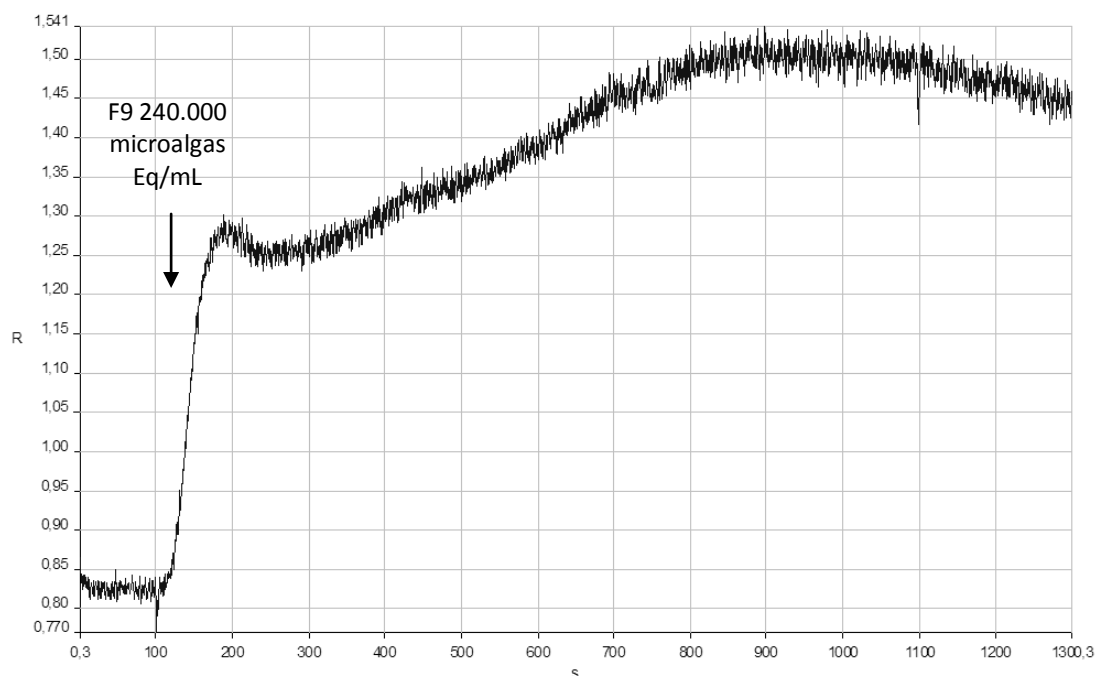


Figura 32. Evolución temporal de la concentración intracelular de Ca^{2+} a lo largo del tiempo cuando se añade F9. En el gráfico se observa el incremento de fluorescencia (R) que indica el incremento del $[Ca^{2+}]_c$ donde se observa la fase rápida y lenta provocada por la adición de F9.

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

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

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

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

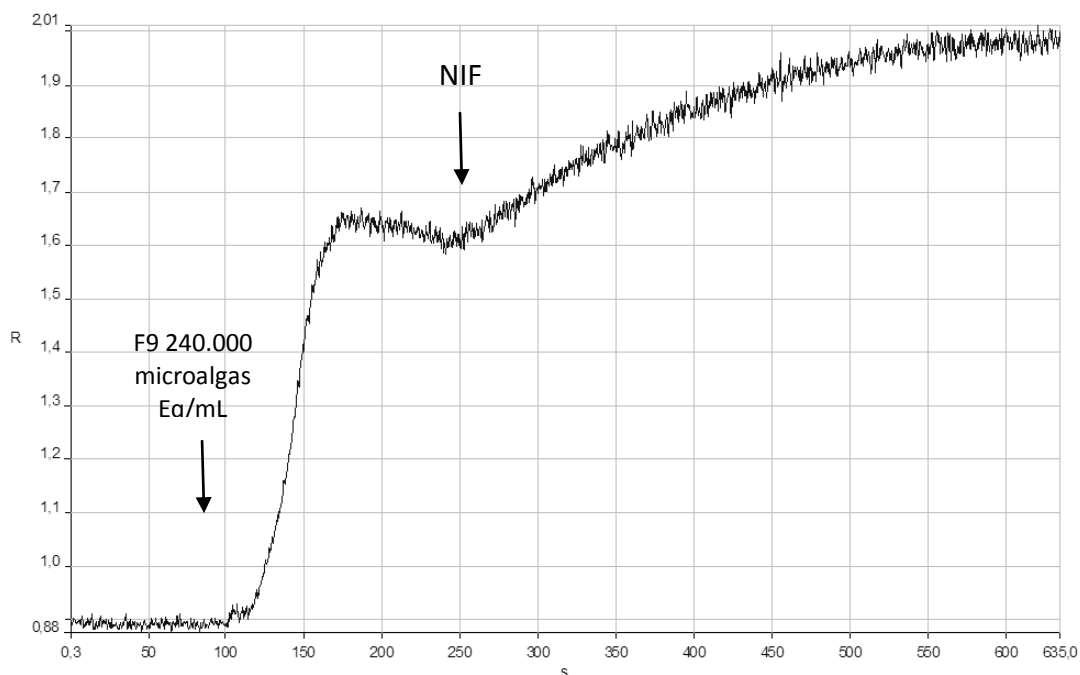


Figura 33. Efecto de nifedipino sobre la respuesta a lo largo del tiempo después de la adición de F9.

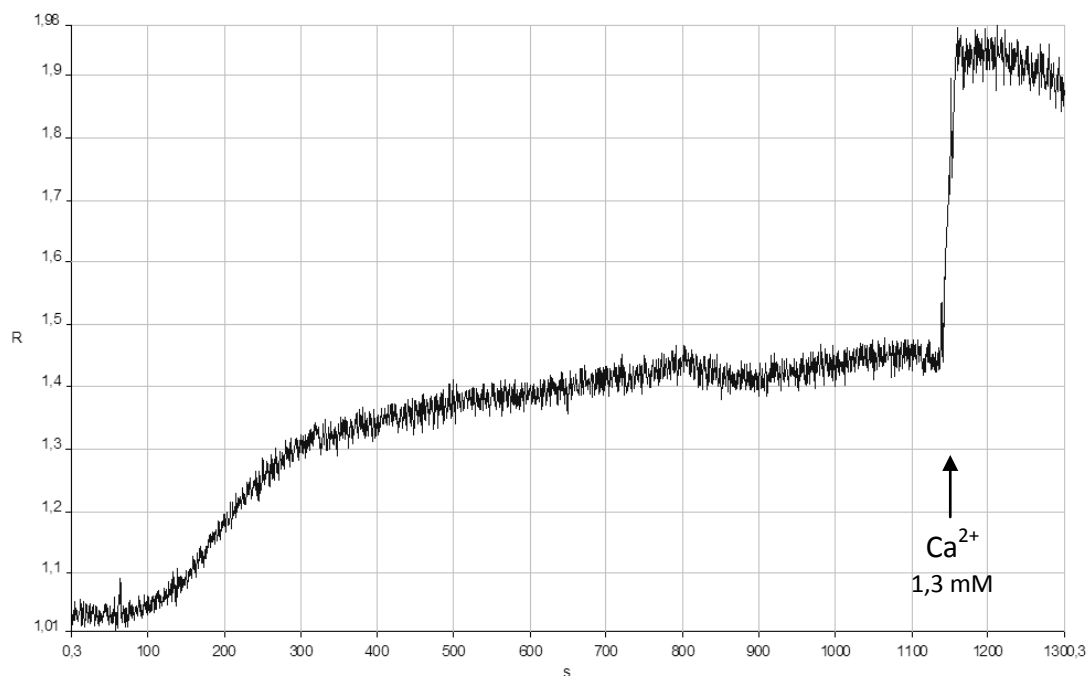


Figura 34. Tracing del incremento de $[Ca^{2+}]_c$ en CGC donde se representa efecto de la eliminación de Ca^{2+} extracelular y posterior reposición.

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

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

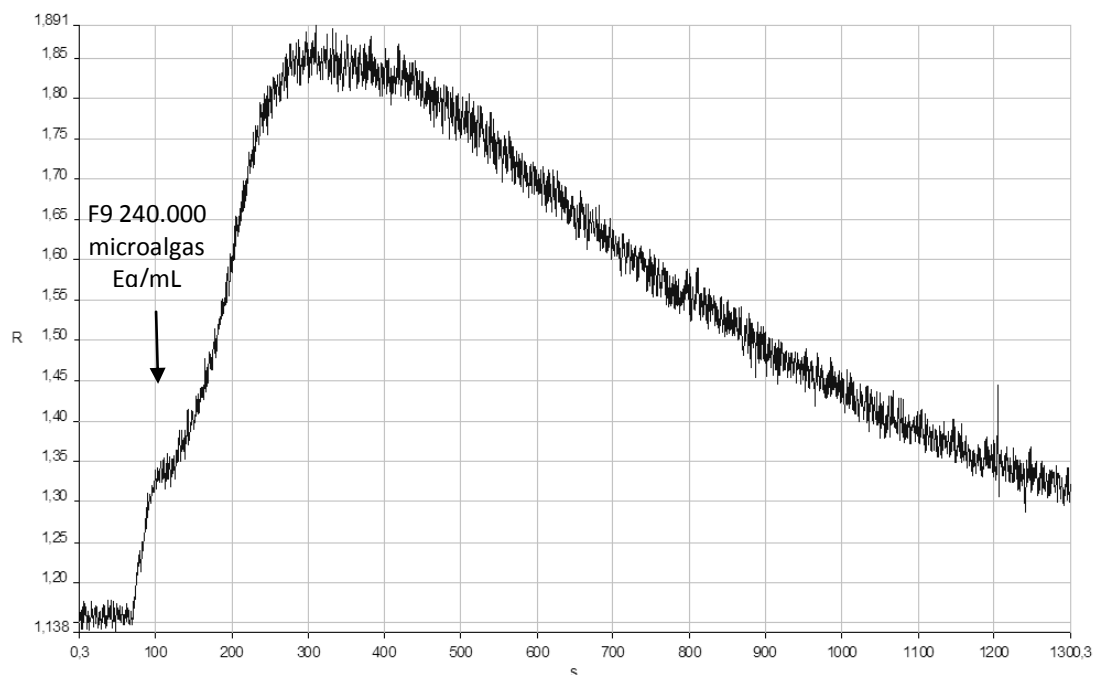


Figura 35. Evolución temporal de la señal en ausencia de sodio extracelular.

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

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

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

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

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

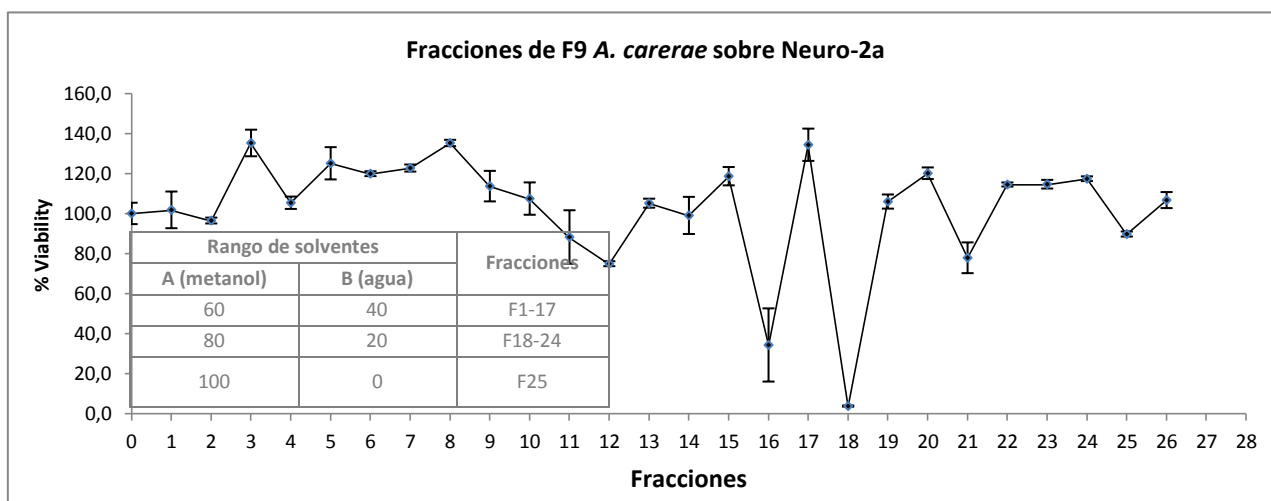


Figura 36. Fraccionamiento de la fracción 9 según el protocolo que aparece en la tabla adjunta a la figura.

2.1.2. *Karlodinium*

2.1.2.1. Toxicidad de extractos crudos de cultivos y muestras naturales

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

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

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

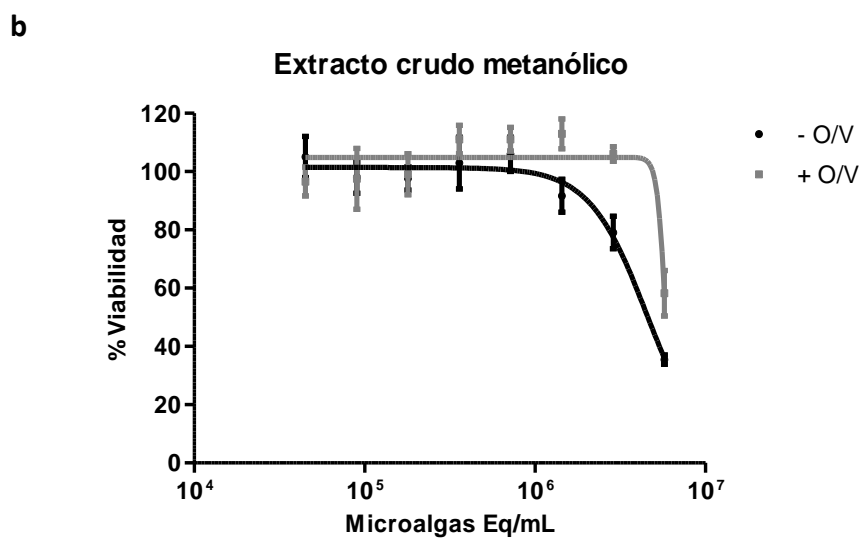
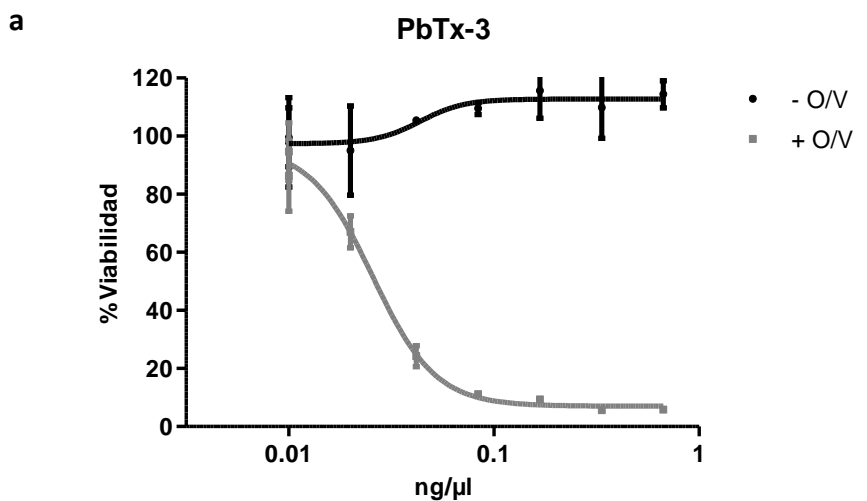
- Tanque de peces *Sparus aurata* en las instalaciones del IRTA (agua cruda, no filtrada).
- Balsa de sedimentación al final del circuito de la planta de acuicultura en el IRTA, donde se sedimenta el agua que sale de los tanques de peces, antes de ser devuelta otra vez al mar.

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

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

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

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



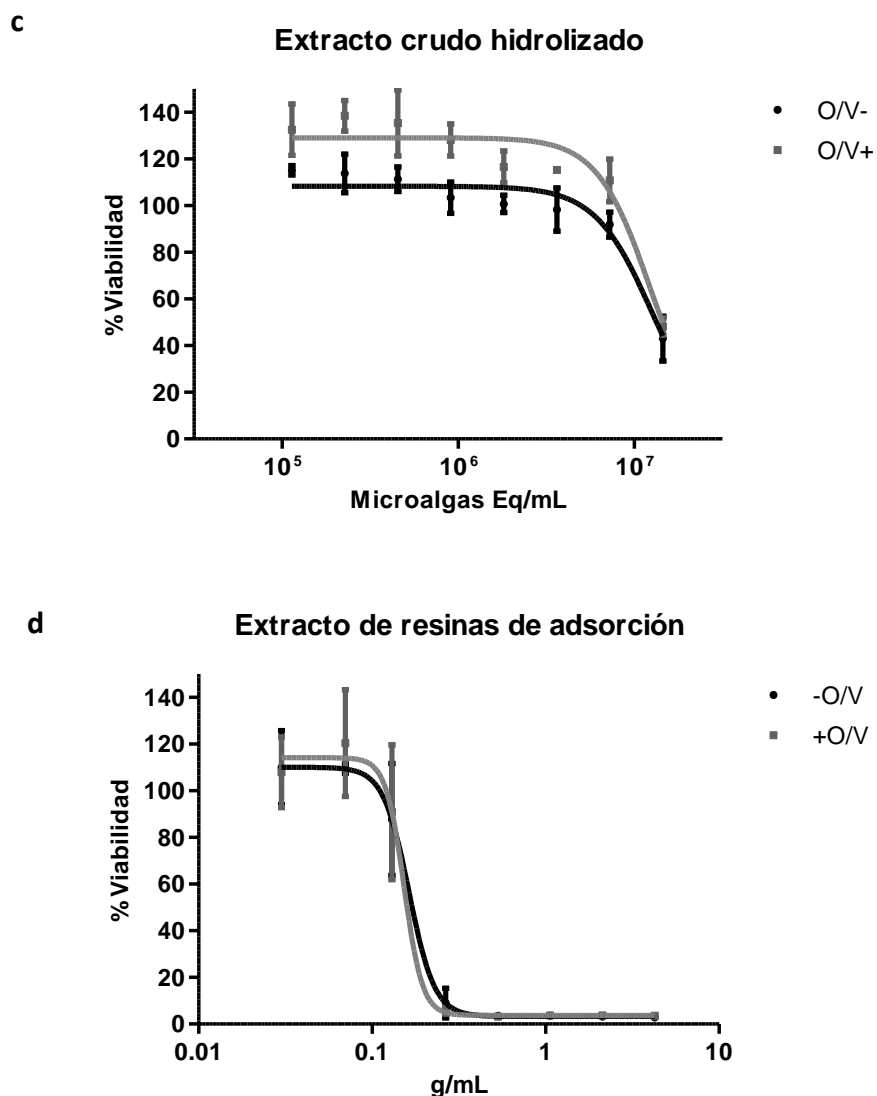


Figura 37. Curvas dosis-respuesta en presencia/ausencia de ouabaina y veratridina de: a) estándar de PbTx; b) el extracto crudo metanólico y c) hidrolizado y d) el extracto de las resinas de adsorción del medio, procedente de un cultivo de *K. veneficum*. Los ensayos fueron realizados al menos 3 veces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

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

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

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

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

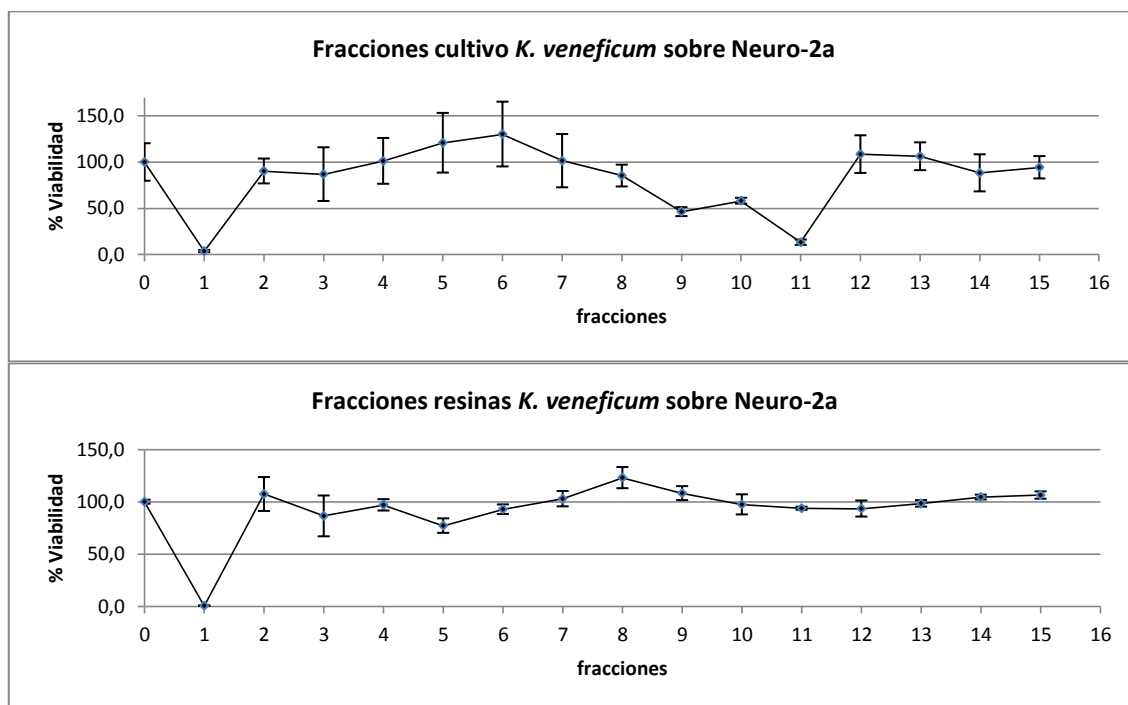


Figura 38. Fraccionamientos del extracto metanólico de *K. veneficum* (arriba) y del extracto procedente de las resinas SPATT®.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusión

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

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

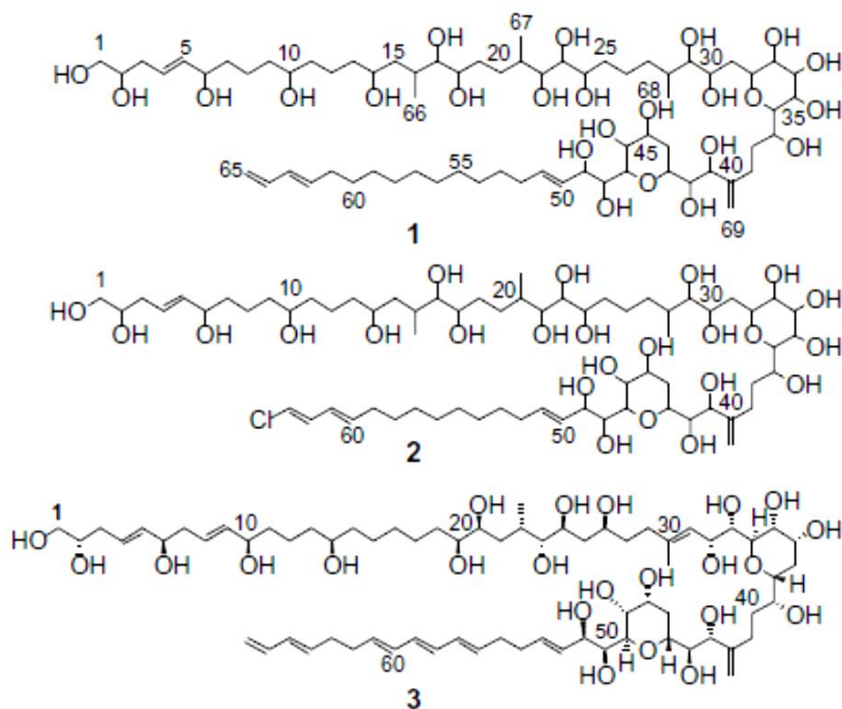


Figura 39. Estructuras de las karlotoxinas y amphidinol 3: 1) KmTx1; 2) KmTx2; 3) amphidinol 3.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

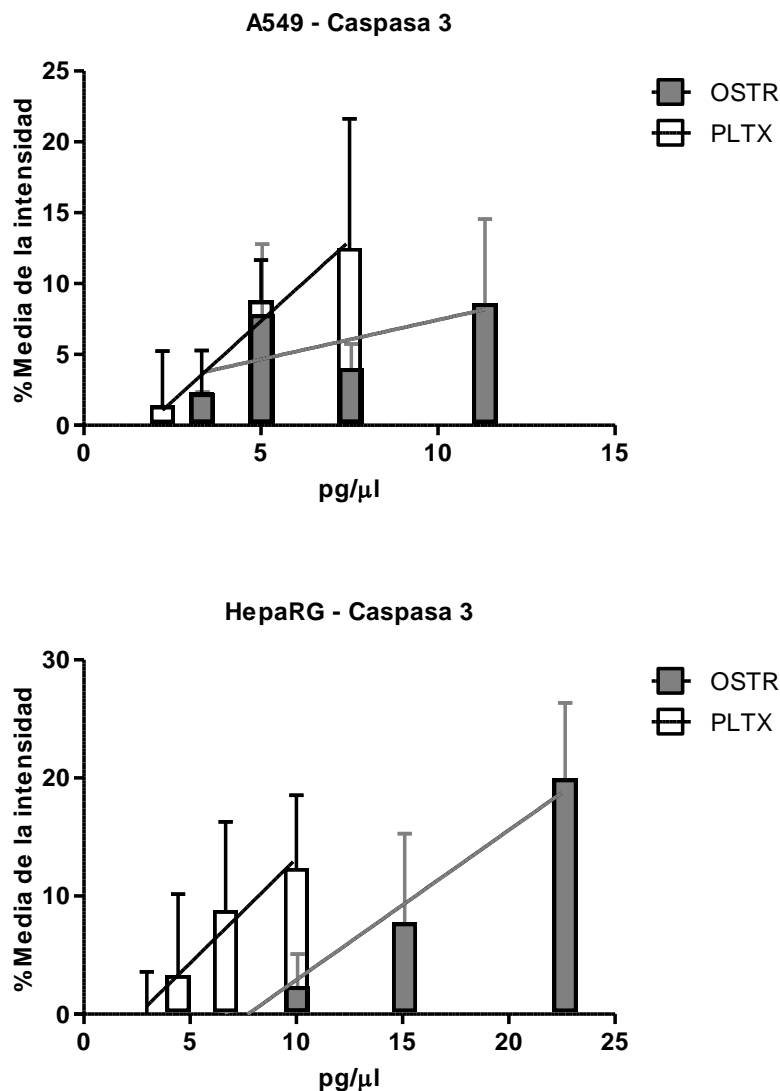


Figura 40. La intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias) refleja el incremento de caspasa 3. Las desviaciones estándar corresponden a la media de tres experimentos realizados de forma independiente, cada uno con tres réplicas de cada dosis.

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

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

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

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

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

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

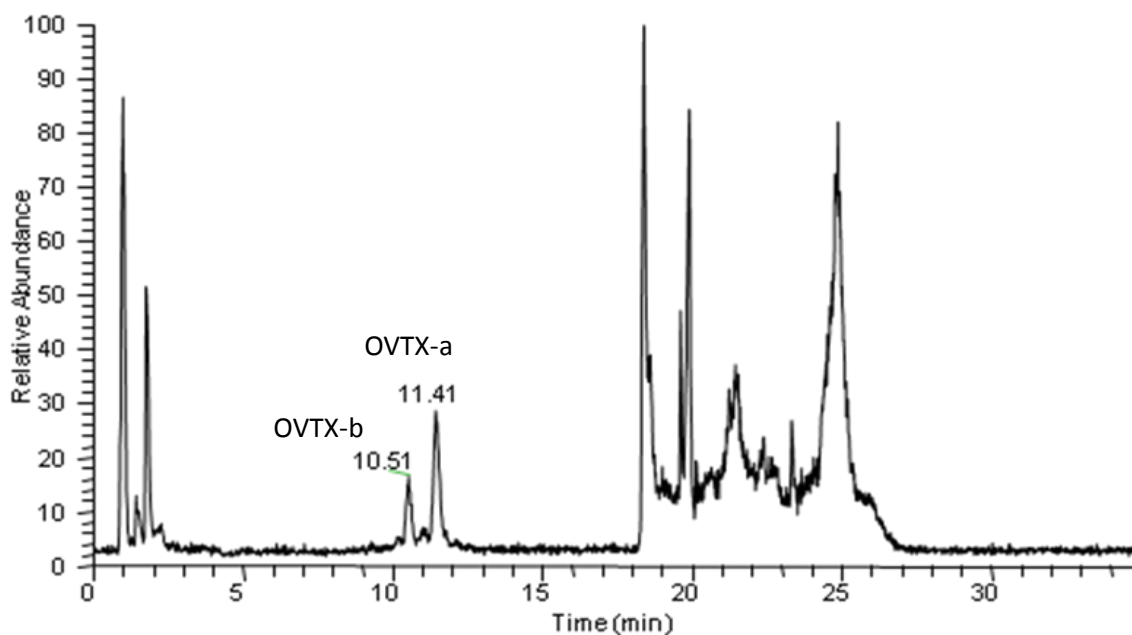


Figura 41. Cromatograma de OV-21 mostrando los picos correspondientes a OVTX-a y b.

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

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

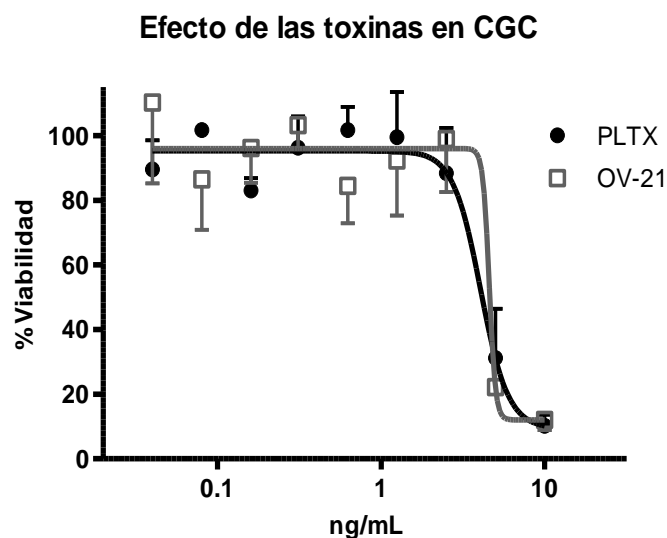


Figura 42. Viabilidad de CGC expuestas a PLTX o OV-21. Las desviaciones estándar corresponden a tres réplicas.

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

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

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

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

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

2.2.6.1. Potencial tóxico y reversibilidad

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

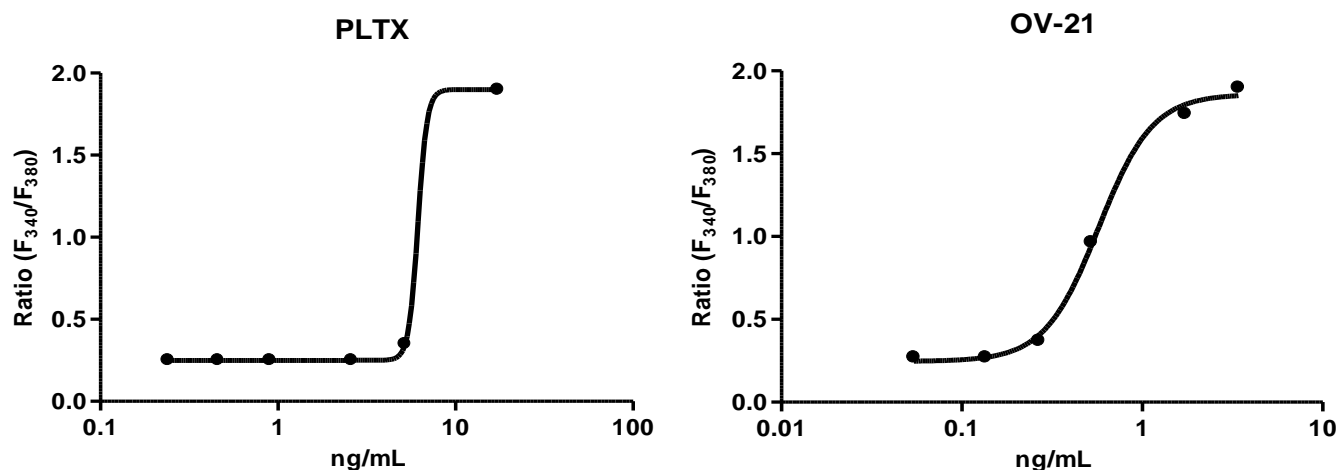


Figura 43. En la figura se representan las curvas dosis-respuesta donde se observa el incremento de fluorescencia, Ratio (F₃₄₀/F₃₈₀), o incremento de [Ca²⁺]_c en células CGC expuestas a concentraciones crecientes de PLTX y OV-21.

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

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

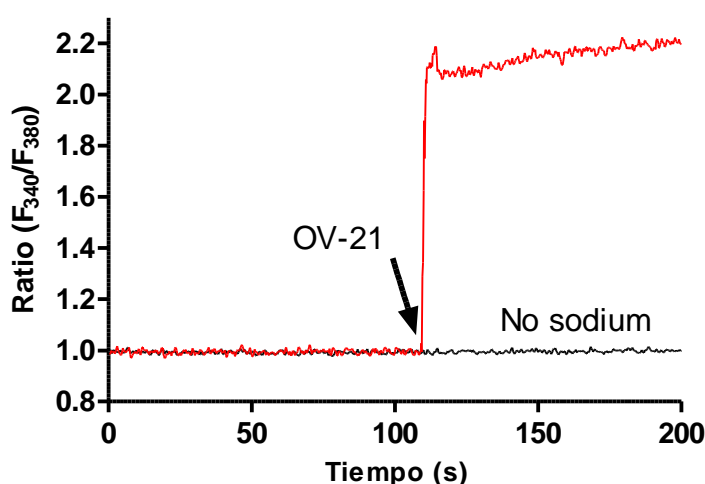


Figura 44. Incremento de Ca^{2+} intracelular después de la adición de OV-21 en un tampón completo en comparación con la ausencia total de respuesta cuando la adición se realizaba en un tampón sin Na^+ .

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

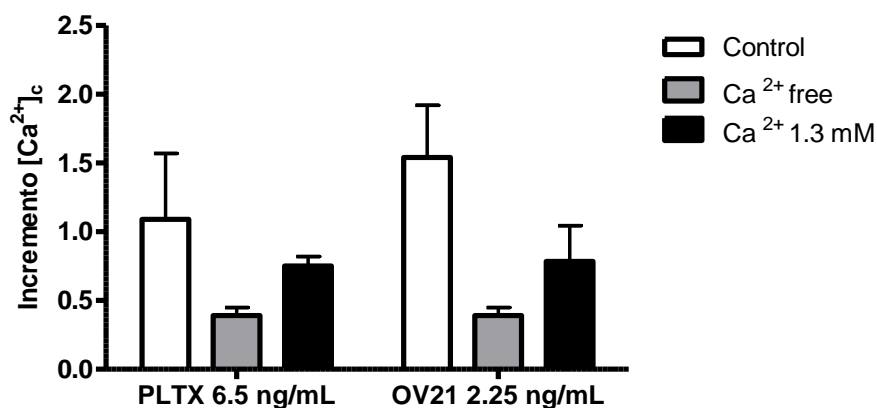


Figura 45. Incremento de $[Ca^{2+}]_c$ para la PLTX y OV-21 respecto al control, previamente y después de la adición del Ca^{2+} extracelular. Los valores representados son la media de de tres experimentos \pm SD.

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

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

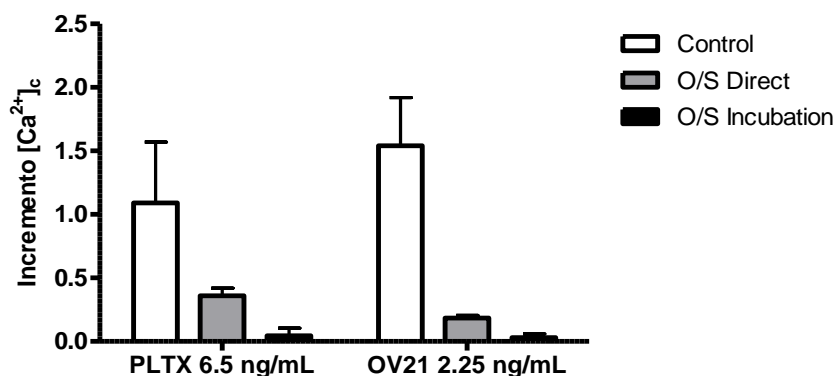


Figura 46. Efecto de la ouabaina + STX sobre el incremento de $[Ca^{2+}]_c$ inducido por la PLTX o OV-21 añadidos después de la adición de toxinas (O/S Direct) o antes (O/S incubación). La STX se añadía después de la ouabaina. Los antagonistas y las toxinas eran añadidos con una diferencia de 400 segundos,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

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

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

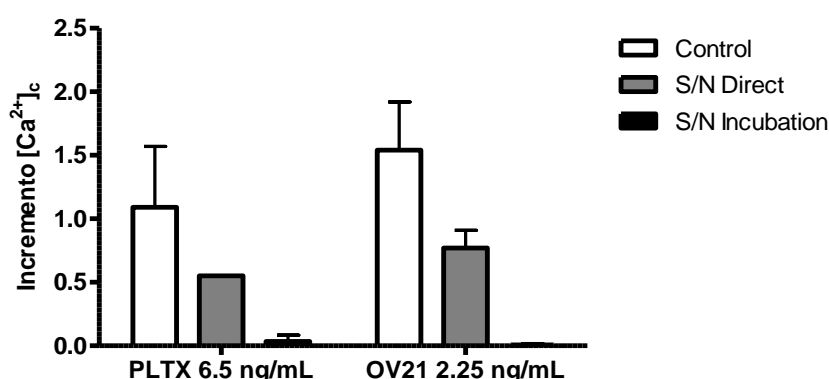


Figura 47. Efecto de la adición de los antagonistas cuantitativo sobre el $[Ca^{2+}]_c$ cuando los antagonistas STX y NIF se añadían previamente (S/N Direct) o después (S/N incubation) de la adición de las toxinas (PLTX o OV-21). Las barras representan la media de tres experimentos realizados de forma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

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

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

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

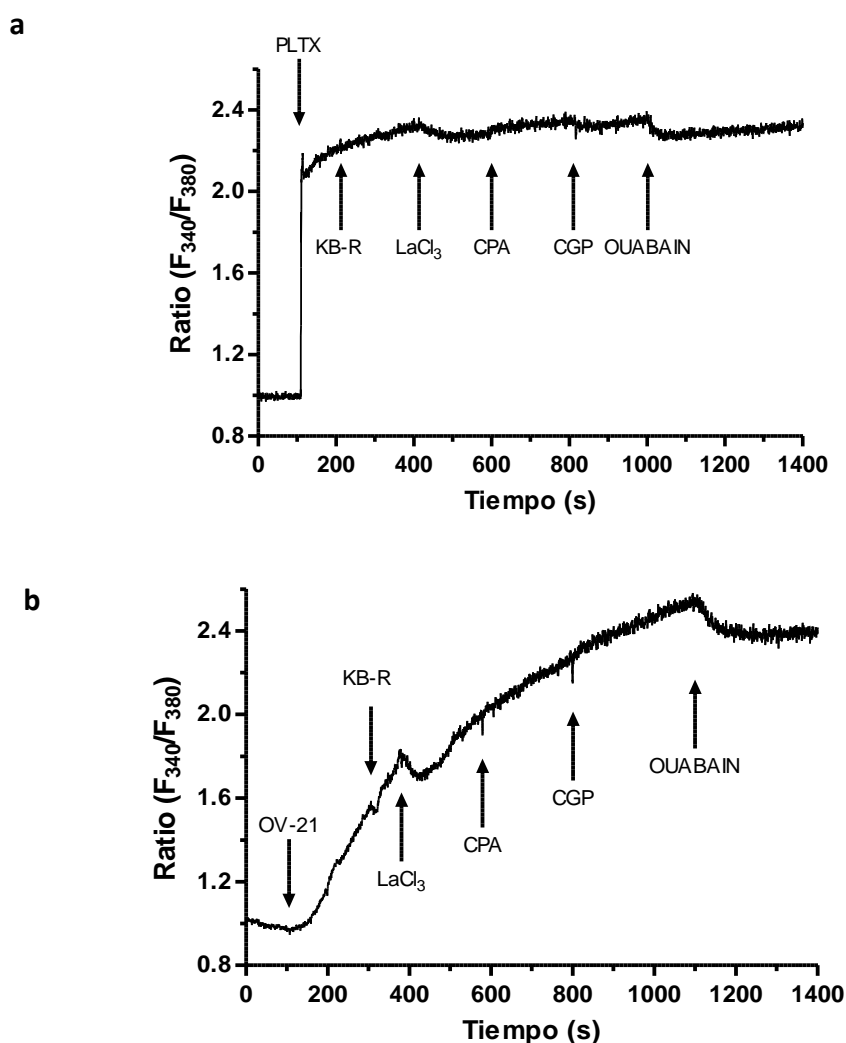


Figura 48. Efecto de diferentes moduladores de la homeostasis del calcio sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ inducido por a) PLTX o b) OV-21. Las toxinas y los antagonistas se añadieron con una diferencia de 200 segundos, aproximadamente.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

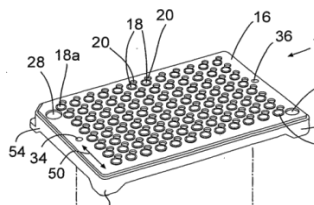
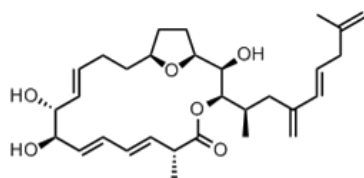
Otros autores han sugerido que la reversión del intercambiador de Ca^{2+} y Na^+ NCX es el responsable del gran incremento de $[Ca^{2+}]_c$ y posterior muerte celular (Sato et al., 2003; Shimahara y Molgó, 1990). Los experimentos con inhibidores de canales voltaje-dependientes de Ca^{2+} y Na^+ pretendían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

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

Conclusión

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

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS



DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Riesgo asociado a la ciguatera en Europa

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Riesgo asociado a intoxicación por ovatoxinas en Europa

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

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

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

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

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

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

Toxinas marinas como productoras de compuestos biológicos activos

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

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

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

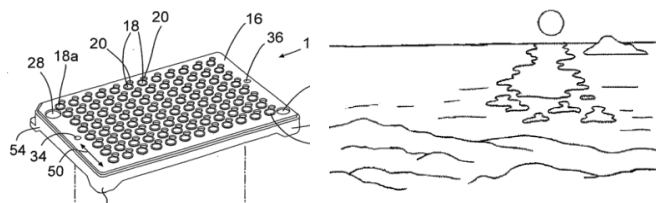
La escasez de estos estándares y las dificultades de su obtención son un problema actual ahora mismo en el mundo. Por ejemplo hoy en día existen pocos proveedores de PLTX comercial, que se obtiene mayoritariamente de *Palythoa toxica* o *P. turberculata*.

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

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

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

CONCLUSIONES GENERALES



CONCLUSIONES GENERALES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Listado de publicaciones y contribuciones científicas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

