

**MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TOXINAS  
MARINAS: RUTAS INTRACELULARES IMPLICADAS Y  
SU APLICACIÓN EN MÉTODOS DE DETECCIÓN**

*Asdo.*



**Andrea Fernández Araujo**

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

FACULTAD DE VETERINARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

2014

Prof. Dr. D. **Luis M. Botana López**, como Director de la tesis titulada: “Mecanismo de acción de las toxinas marinas: rutas intracelulares implicadas y su aplicación en métodos de detección”.

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis presentada por Doña Andrea Fernández Araujo es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctoramiento*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que la doctoranda tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como non doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis será presentado por ninguno de ellos en otra tesis de Doctoramiento, lo que firmo bajo mi responsabilidad.

Santiago de Compostela, a 5 de Octubre de 2014.

**Luis M. Botana López**  
Doctor en Farmacia  
Codirector de tesis

**Andrea Fernández Araujo**

Dra. Dña. **Amparo Alfonso Rancaño**, como Directora de la tesis titulada: "Mecanismo de acción de las toxinas marinas: rutas intracelulares implicadas y su aplicación en métodos de detección".

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis presentada por Doña Andrea Fernández Araujo es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctoramiento*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que la doctoranda tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como non doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis será presentado por ninguno de ellos en otra tesis de Doctoramiento, lo que firmo bajo mi responsabilidad.

Santiago de Compostela, a 5 de Octubre de 2014.

**Amparo Alfonso Rancaño**  
Doctor en Farmacia  
Codirector de tesis

**Andrea Fernández Araujo**

“Así como la locura, en un grado superior, es el principio de toda ciencia, así es la esquizofrenia el principio de todo arte, de toda fantasía”

Hermann Hesse, *El lobo estepario*



# Agradecimientos

## Gracias...

*En primer lugar, gracias Luis, por ofrecerme la posibilidad de realizar mi tesis en este laboratorio, tan rico en medios, como en calidad humana y profesional. Gracias por los consejos, por la atención y por tu implicación en cada proyecto.*

*Gracias Amparo, me enseñaste que cada artículo es un cuento, y conseguiste que me involucrara y me lo creyera. Además lo que soy y lo que sé lo debo en gran parte a ti. Gracias por esas discusiones científicas y no científicas, por el entusiasmo, por creer en mí y hacérmelo saber.*

*Gracias Diana, mi estancia en tu grupo fue breve, pero si estoy aquí es porque un día estuve ahí. Fue poco tiempo pero el cariño que recibí por todo el grupo hace que 4 años después aún me acuerde de vosotras.*

*Gracias chic@s, fue un placer trabajar con vosotros, compañeros de trabajo; y compartir actividades, fiestas y eventos extralaborales, amigos de Lugo. Son dos conceptos para las mismas personas. Fue una gozada encontrar un entorno tan agradable y cálido, vuestra ayuda y colaboración en el día a día hicieron que las dificultades se tornaran risas, anécdotas y batallas que nos unieron. Gracias Ara y Bea, por ser guías, maestras y amigas.*

*Gracias a mi clan y generación, Diego, Andrés, Sara, Jon... qué duros fueron esos congresos y qué difícil fue aguantaros cada día, qué horror tener que estar riendo a cada minuto. Muchísimas gracias por vuestra ayuda y ejemplo, puedo aseguraros que también de vosotros aprendí muchísimo, os admiro en lo personal tanto o más que en lo profesional. Marta, sé que te vienes conmigo para siempre, lo que unió Lugo, no lo va a separar el tiempo. Gracias por los ánimos, por tu fuerza, por tu atención y disponibilidad, por las juergas terapéuticas. María, puedo asegurar que gracias a ti no tuve periodo de adaptación en Lugo, desde el primer día me sentí como en casa, me abriste tu mundo nada más llegar. Muchísimas gracias por ser como eres, porque nuestra relación no se quedó en una recepción cordial, son cuatro años de amistad que van a durar muchísimos más. Entre todos conformasteis mi nueva familia lucense, y os prometo que me produce una pena enorme cerrar esta etapa. Por supuesto, gracias Ibán, polá túa comprensión e paciencia, por quitarlle amargura a este momento, pois unha época termina, pero ti fas que sexa especial a nova etapa que está por comezar.*

*Gracias a la gente de Vigo, punto de desconexión y vuelta al pasado. Amig@s de la infancia, tan distint@s hoy en día pero después de 20 años lo único que nos separa es la distancia de l@s que estáis lejos. Mari, Cris, compañeras de aventuras, desde África hasta América pasando por el Habana 20, muchísimas gracias por vuestro apoyo, atención y ánimos en la distancia, por las visitas, por involucraros en esto desde fuera. Rebe, Manu, gracias por darme una de las mayores alegrías de estos cuatro años, también fuisteis un apoyo muy importante durante este tiempo, sois estupend@s. Estí, Pitu, os echo mucho de menos, pero es increíble que cada vez que nos juntamos es como si no hubiera pasado el tiempo. Gracias porque los años no menguan el cariño. Pauliña, gracias por tu atención y cariño, tú mejor que nadie sabe lo que esto supone y lo que cuesta,*

*A mis padres, gracias, me ayudasteis sin decir nada, escuchasteis sin juzgar y haciéndome sentir vuestro apoyo de forma constante, vuestras palabras siempre me llegaron llenas de energía y fuerza para continuar adelante cuando venía una subida en el camino. Benja, gracias por esas visitas, sobre todo al principio, por tu atención constante. Gracias familia, por las cañas de fin de semana donde nos poníamos al día y arreglábamos el mundo.*

*A mis abuelos, gracias por vuestra sabiduría y buen humor, por los chistes, por los pareados improvisados. Madrina, gracias porque cada día contigo sea una sucesión de sinsentidos con los que desconectar. Ayudáis a que la vida siga siéndolo, al margen de las dificultades profesionales.*



Resumen

## Resumen

La tesis doctoral “Mecanismo de acción de las toxinas marinas: rutas intracelulares implicadas y su aplicación en métodos de detección” pone de relevancia la utilidad y necesidad del conocimiento del mecanismo de acción de las toxinas de origen marino. Para ello, se realiza un estudio a fondo sobre las rutas intracelulares que activa la yesotoxina (YTX), un compuesto poco tóxico pero con una actividad muy útil para estudios del metabolismo celular y descubrimiento de nuevas rutas o dianas con posibles fines terapéuticos. Se profundiza en el estudio de las rutas de muerte celular que activa la YTX, y se observa cómo este efecto es exclusivo de una línea celular tumoral, mientras que en otras células con o sin capacidad de división, este compuesto no resulta tóxico. Una vez se conoce bien el mecanismo de acción de las toxinas marinas, se pueden desarrollar métodos para detectarlas basados en su función. Así en el caso de la palitoxina (PLTX), cuya diana está perfectamente descrita, se diseñan métodos de detección funcionales para prevenir posibles intoxicaciones, ya que esta toxina es muy potente. Los métodos que se desarrollan en esta tesis se basan en la afinidad que existe entre la PLTX y su diana, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, y esta unión se cuantifica mediante un biosensor de afinidad, o a través de la polarización de la fluorescencia (FP) del complejo PLTX-intercambiador. Además los organismos del género *Ostreopsis* sp. que producen análogos de la PLTX, son especies emergentes que están aumentando su incidencia por todo el planeta. Por ello se estudia el crecimiento y la producción de toxina bajo diferentes parámetros para determinar las condiciones óptimas de temperatura, salinidad y ciclos de luz:oscuridad para estos dinoflagelados. La toxina se cuantifica usando el método de FP diseñado previamente.

## Palabras clave

Yesotoxina, palitoxina, mecanismo de acción, método de detección, rutas celulares.

## Resumo

A tese doutoral “Mecanismo de acción das toxinas mariñas: camiños intracelulares implicados e a súa aplicación en métodos de detección” manifesta a utilidade e necesidade do coñecemento do mecanismo de acción das toxinas de orixe mariña. Realízase un estudo a fondo sobre os camiños intracelulares que activa a yesotoxina (YTX), un composto pouco tóxico pero cunha actividade moi útil

para estudar o metabolismo celular e descubrir novos camiños ou albos con posibles fins terapéuticos. Profúndase no estudo dos camiños de morte celular que activa a YTX e obsérvase como este efecto é exclusivo dunha liña celular tumoral, mentres que noutras células con ou sen capacidade de división, o composto non resulta tóxico. Unha vez ben coñecido o mecanismo de acción das toxinas mariñas, pódense desenvolver métodos para detectalas baseados na súa función. Así, no caso da palitoxina (PLTX), cun alvo perfectamente descrito, deséñanse métodos de detección funcionais para previr posibles intoxicacións, xa que esta toxina é moi potente. Os métodos desenvolvidos nesta tese baséanse na afinidade que existe entre a PLTX e o seu alvo, a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, e esta unión cuantifícase mediante un biosensor de afinidade ou a través da medición da polarización da fluorescencia (FP) do complexo PLTX-intercambiador. Ademais, os organismos do xénero *Ostreopsis* sp. que producen análogos da PLTX son especies emerxentes que están aumentando a súa incidencia por todo o planeta. Por iso, estúdase o crecemento e produción da toxina baixo diferentes parámetros para determinar as condicións óptimas de temperatura, salinidade e ciclos de luz: escuridade para estas microalgas. A toxina cuantifícase usando o método de FP deseñado previamente.

### Palabras chave

Yesotoxina, palitoxina, mecanismo de acción, método de detección, camiños celulares.

### Summary

The thesis “Mechanism of action of marine toxins: intracellular pathways involved and its application in detection methods” shows the importance of the knowledge of the marine toxins mechanism of action. In this sense, a thorough study over intracellular pathways activated by Yessotoxin (YTX) is performed. This compound has a low toxicity but it is very interesting to study the metabolism of cells or new targets and intracellular pathways with therapeutic purposes. The study of cell death pathways activated by YTX are developed, and it was found an effect that exclusively targets on tumor K-562 line, while other cells with or without mitotic division ability, the compound is not toxic. Once the mechanism of action of marine toxins is known, detection methods based on the toxin function can be developed. In this sense, since the palytoxin (PLTX) target is known, functional detection methods are developed to prevent intoxications by this toxin, since it exhibits high toxicity. The methods designed in this work are based on the affinity between PLTX and its

target, the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump, and this junction is quantified by a SPR biosensor or by fluorescence polarization (FP) measurements from the PLTX-exchanger complex. Moreover, the producers of PLTX, *Ostreopsis* sp., are emerging species that are increasing the episodes around the world. Therefore, the growth and toxin production by these organisms under different parameters of temperature, salinity and light:dark cycles are studied to elucidate the optimal conditions for these dinoflagellates. The toxin production was quantified by using the FP technique designed previously.

### **Key words**

Yessotoxin, palytoxin, mechanism of action, detection method, cellular pathways.





# Abreviaturas y acrónimos

ADP:	Adenosina difosfato.
AIF:	Factores de inducción de apoptosis.
AKAP:	Proteína de anclaje de la kinasa A.
AMP:	Adenosina monofosfato.
AMPA:	Ácido propiónico alfa-amino-3-hydroxi-5-metil-4-isoxazol.
AMPc:	Adenosina monofosfato cíclico.
Apaf:	Factor activador de proteasa.
ARfD:	Dosis de referencia aguda.
ASP:	Intoxicación amnésica por consumo de molusco.
ATP:	Adenosina trifosfato.
AZA:	Azaspirácido.
BA:	Ácido belizeánico.
BTX:	Brevetoxina.
C-CTX:	CTX del Caribe.
CFP:	Intoxicación ciguatérica por consumo de molusco.
Cl:	Imina cíclica.
CREB:	Elemento de unión de respues al AMPc.
cPKC:	PKC clásica.
Cs:	N-sulfocarbamoil-11-hidroxisulfatotoxina.
CTX:	Ciguatoxina.
DA:	Ácido domoico.
DISC:	Complejo de inducción de señal de muerte.
DR:	Receptor de muerte.
DSP:	Intoxicación diarreica por consumo de molusco.
DTX:	Dinofisistoxina.

EFSA:	Autoridades de seguridad alimentaria en Europa.
ELISA:	Ensayo inmunológico unido a enzima.
eq:	Equivalente.
FP:	Polarización de la fluorescencia.
GTX:	Gonyautoxina.
HAB:	Floración de algas nocivas.
HEK 293:	Línea embrionaria humana de riñón 293.
hERG:	Canal de sodio de la línea embrionaria humana de riñón.
HPLC:	Cromatografía líquida de alta presión.
HPLC-UV:	HPLC detectada por ultravioleta.
I-CTX:	CTX del Índico.
ip:	Intraperitoneal.
KA:	Ácido kaínico.
$K_D$ :	Constante de disociación de equilibrio cinético.
$K_{obs}$ :	Constante de unión.
L:	Ligando.
LC:	Cromatografía líquida.
LC3:	Cadena ligera 3.
LC-FL:	LC detectado por fluorescencia.
LC-MS:	LC detectada por espectrometría de masas.
LC-UV:	LC detectada por ultravioleta.
$LD_{50}$ :	Dosis letal del 50% de la población.
$LD_{99}$ :	Dosis letal del 99% de la población.
LDH:	Lactato deshidrogenasa.
LDLR:	Receptor lipoproteico de baja densidad.

LOD:	Límite de detección.
LOQ:	Límite de cuantificación.
MBA:	Bioensayo con ratón.
McTX:	Mascarenotoxina.
MTX:	Maitotoxina.
mTOR:	Diana mecánica de la rapamicina.
NMDA:	N-methyl-D-aspartate .
NSP:	Intoxicación neurotóxica por consumo de molusco.
OA:	Ácido okadaico.
OVTX:	Ovatoxina.
PARP:	Poly(ADP)-ribosa polimerasa.
P-CTX:	CTX del Pacífico.
PDE:	Fosfodiesterasa.
PK:	Proteína kinasa.
PKA:	Proteína kinasa A
PKC:	Proteína kinasa C.
PKCδ:	PKC delta, del grupo de las PKC nuevas.
PLTX:	Palitoxina.
PM:	Poros mitocondrial.
PP:	Fosfatasa de proteína.
PSP:	Intoxicación paralizante por consumo de molusco.
PTX:	Pectenotoxina.
RIP:	Proteína kinasa de interacción con el receptor.
SPR:	Superficie resonante de plasmón.
STX:	Saxitoxina.

TEF:	Factor de equivalencia tóxica.
TfR:	Receptor transferrina.
TNFR:	Receptor factor de necrosis tumoral.
VGCC:	Canales de calcio dependientes de voltage.
VGPC:	Canales de potasio dependientes de voltage.
VGSC:	Canales de sodio dependientes de voltage.
YTX:	Yesotoxina.





Índice

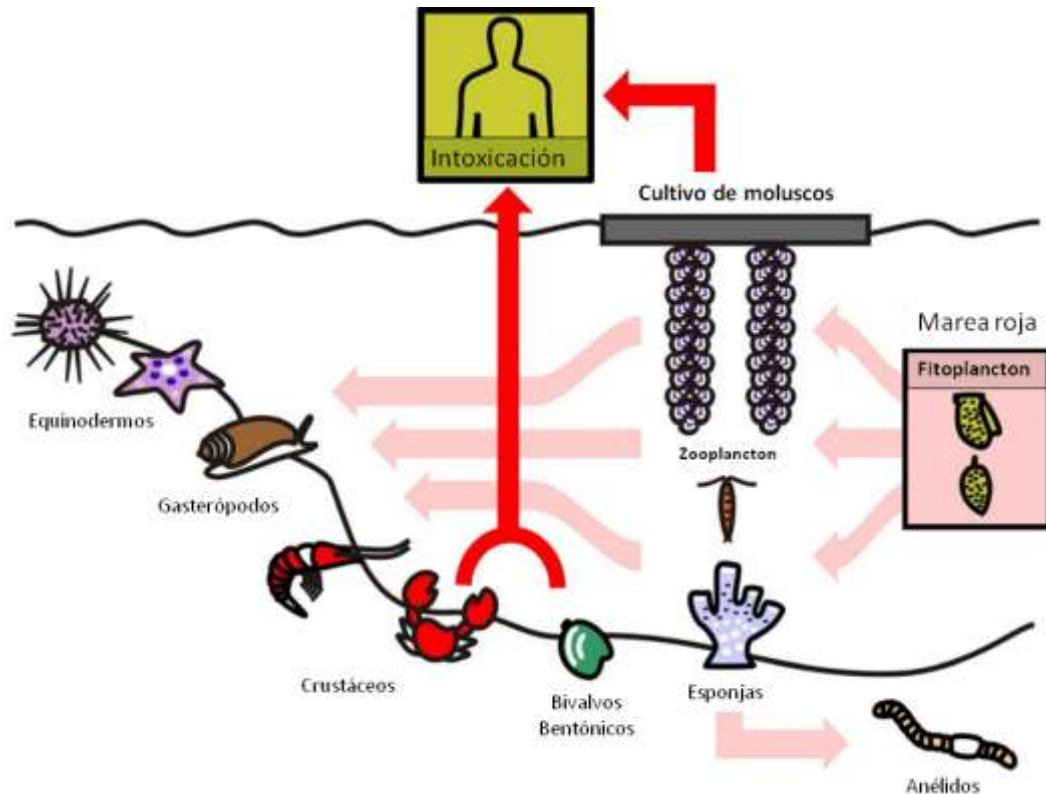
1. Introducción.....	1
1.1 Fitoplancton.....	3
1.2 Clasificación de las toxinas marinas.....	8
1.2.1 Toxinas hidrofílicas.....	10
1.2.2 Toxinas lipofílicas.....	12
1.2.3 Toxinas anfifílicas.....	23
1.3 Rutas intracelulares implicadas en el mecanismo de acción de las toxinas marinas.....	27
1.4 Muerte celular programada.....	33
1.4.1 Muerte celular inducida por toxinas.....	36
2. Objetivo.....	40
3. Publicaciones.....	42
4. Discusión.....	181
5. Conclusiones.....	190
6. Bibliografía.....	192



# 1. Introducción

El mar puede ser una fuente de vida o de muerte, dar riquezas o destruir ciudades enteras. En cualquier caso, las regiones costeras, encuentran en el mar, la base económica para abastecer a gran parte de su población [1, 2]. Galicia es una región que limita con el mar a lo largo de una gran superficie debido a la forma característica de su litoral, que dibuja entrantes hacia el interior de la tierra, formando una cuenca fluvial donde desembocan diferentes ríos. Esta particular forma de la costa, se denomina *Ría*, y genera en su interior unas condiciones que permiten que Galicia sea el principal productor de mejillón en Europa [3]. Uno de los parámetro más importantes que favorece la producción y crecimiento de estos moluscos en las *Rías*, es el afloramiento de aguas profundas hacia la superficie [4, 5]. Este fenómeno, denominado en inglés *upwelling*, hace que las aguas frías del fondo marino, ricas en sales y nutrientes, suban hacia la superficie favoreciendo así el cultivo de la especie *Mytilus galloprovincialis* [4, 6].

Sin embargo el sector productivo de estos moluscos es muy frágil, pues frecuentemente los polígonos de cultivo de mejillón se ven obligados a cerrar temporalmente la recogida del producto [7]. Esto se debe a la eclosión de lo que se conoce como “mareas rojas”, denominadas así porque la mayoría provocan una coloración roja en el agua, pero también pueden ocasionar coloraciones verdes, amarillas o marrones según la pigmentación del alga en cuestión [8]. En inglés se denominan *harmful algal blooms* (HABs), y consisten en el crecimiento exponencial de microalgas del fitoplancton productoras de compuestos altamente tóxicos [9]. Los mejillones son moluscos filtradores que se alimentan de estos organismos y acumulan en sus tejidos las toxinas que producen, sin sufrir ningún daño [10-12]. Así, estas moléculas tóxicas pueden incorporarse fácilmente a la cadena trófica y ser ingeridas por los seres humanos, tanto a través del consumo de mejillón como de otros productos del mar que las acumulan del mismo modo [13-16], suponiendo un gran riesgo para la salud pública.



**Figura 1: Diagrama de la distribución de las toxinas marinas y su llegada al ser humano a través de la cadena trófica.**

Para evitar intoxicaciones debidas a la ingesta de productos del mar contaminados, se ponen en marcha sistemas de monitoreo que evitan que estos productos lleguen al consumidor. Así cuando un episodio tóxico es detectado, se procede al cierre del polígono durante el tiempo que dure la HAB ocasionando importantes pérdidas económicas en el sector [7, 17].

### 1.1 FITOPLANCTON

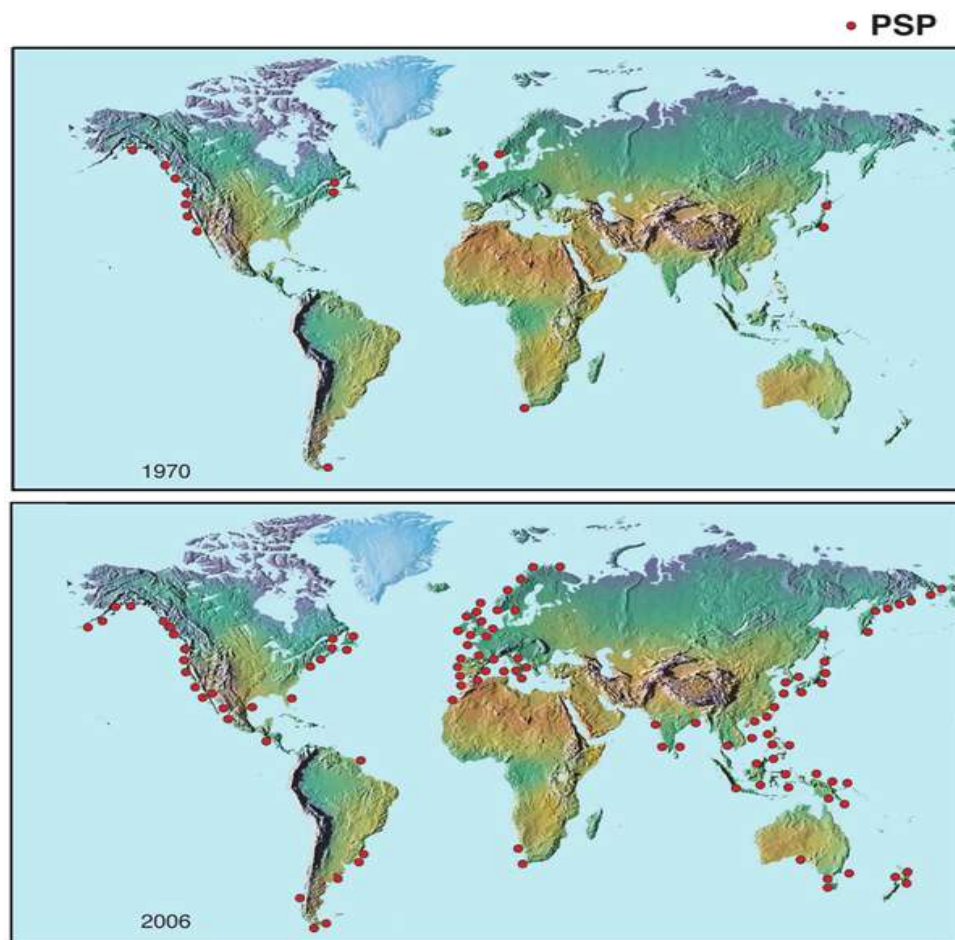
El fitoplancton engloba a un conjunto de algas unicelulares fotosintéticas entre las que se encuentran los dinoflagelados, las diatomeas y las algas verde-azuladas o cianobacterias, entre otros microorganismos [18]. Las especies que componen el fitoplancton, desempeñan un papel fundamental en la regulación del CO<sub>2</sub> atmosférico, fijando el carbono para llevar a cabo la fotosíntesis y liberando oxígeno al exterior [19-22]. Estas algas unicelulares habitan tanto en aguas dulces como marinas y producen metabolitos

secundarios de gran relevancia por sus efectos beneficiosos o perjudiciales para la salud [13, 23]. Las especies de microalgas que generan compuestos no tóxicos, poseen un gran potencial para la industria farmacéutica y alimentaria, que repercute en una mejora de la salud pública además de ser una fuente importante de ingresos económicos si se explotan adecuadamente [23]. Por otro lado, hay especies dentro de los microorganismos fitoplanctónicos que son perjudiciales para muchos seres vivos. En ocasiones, los daños que producen estas especies, pueden ser debidos a formas puntiagudas o espinosas en su estructura, que rasgan físicamente los tejidos de organismo superiores [8]. Otras veces, la toxicidad de las especies fitoplanctónicas, es debida a la producción de toxinas marinas que pueden ser almacenadas en organismos superiores que actúan como bioacumuladores de estos compuestos [13].

Las causas o factores que determinan la aparición de las HABs son variadas y aún desconocidas en su totalidad. Se sabe que las aguas estancadas, como estuarios o lagos, favorecen la acumulación de nutrientes, que junto con una baja tasa de movimiento de los dinoflagelados, puede incrementar la formación de las mareas rojas [24]. En este sentido, el movimiento del agua altera la disposición de los nutrientes, de la temperatura y de la luz para los microorganismos, por lo tanto las corrientes del agua son un parámetro que determina la dinámica de las poblaciones fitoplanctónicas [25, 26]. La disponibilidad de nutrientes también influye en el grado de proliferación de los microorganismos del fitoplancton, a pesar de que también en medios pobres en nutrientes pueden acumularse los dinoflagelados y dividirse exponencialmente [24]. No obstante, la eutrofización, o aumento de nutrientes en los ecosistemas en los que habitan las microalgas, siempre unido a otros parámetros, contribuye al crecimiento de estos microorganismos planctónicos dando lugar a las HABs [24, 27]. Además, la temperatura también es determinante en la eclosión de las mareas rojas, puesto que se han descrito en su mayoría en épocas de verano o más cálidas, coincidiendo con una mayor estratificación de la columna de agua [24].

Las especies de microalgas fitoplanctónicas que sintetizan toxinas marinas, constituyen un grupo muy amplio y variado. Además del riesgo que conlleva la aparición de HABs por la facilidad con la que las toxinas pueden llegar a los consumidores, el aumento en el número de eclosiones de mareas rojas, y en zonas donde nunca antes se detectaran, incrementan el riesgo que éstas suponen para la salud pública [8, 28, 29]. Así, especies del género *Prorocentrum* sp. que producen la toxina ácido okadaico (OA) han variado su distribución geográfica desde las costas de China, hacia regiones como el mar Báltico, el mar Egeo, el mar Adriático y el mar Negro en los últimos 20 años [30]. Mientras que los productores de los azaspirácidos (AZAs), las especies del género *Azadinium* sp. [31], son originarios del mar del Norte, pero están ampliamente distribuidos por el océano Pacífico, y han sido encontrados ejemplares en el mar del Sur en China [32]. Dentro del género *Dinophysis* sp. se encuentra la especie *D. fortii* que produce OA, dinofisistoxinas (DTXs) y pectenotoxinas (PTXs). Este género se encuentra ampliamente distribuido, pues hay registros de su presencia por todo el planeta [33, 34]. Por otro lado *Gambierdiscus toxicus* es el principal productor de ciguatoxinas (CTXs), gambierol y maitotoxinas (MTXs) [35, 36]. La distribución de esta especie confiere particularidades químicas a los compuestos que genera, pudiendo diferenciar entre CTXs del Pacífico, del Índico, o del Caribe [37]. El grupo de las iminas cíclicas (CIs) se divide en varios subgrupos, de los cuales el género *Gymnodinium* sp. produce la gymnodimina A, mientras que las pinnatoxinas y pteriatoxinas son producidas por el género *Pinna* sp. y las espiro-prorocentriminas por especies del género *Prorocentrum* sp. [15, 38-41]. El género *Alexandrium* sp. produce saxitoxinas (STXs) y espirólidos, estos últimos pertenecen al grupo de las CIs [38, 39, 42, 43]. Cabe destacar la versatilidad y la capacidad de adaptación de las especies del género *Alexandrium* sp. cuya distribución geográfica determina el tipo de toxina que producen, e incluso algunas regiones, las especies no son tóxicas [44]. En este contexto, se ha descrito *A. ostenfeldii* que produce los espirólidos por zonas del mar Báltico, Nueva Zelanda y la Costa del norte de Escocia. Mientras que *A. tamarense*, el

principal productor de saxitoxinas, se distribuye mayormente por las costas de América del norte, Europa del este y zonas tropicales y templadas de Asia y Tasmania [44]. Las STXs desarrollan el síndrome de la intoxicación paralizante por consumo de molusco (paralytic shellfish poisoning, PSPs). Los microorganismos que producen estas toxinas han variado su distribución desde la costa oeste de América en 1970 a diferentes localizaciones por todo el planeta en 2006 (Figura 2) [42, 43].



**Figura 2: Cambio del patrón de distribución de PSPs entre el 1970 y 2006 [45].**

La diatomea *Pseudo-nitzschia multiseries* se encontraba típicamente en el hemisferio norte, sin embargo se identificó también en las costas australianas [46]. Esta especie junto con el género *Nitzschia* sp. produce el ácido domoico (DA) [47-49]. Finalmente, el género *Ostreopsis* sp. que produce las palitoxinas (PLTXs), se distribuye ampliamente por zonas tropicales y subtropicales, pero en los últimos años ha incrementado su

incidencia en regiones de aguas más frías aumentando su distribución por diferentes zonas del planeta [50-52]. El estudio de la ecología y desarrollo de las especies de este género, es fundamental para intentar dilucidar las causas y parámetros que regulan sus floraciones [53, 54]. Este grupo de dinoflagelados son especies bentónicas, que crecen adheridas a las rocas, a macroalgas y a invertebrados, entre otras superficies [53, 55, 56]. Es común realizar un monitoreo de microorganismos del género *Ostreopsis* sp. usando el número de células por litro como parámetro para estimar su concentración en la columna de agua [57]. Sin embargo, debido a que estos dinoflagelados son bentónicos y crecen en agregados unidos por sustancias mucilaginosas, el conteo de células no es un parámetro fiable para estimar la densidad de población en el agua [58, 59]. Por ello, la muestra recogida no es representativa de la cantidad real de células, quedando muchas de ellas adheridas en diferentes superficies.

En la tabla 1 se recogen los géneros y especies más importantes de microalgas y los principales grupos de toxinas que producen.



Organismo productor	Toxina
<i>Dinophysis</i> sp. y <i>Prorocentrum</i> sp.	Ácido ocadico (OA) y Dinofisistoxinas (DTXs)
<i>Azadinium</i> sp.	Azaspirácidos (AZAs)
<i>Gymnodinium breve</i>	Brevetoxinas (BTXs)
<i>Protoceratium reticulatum</i> , <i>Lingulodinium polyedrum</i> y <i>Gonyaulax spinifera</i>	Yesotoxinas (YTXs)
<i>Dinophysis</i> sp.	Pectenotoxinas (PTXs)
<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Ciguatoxinas (CTXs) y Gambierol
<i>Gymnodinium</i> sp.	Iminas cíclicas: Gymnodimina A
<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	Iminas cíclicas: Espirólidos
<i>Pinna</i> sp.	Iminas cíclicas: Pinnatoxinas y Pteriatoxinas
<i>Prorocentrum</i> sp.	Iminas cíclicas: espiro-prorocentriminas
<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i> y <i>Nitzschia</i> sp.	Ácido domoico (DA)
<i>Alexandrium tamarense</i>	Saxitoxinas (STXs)
<i>G. toxicus</i>	Maitotoxinas (MTXs)
<i>Ostreopsis</i> sp.: <i>O. siamensis</i>	Palitoxinas (PLTXs)

**Tabla 1: Clasificación de las principales especies o géneros de microalgas productores de los diferentes grupos de toxinas marinas.**

En este contexto, el control del fitoplancton así como el de los organismos bioacumuladores de las toxinas es muy importante para la prevención de intoxicaciones. Por lo tanto, optimizar las técnicas de detección y monitorización de estos episodios tóxicos es crucial para la protección de la salud pública.

## **1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS TOXINAS MARINAS**

Las toxinas marinas se pueden clasificar en base a su mecanismo de acción [60], a su estructura química [18], al vector a través del cual se transmiten [61] o a los síntomas que provocan en humanos tras una intoxicación [62]. Según la sintomatología observada tras la intoxicación por consumo de moluscos contaminados, se han descrito cinco síndromes

asociados a diferentes grupos de toxinas marinas: intoxicación paralizante (paralytic shellfish poisoning, PSP), intoxicación diarreica (diarrhetic shellfish poisoning, DSP), intoxicación amnésica (amnesic shellfish poisoning, ASP), intoxicación neurotóxica (neurotoxic shellfish poisoning, NSP) e intoxicación ciguatérica (ciguateric fish poisoning, CFP) [62, 63]. Sin embargo, debido a la aparición de nuevas toxinas como gimnodiminas, espirólidos o AZAs, una clasificación basada en las propiedades químicas o estructura química, engloba mejor a todos los grupos de toxinas marinas descritos hasta el momento. En este sentido, se diferencian tres grandes grupos según el grado de solubilidad de las toxinas marinas en compuestos orgánicos: hidrofílicas, lipofílicas y anfifílicas [64]. Estos tres grupos albergan los siguientes subgrupos según su estructura química. Las toxinas hidrofílicas agrupan el DA y las STXs. Las toxinas lipofílicas están compuestas por el OA y las DTXs, los AZAs, las BTXs, las YTXs, las PTXs, las CTXs y las CIs. Y en las toxinas con carácter anfifílico se agrupan las MTXs y las PLTXs.

Toxinas hidrofílicas	Toxinas lipofílicas	Toxinas anfifílicas
DA (ASPs)	OA y DTXs (DSP)	MTXs
	AZAs	
	BTXs (NSP)	
	YTXs	
STXs (PSP)	PTXs	PLTXs
	CTXs (CFP)	
	CIs: gimnodiminas, espirólidos, pinnatoxinas y pteriatoxinas, espiroprorocentriminas.	

**Tabla 2: Clasificación de los principales grupos de toxinas marinas. Entre paréntesis están indicados los síndromes que producen.**

## 1.2.1 Toxinas hidrofílicas

### 1.2.1.1 Ácido domoico (DA)

El DA es un ácido tricarboxílico hidrosoluble que actúa igual que la toxina ácido kaínico (kainate acid, KA) [65, 66]. Ambos compuesto son análogos del glutamato, que es un neurotransmisor fundamental del sistema nervioso central [67, 68]. El mecanismo de acción del DA es a través de los receptores de glutamato, en concreto el receptor KA [69, 70]. Se han descrito hasta nueve isómeros geométricos del DA: el ácido 5'-epidomoico, y ocho ácidos isodomoicos A-H [71-73]. Algunos de los análogos, además de ser producidos por las diatomeas *Pseudo-nitzschia multiseries* y especies del género *Nitzschia* sp. también han sido aislados del alga roja *Chondria armata* [47-49, 71].

El DA ocasionó graves intoxicaciones debido a la ingesta de mejillón contaminado en 1987 en Canadá [74-76]. Hubo 107 víctimas con síntomas que afectaban multitud de órganos. Se registraron daños en el sistema gastrointestinal, en el sistema nervioso central y en el cardiovascular, y tres personas llegaron a perder la vida [70]. Sin embargo el síntoma más específico y peculiar de esta intoxicación es la pérdida de memoria, por ello el DA se denominó toxina amnésica [77]. Los síntomas aparecen entre 24 y 48 horas después de la intoxicación, y en el caso de Canadá se observaron asociados a dolor de cabeza, convulsiones, parálisis oculares y de extremidades, pudiendo llegar al coma en la fase aguda. Meses después, los pacientes aún sufrían problemas de memoria así como otros problemas cognitivos [78]. La dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>) del DA está en torno a los 4 mg/Kg peso corporal y la dosis de referencia aguda (acute reference dose, ARfD) es de 100 µg/Kg peso corporal para un adulto de 60 Kg. No se ha descrito el factor de equivalencia tóxica (Toxic Equivalence Factor, TEF) de los diferentes análogos [79].

Para detectar y cuantificar DA, se ha validado un método químico de cromatografía líquida de alta presión con detección por ultravioleta, HPLC-

UV, y un método basado en enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [79]. También se ha puesto a punto la detección por cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (Liquid chromatography-mass spectrometry) LC-MS, pero este método no ha sido validado en Europa [79]. El límite reglamentario según la legislación europea vigente para esta toxina es de 20 mg DA/Kg [80].

#### 1.2.1.2 Saxitoxinas (STXs)

El grupo de las STXs dan lugar al síndrome de las PSPs. Y su compuesto más activo, la STX, se aisló por primera vez en 1975 [81, 82]. Hasta ese momento, se sucedieron diferentes episodios de contaminación desde los años 20. No fue hasta 1984, que se asoció esta intoxicación paralizante con el consumo de mejillón contaminado, coincidiendo con una elevada concentración del dinoflagelado *Gonyaulax catenella* (o *Alexandrium catenella*) en el mar [42, 43]. Además del dinoflagelado *A. tamarense*, el grupo de las toxinas PSPs también es producido por otras especies de *Alexandrium* sp. y por las especies *Pyrodinium bahamense* o *Gymnodinium catenatum* [81, 83-85]. El compuesto más representativo de este grupo de toxinas es la STX, de la que se diferencian el resto de análogos por variaciones en cuatro radicales de la estructura central [86]. Entre los análogos descritos se encuentran seis Gonyautoxinas (GTX1-6), y las N-sulfocarbamoil-11-hidroxisulfatotoxinas (Cs) entre otras [81]. Las PSPs sufren biotransformación en organismos superiores tras su ingesta [81, 87]. Este proceso ocurre principalmente en bivalvos [88, 89], pero también se observa en otros organismos como la oreja de mar [14, 90] o algunas especies de cangrejo [16, 91]. La biotransformación de las PSPs, consiste en reacciones de reducción, oxidación o hidrólisis de la molécula original en el organismo que la incorpora [81]. Han sido descritos, en este contexto, más de 30 compuestos [87].

Las STXs poseen elevada afinidad por el sitio 1 de los canales de sodio ( $\text{Na}^+$ ) dependientes de voltaje (Voltage-gated sodium channel, VGSC) [92]. Estas toxinas bloquean los VGSC inhibiendo temporalmente la

permeabilidad al ión  $\text{Na}^+$ , evitando así la despolarización de la membrana, lo que produce una constante relajación que conduce a parálisis [92]. Debido a ello, los síntomas tras su ingesta se caracterizan por hormigueo y entumecimiento alrededor de los labios, que se extiende hacia cara y cuello, pinchazos en los dedos de pies y manos, náuseas, mareos y dolor de cabeza. Además de debilidad y dificultad al respirar que puede llevar a la muerte por parada respiratoria [62]. La  $\text{LD}_{50}$  para la STX es de  $10 \mu\text{g}/\text{Kg}$  peso corporal vía intraperitoneal (ip) en ratones, mientras que para un adulto de 60 Kg, la ARfD es de  $0.7 \mu\text{g}/\text{Kg}$  peso corporal. En base a los bioensayos de toxicidad, los TEF respecto a la STX de los diferentes análogos son: 1 para la STX, NeoSTX, GTX1 y dc-STX, mientras que el resto de análogos poseen  $\text{TEF} < 1$  [93, 94].

Los métodos de detección validados para la STX, son el bioensayo en ratón (MBA) y HPLC con detección por fluorescencia (HPLC-FL), con un límite de toxicidad máximo permitido en Europa de 0.8 mg equivalente (eq) STX/Kg [80, 93]. También hay métodos para detectar estas toxinas mediante el uso de anticuerpos, tipo ELISA, radioinmunoensayo o biosensor de afinidad SPR (Surface plasmon Resonance) [81, 93].

## 1.2.2 Toxinas lipofílicas

### 1.2.2.1 Ácido okadaico (OA)

El OA y las DTX-1, DTX-2 y DTX-3, son los compuestos principales de este grupo que provocan el síndrome DSP, y son producidas por las especies *D. fortii* y *P. lima* entre otras muchas [63, 95-97]. Además de este grupo de toxinas, también se han descrito otros análogos del OA como son el ácido belizeánico (belizeanic acid, BA) y el 19-epi-okadaico [98, 99]. El mecanismo de acción de las toxinas DSPs se basa en la inhibición de las fosfatasa de proteína serina/treonina (PPs) tipo 1 y 2A (PP1 y PP2A) [100]. Todos los análogos del OA comparten la misma diana a excepción de la DTX-3 para la que no se detecta actividad inhibitoria sobre las PPs [101]. La DTX-1 muestra una mayor afinidad e inhibición sobre la PP2A que el OA

[102]. Por otro lado, la DTX-2 muestra menos toxicidad así como menos afinidad por la PP2A que el OA [103]. Además, el BA inhibe las PP1, a pesar de tener una menor capacidad de inhibición de las PPs en general [98]. El ácido 19-epi-okadaico también es menos potente en la inhibición de PPs que el OA, pero en este caso, inhibe sobre todo la PP2A [99]. Como consecuencia, estas toxinas producen daños gastrointestinales, entre los que se encuentran diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal, tras la ingesta de la misma [104, 105]. Además de estos síntomas, las DSPs son potentes promotores tumorales [106-108]. La LD<sub>50</sub> obtenida vía ip en MBA con ratón es de 200 µg/Kg de peso corporal, a partir del que se calculan los siguientes TEF: OA=1, DTX1=1, DTX2=0.6 [94]. La ARfD para un adulto de 60 Kg es de 0.3 µg/Kg de peso corporal [109].

El método oficial de detección de las DSPs es el LC-MS/MS que fue validado recientemente por la comisión europea con un límite de toxicidad máximo de 0.16 mg eq OA/Kg [80, 110]. También se han diseñado ensayos basados en la función específica de las DSPs. Puesto que son inhibidores de las PPs, se ha utilizado esta capacidad para desarrollar métodos de detección colorimétricos y de fluorescencia [109, 111, 112]. Además las DSPs también se pueden detectar por inmunoensayo tipo ELISA [109, 113, 114].

#### 1.2.2.2 Azaspirácidos (AZAs)

Los AZAs deben su nombre a su estructura, que consta de un ensamblaje en espiral y un grupo azaspiro fusionado con un anillo 2,9-dioxobiclononano [12, 115]. El principal representante del grupo de los AZAs, se aisló por primera vez en el 1998 a partir de mejillones contaminados [12]. Se sabe que el dinoflagelado *A. spinosum* produce los análogos AZA1, AZA2, AZA33 y AZA34 [31, 116, 117]. Además, también se aislaron nuevos análogos, AZA36 y AZA37 de diferentes cepas de otra especie, *A. poporum* [117]. Se han descrito hasta 30 análogos de AZA, aunque se desconoce la estructura química y el microorganismo productor de algunos de ellos.

El mecanismo de acción de los AZAs se desconoce, a pesar de que se apuntan varios candidatos como posible diana de estas toxinas [118]. Los AZAs modifican la expresión de receptores de membrana, como el receptor lipoproteico de baja densidad (LDLR) en linfocitos T [119]. Por otro lado, alteran la monocapa que forman las células de cáncer de colon, Caco-2, cuando crecen, apuntando a las proteínas de adhesión celular como posible diana de los AZAs [120]. Modulan el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), el pH y el nucleótido cíclico adenosina monofosfato (AMPc) intracelular en linfocitos T [121-124]. A nivel neuronal, los AZAs también modulan el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, además de producir citotoxicidad en cultivo de neuronas neocorticales a través de la activación de apoptosis y necrosis [125, 126]. Recientemente, se ha observado la capacidad de algunos análogos de los AZAs para unirse y bloquear el canal de potasio ( $\text{K}^+$ ) hERG en la línea embrionaria de riñón humano 293 (HEK-293) [127].

Se han detectado numerosas intoxicaciones por AZAs, siendo el primer caso documentado en 1995 [118]. Los efectos por intoxicación con AZAs son muy parecidos a los que provocan las DSPs, con náuseas, diarrea y dolor abdominal, lo que dificulta diferenciar los episodios [115]. Además, también se han descrito daños neurológicos tras la administración de AZAs vía ip en ratones, caracterizados por lentitud, dificultad respiratoria, espasmos y muerte [115, 128]. La  $\text{LD}_{50}$  para los AZAs vía ip en ratón es de aproximadamente 100-200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  peso corporal para los que se obtiene un TEF respecto al AZA1 de: AZA2=1.8, AZA3=1.4, AZA4=0.4, AZA5=0.2 [94]. La ARfD para un adulto de 60 Kg de media es de 0.04  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  peso corporal [129].

El método oficial de detección de AZAs es el LC-MS/MS validado en 2011 por la Comisión Europea y su límite permitido es de 0.16 mg eq AZA/Kg [80, 110, 117, 129].

### 1.2.2.3 Brevetoxinas (BTXs)

Las BTXs son compuestos poliéter cíclicos metilados que causan el síndrome NSP [130]. Se suelen detectar en HABs de la zona de México y Florida, dando lugar a la denominada “Marea roja de Florida”, por su elevada ocurrencia en esa región [131, 132]. La primera floración de los microorganismos productores de NSPs descrita en Florida data del 1844, dañando gravemente la economía de esta región [133]. El primer caso bien documentado por intoxicación con NSPs se registra en Estados Unidos en 1987 [134], coincidiendo con el aislamiento por primera vez de uno de los análogos de las BTXs [135]. El grupo de las NSPs contiene más de 10 análogos [133, 136]. Hay dos moléculas principales, la BTX A cuya estructura es una columna flexible formada por 10 anillos poliéter, y la BTX B, que conforma una escalera rígida de 11 anillos [136]. Muchos de los análogos fueron aislados de mariscos, siendo algunos de ellos modificaciones metabólicas de las BTXs que se producen en animales [135, 136]. El análogo mayoritario es la BTX B en la que se engloban la BTX-1 y BTX-2 [136, 137]. Mientras que los compuestos más tóxicos son la BTX-2 y BTX-3 [13].

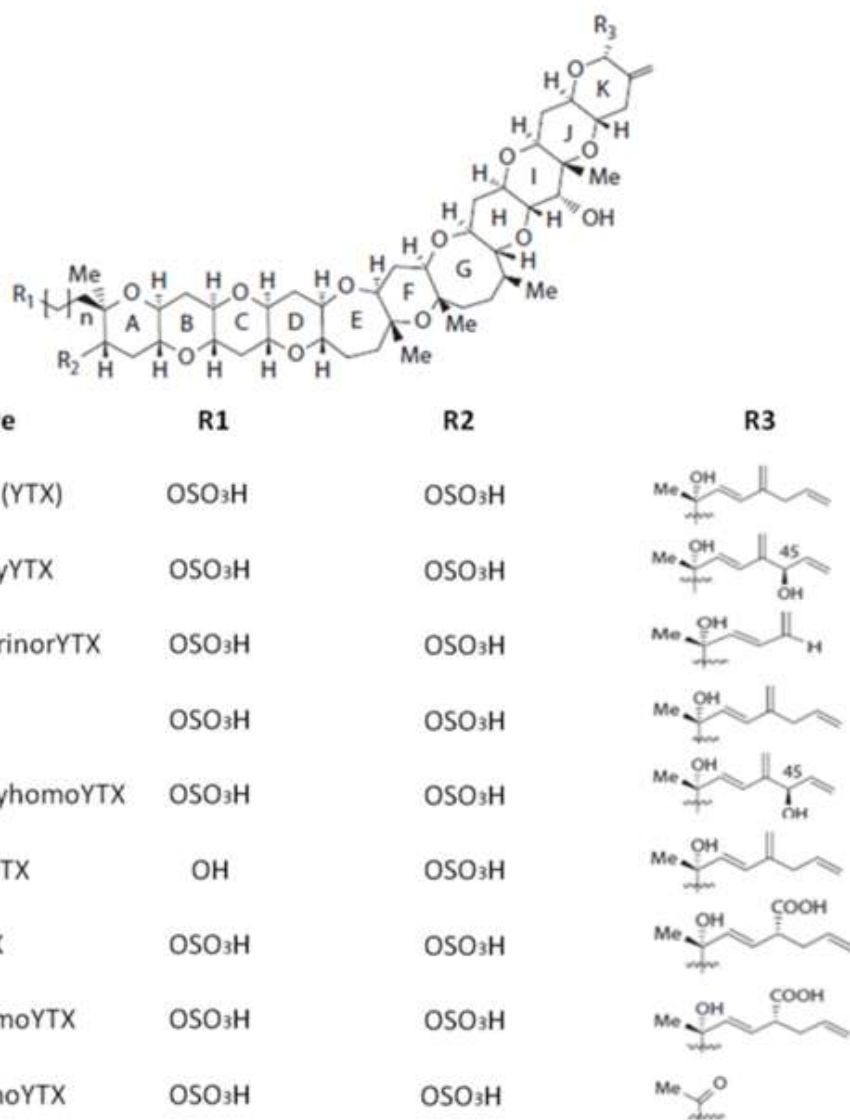
El mecanismo de acción de las toxinas NSPs se basa en su unión al sitio 5 de los canales VGSC [136, 138]. Además, su carácter liposoluble les permite atravesar la barrera hematoencefálica y distribuirse rápidamente por todo el cuerpo [133]. Los síntomas asociados a su intoxicación, varían desde náuseas, diarrea y vómitos, pasando por entumecimiento de extremidades y labios así como hormigueo, ataxia, pérdida de coordinación, parálisis y sensación de frío-calor; hasta dificultad para hablar, dolor de cabeza y fatiga, entre otros [133]. Mientras que las floraciones de algas productoras de BTXs generan elevada mortalidad de organismos marinos [139], las víctimas humanas se recuperan, en su mayoría, a los 2-3 días de la intoxicación [131, 133]. El envenenamiento por NSPs se debe mayormente al consumo de marisco, sobre todo almejas, ostras y mejillón, contaminado con las BTXs, aunque también hay daños por inhalación de la misma [133, 140, 141]. Se

han calculado muchas  $LD_{50}$  para las BTXs y dependiendo del análogo estudiado, los valores oscilan entre 200-400  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  peso corporal tras la administración del compuesto ip. Sin embargo, no se han podido establecer ARfD [142].

El MBA no se considera un buen método de detección para las BTXs, ya que son difíciles de purificar además de las inespecificidades propias de la técnica. Por lo tanto hay otros métodos en desarrollo para mejorar la detección y cuantificación de las BTXs. Estos métodos son LC-MS, así como inmunoensayos tipo ELISA y métodos funcionales basados en la afinidad de la toxina por su diana [113, 142, 143].

#### 1.2.2.4 Yessotoxinas (YTXs)

Las YTXs son compuestos poliéter sulfatados que deben su nombre a la estrella de mar *Patinopecten yessoensis*, de donde se aisló la YTX por primera vez [144]. Además, posteriormente también se obtuvo este compuesto a partir de otros organismos, como mejillones, peces o cangrejos, que también la acumulan en sus tejidos [145-148]. Se han descrito más de 90 análogos de la YTX, que poseen una gran variabilidad de  $LD_{50}$  lo que dificulta establecer TEF para los diferentes análogos [148, 149]. Sin embargo, se han determinado TEF para los análogos 1a-homoYTX y 45-hydroxyYTX = 1 y para 45-hydroxy-1a-homoYTX = 0.5, respecto a la YTX [94]. Algunos análogos se muestran en la tabla 3, donde se observan las diferencias estructurales entre ellas. La mayoría de variaciones estructurales se encuentran en el radical 3, excepto el análogo 1-desulfoYTX que también se diferencia en el radical 1 [148, 150].



**Tabla 3: Diferencias estructurales entre la YTX y algunos de sus análogos [151].**

La principal diana de las YTXs son las fosfodiesterasas (PDEs) que se encargan de hidrolizar el AMPc a AMP [152]. Se observa un incremento de la actividad PDE al tratar linfocitos T humanos con la toxina [153]. Además se estudió la afinidad de la YTX por las PDEs y se observó que se une con gran afinidad a las PDE1, PDE3 y PDE4, mientras que no muestra afinidad por la isoforma PDE2 [154-156]. Tras la administración *in vivo* de diferentes análogos de la YTX, se observa pérdida de movilidad, cianosis, disnea y espasmos [157]. Además también se describen efectos cardiotoxicos de la YTX en ratones [158], con una LD<sub>50</sub> de entre 80 a 750 µg/Kg de peso

corporal vía ip [149, 159]. No hay una ARfD definida, pero se calcula extrapolando los datos de toxicidad obtenidos en ensayos *in vivo* de ratón, y se obtiene una ARfD para un adulto medio de 60 Kg de 50 µg de eq de YTX/Kg de peso corporal [149].

El método validado actualmente para la detección de las YTXs es el LC-MS/MS y el límite de toxicidad es de 3.75 mg eq YTX/Kg [80, 160]. También se han desarrollado técnicas cromatográficas LC-UV y LC-FL [151]. Finalmente se han descrito también ensayos funcionales *in vitro*, como la citotoxicidad celular, acumulación de fragmentos de E-cadherina y niveles de AMPc para detectar las YTXs [148, 153, 161]. También la afinidad toxina-diana (PDE-YTX) se puede utilizar para cuantificar y detectar el compuesto de forma específica, así se desarrollaron métodos de detección de la unión PDE-YTX mediante biosensor de afinidad o por la técnica de la polarización de la fluorescencia (FP) [155, 156, 162]. Además se ha diseñado un ELISA con anticuerpos que reconocen específicamente la YTX [148].

#### 1.2.2.5 Pectenotoxinas (PTXs)

Las PTXs son un grupo de toxinas del tipo poliéter cíclico que se aislaron por vez primera, al igual que las YTXs, de una estrella de mar japonesa, *P. yessoensis*, de donde se obtuvieron los análogos PTX-1 y PTX-2, a pesar de que hay unos 14 análogos descritos [151, 159, 163]. También comparten origen con las DSPs, ya que muchos de sus análogos son producidos por especies del género *Dinophysis* sp. [34, 164, 165]. Así el principal análogo de este grupo, la PTX-2 se encontró en los cultivos de *D. fortii*, *D. acuminata*, *D. norvegica*, *D. rotundata*, *D. acuta* y *D. infundibulus* [151]. Además, la PTX-2 sirve como precursor de los análogos PTX-1, PTX-3, PTX-6 y PTX-2 seco acid (PTX-2sa), que se metabolizan, al igual que las BTXs y las STXs, en el tejido de los mariscos que acumulan PTX-2 dando lugar a nuevas variantes [151, 166, 167]. No obstante, PTX-1 se encontró no hace mucho por primera vez en el dinoflagelado *D. acuminata* [168]. Las PTX-11, PTX-12, PTX-13 y PTX-14 se aislaron de la especie *D. acuta* [169-171]. Mientras que las PTX-4 y PTX-7 también fueron aisladas a partir de *P. yessoensis* y son

respectivamente, estereoisómeros de las PTX-1 y PTX-6. Por otro lado, PTX-8 y PTX-9 son modificaciones artificiales mediante un proceso de acidificación de los análogos PTX-4 y PTX-7, respectivamente [159, 172].

Las PTXs actúan a través de la actina, por la que muestran afinidad, afectando como consecuencia a multitud de funciones de la célula que dependen del citoesqueleto [173]. Las PTXs son altamente tóxicas vía ip causando dificultad para respirar, descordinación muscular y cianosis a los ratones tratados. Mientras que esta toxicidad desaparece tras su administración oral, siendo necesarias elevadas concentraciones para causar daño [159, 174]. En este sentido no se observó diarrea ni daños gastrointestinales tras la administración de PTX en ratones o ratas [175, 176]. Las LD<sub>50</sub> vía ip para la PTX-1, PTX-2 y PTX-6, son 250, 260 y 500 µg/Kg peso corporal, respectivamente [159]. El valor de TEF es 1 para los análogos PTX-1, PTX-2, PTX-3, PTX-4, PTX-5, PTX-6 y PTX-11, mientras que el resto de análogos muestran una toxicidad menor sin tener un TEF asociado [94]. Tampoco se ha determinado aún un valor de ARfD para las PTXs [177].

Los métodos de detección validados para las PTXs son el MBA y LC-MS/MS [110, 177]. Se han desarrollado también otros métodos de cromatografía líquida: LC-UV y LC-FL, mientras que no han sido descritos métodos funcionales o estructurales [151, 177]. El límite de toxicidad permitido en Europa es de 0.16 mg eq OA/Kg [80].

#### 1.2.2.6 Ciguatoxinas (CTXs)

Las CTXs son compuestos poliéter cíclicos liposolubles, que desarrollan el síndrome de CFP [36]. Las CTXs son producidas principalmente por el dinoflagelado *G. toxicus*, pero también por *G. polynesiensis*, *G. belizeanus*, *G. australes* y *G. caribbaeus* [178]. El primer análogo se aisló por primera vez en 1967 tanto de cultivos naturales de *G. toxicus* como de tejidos de peces que lo almacenaban [36, 179, 180]. Hay diferentes variantes de CTXs según

el origen o región en la que se producen, diferenciando entre las P-CTX, I-CTX y C-CTX del Pacífico, del Índico y del Caribe, respectivamente [36].

Las CTXs comparten diana con las BTXs, pues tienen gran afinidad por el sitio 5 de los VGSC [36, 181]. También se ha descrito su capacidad de bloqueo de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje (Voltage-gated potassium channels, VGPCs) en células neuronales [182]. Por otro lado, se sabe que alteran los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular [183]. En este contexto, los síntomas asociados a las CTXs son muy abundantes y variados, con numerosos registros de HABs de las especies productoras de CTXs, además de ser también las causantes de importantes daños económicos [36]. Se producen más de 50.000 intoxicaciones al año en todo el mundo [184]. Los síntomas que provocan difieren según la variante, así las P-CTXs son las más tóxicas dando lugar a síntomas neurológicos, y junto con las I-CTXs pueden producir alucinaciones, vértigo, ataxia y coma. En general se les atribuyen daños gastrointestinales, con náuseas, diarrea, dolor abdominal y vómitos para más tarde dar paso a síntomas neurológicos como cambios sensoriales que invierten la sensación de frío y calor, prurito, adormecimiento alrededor de la boca, debilidad y fatiga y visión borrosa [36].

Dentro del grupo de las CTXs y produciendo síntomas semejantes, se encuentra el gambierol, que se aisló por primera vez en 1993 [185]. Debido a la escasez de esta toxina en la naturaleza, algunos laboratorios han focalizado su objetivo en sintetizar esta molécula [186]. El gambierol comparte mecanismo de acción con las CTXs pues actúa sobre los VGSC y los VGPC [187, 188].

Al igual que las BTX, en el caso de las CTXs, se han determinado diferentes  $LD_{50}$  según el análogo. Las CTXs más tóxicas son la P-CTX-1 y 51-hydroxyP-CTX-3C con una  $LD_{50}$  de 0.25  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  peso corporal vía ip aproximadamente para los dos análogos y la menos tóxica es la P-CTX-4B con la  $LD_{50}$  de 4  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  peso corporal vía ip. Sin embargo no se ha establecido ARfD para este grupo de toxinas [189].

La detección de las CTXs por MBA está dando paso a métodos novedosos que salvaguarden el bienestar animal y aumenten la sensibilidad y especificidad [189]. Sin embargo no hay otro método validado a nivel europeo pues la detección por LC-MS/MS necesita estándares de los compuestos que aún no se han desarrollado [113, 184, 189]. Además también se utilizan métodos *in vivo* con insectos, como el mosquito; ensayos funcionales a través de su efecto sobre los VGSC cuantificable mediante su capacidad citotóxica, cambios del potencial de membrana mitocondrial o actividad metabólica; o inmunoensayos tipo ELISA [36]. No hay un límite de toxicidad para este grupo, pues está prohibido comercializar pescado que contenga CTXs, por lo que el límite se establece en 0 µg CTXs/Kg [189].

#### 1.2.2.7 Iminas cíclicas (Cyclic imines, CI)

Las CIs son moléculas macrocíclicas formadas por grupos imina y grupos éter con uniones tipo espiro [190]. Dentro de este grupo se encuentran diferentes subtipos de toxinas, las gymnodiminas, espirólidos, pinnatoxinas y pteriatoxinas y por último, las espiro-prorocentriminas y prorocentrólidos.

La gymnodimina A se aisló por primera vez en el 1995 a partir de ostras de Nueva Zelanda así como de los dinoflagelados del género *G. mikimotoi* o *G. nagasakiense*, que constituye el productor primario [15]. Los análogos B y C se aislaron posteriormente de las especie *G. selliformis* [191, 192].

En el grupo de los espirólidos se han descrito varios análogos. Los espirólido B y D se aislaron de la glándula digestiva de mejillones y vieiras de Canadá en el 1995 [193]. Mientras que los análogos A y C se aislaron en el 2001 de vieiras contaminadas y de cultivos del organismo fitoplanctónico *Alexandrium ostenfeldii* de la misma región [194]. También el espirólido G fue aislado de mejillones contaminados de Noruega [38].

El tercer grupo dentro de las CIs está formado por las pinnatoxinas y pteriatoxinas. El dinoflagelado *Pinna attenuate* y *P. muriata* se ha descrito como el productor primario de las pinnatoxinas de donde se aislaron en 1990

por primera vez [41]. En las pteriatoxinas se agrupan tres análogos aislados de un molusco bivalvo que les da nombre: *Pteria penguin* [195].

Finalmente se aislaron espiro-procentriminas de cultivos de laboratorio de *Prorocentrum* sp. en Taiwan [40], mientras los proroentrólidos se extrajeron por primera vez en 1988 de *P. lima* y agrupan distintos derivados además del proroentrólido A [41, 196]. El proroentrólido B se aisló sin embargo de *P. maculosum* [197].

En general, estas toxinas actúan a través de los receptores nicotínicos de acetilcolina de músculo y neurona [198-200]. Las CIs son altamente tóxicas y actúan muy rápido, desarrollando síntomas neurológicos, cuando se administra vía ip en ratones [41, 201]. Los síntomas engloban hiperactividad, erizamiento del pelo, hiperextensión de la espalda, rigidez y arqueado de la cola hacia la cabeza, espasmos y dificultad respiratoria llegando a la muerte antes de una hora [41]. No obstante, estos síntomas no son extrapolables a la sintomatología o toxicidad en humanos, pues el material consumido por vía oral difiere mucho en pureza del administrado a los ratones, además de la distribución por el cuerpo, ya que la administración en los bioensayos es vía ip [202]. La LD<sub>50</sub> para un extracto crudo de espirólidos en ratón es de 40 µg/Kg peso corporal, variando según los diferentes análogos, para un extracto crudo de gimnodiminas es de 450 µg/Kg peso corporal variando también entre análogos, mientras que para el resto de CIs se indican valores de LD<sub>99</sub> en algunos casos [203]. No hay datos sobre TEF ni ARfD para las CIs [203].

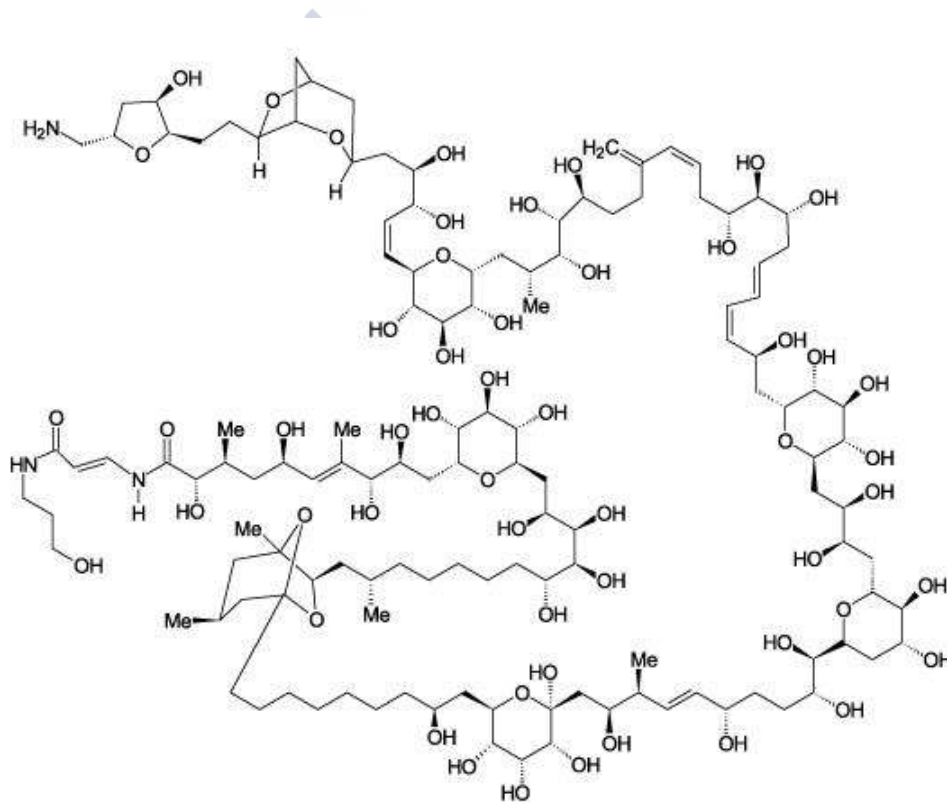
El MBA es el método utilizado para detectar las CIs [41, 203]. No obstante, LC-MS/MS es el mejor candidato para identificar y cuantificar también a las CIs pero aún no está validado. Además se han descrito otros métodos basados en la cromatografía líquida como LC-UV, así como ensayos funcionales mediante el uso de la membrana de *Torpedo*, rica en receptores de acetilcolina. La unión CI-receptor de acetilcolina se puede detectar mediante marcaje y emisión de FP, quimioluminiscencia o

colorimetría [41, 204-207]. Este grupo de toxinas no está regulado en Europa.

### 1.2.3 Toxinas anfifílicas

#### 1.2.3.1 Palitoxina (PLTX)

La PLTX es una molécula no peptídica de gran tamaño y polar con un esqueleto formado por una cadena de más de 100 carbonos, y debido a su complejidad, posee un gran número de isómeros.



**Figura 3: Estructura de la PLTX.**

La PLTX se aisló por primera vez en el 1971 a partir del coral *Palythoa toxica*. Antiguas leyendas hawaianas ya describían un fenómeno venenoso al que llamaron “alga que mata”, que se encontraba en estanques de la región de Hana, Hawai [208]. Además, se ha descrito la producción de esta toxina en otras especies del género *Palythoa* sp., como *P. tuberculosa*, *P. vestitus*, *P. mammilosa* y *P. caribaeorum* [209-211]. En 1981 se describió

por primera vez la estructura de la PLTX [212, 213]. Pero además del coral, los dinoflagelados del género *Ostreopsis* sp. también producen análogos de la PLTX o compuestos “tipo-PLTX” [214].

La principal especie que sintetiza el análogo de la PLTX llamado ostreocina, es *O. siamensis* [215, 216]. Este microorganismo fue aislado por Schmidt en 1901 a partir de muestras recogidas en sus expediciones [56, 209], mientras que la estructura de la ostreocina no fué descrita hasta 1995 [217]. Las ostreocinas, son los análogos de la PLTX más potentes, su LD<sub>50</sub> es la más baja de todas, siendo la ostreocina D la más tóxica, después de la PLTX [218]. La *O. mascarenensis* es la siguiente especie que produce los compuestos más tóxicos después de *O. siamensis* [209]. Fue aislada en 1994 y su toxicidad se estudió mediante ensayos *in vivo* [214, 219, 220]. Se conocen al menos dos análogos producidos por *O. mascarenensis*, la mascarenotoxina-1 (McTX-1) y McTX-2 [219]. Se sabe que ambos análogos poseen diferentes estructuras, pues se observan distintos tiempos de retención al analizarlos por HPLC, en cualquier caso, son muy parecidos estructuralmente a la PLTX [219, 221]. *O. ovata*, es la más pequeña y menos tóxica de las especies del género *Ostreopsis* sp. conocidas hasta el momento y fué descubierta en 1981 [222, 223]. El análogo de PLTX que sintetizan se denomina ovatoxina (OVTX), la primera identificada fue la OVTX-a [224], y posteriormente fueron caracterizados el resto de análogos conocidos hasta el momento: la OVTX-b, -c, -d, -e y -f [225, 226]. De *O. lenticularis* y *O. heptagona* se sabe muy poco [209]. *O. lenticularis* sintetiza las ostreotoxinas, tóxicas en ratón vía ip con una LD<sub>50</sub> de 32,1mg/Kg, sin embargo no está demostrado que sean análogos de la PLTX [227]. Y *O. heptagona* solo mostró una sutil toxicidad en bioensayos al inocular a ratones un extracto del cultivo en metanol [228]. La ARfD para el total de PLTX y sus análogos es de 0.2 µg/Kg peso corporal para un adulto medio de 60 Kg mientras que no hay descritos TEF para este grupo [229].

Especies productoras	Toxina	Análogo de PLTX	LD <sub>50</sub> en ratón (ip)
<i>O. siamensis</i>	Sin nombre		
	Ostreocin-D	Sí	0.75 µg/kg
	Ostreocin-B		
<i>O. mascarenensis</i>	Sin nombre		
	Mascarenotoxina-A y	Sí	0.9 µg/kg
	Mascarenotoxina-B	Sí	
<i>O. ovata</i>	Sin nombre	Sí	No detectada
	Palitoxina putativa	Sí	
	Ovatoxina-a	Sí	<7 µg/kg
	Ovatoxina-b	Sí	
	Ovatoxina-c	Sí	
	Ovatoxina-d+e	Sí	
	Ovatoxina-f	Sí	
<i>O. lenticularis</i>	Ostreotoxina	No se sabe	32.1 µg/kg
	Ostreotoxina 1		
	Ostreotoxina 3		
<i>O. heptagona</i>	Sin nombre	No se sabe	No detectada

**Tabla 4: Especies tóxicas del género *Ostreopsis* sp.**

La diana de la PLTX es la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa que se encuentra en la membrana plasmática de las células [230]. La actividad de la PLTX y sus análogos se inhibe por la ouabaina, un glucósido cardiotónico cuya diana es la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa [56, 231-234]. Esta bomba mantiene los niveles de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las fibras cardíacas, y controla de forma indirecta la contracción del corazón, por ello la intoxicación por PLTX o sus análogos producidos por el género *Ostreopsis* sp. son altamente letales [235]. Los síntomas descritos para estas toxinas varían según el tipo de contacto. En este sentido, se diferencian síntomas por ingestión de la toxina, de aquellos por contacto, inhalación o exposición ocular [236, 237]. La intoxicación por ingesta ocurre tras el consumo de mariscos u otros organismos del mar contaminados con la toxina [238-240]. Produce daños gastrointestinales como náuseas, diarreas y vómitos, además también se producen mialgias y espasmos, así como convulsiones, delirios y finalmente la muerte [236, 241]. La intoxicación por contacto se debe a que la PLTX es absorbida por la piel, y se observan edemas en la zona de contacto, eritema y también mialgia, escalofríos y

debilidad [236, 242, 243]. En los casos de intoxicación por inhalación de la toxina se observan rinorrea severa, tos, dolor de garganta además de los síntomas gastrointestinales previamente mencionados, y un caso más grave donde se detectaron taquicardias tras episodios de vómitos [236, 244]. Finalmente también se observaron irritación ocular y conjuntivitis [236, 245, 246]. Se han descrito multitud de episodios en relación a la PLTX y sus análogos, siendo bastante común en las costas europeas, pues se han aislado microalgas del género *Ostreopsis* sp. en el mar Mediterráneo en diferentes ocasiones [236, 247, 248]. También se han detectado estas microalgas en el océano Atlántico [249], y en el mar Adriático [53].

El método de detección usado para las PLTXs es el MBA [229]. No obstante, se están poniendo a punto técnicas cromatográficas con detección por MS o UV [209]. Sin embargo, estos métodos requieren personal especializado, se necesitan estándares de toxina, y algunos son muy poco sensibles y es difícil eliminar el efecto matriz [229]. Además también se utilizan métodos de detección funcionales, como es el caso del ensayo hemolítico basado en la capacidad citotóxica de la PLTX sobre eritrocitos, pero no son muy específicos además de que se observan interferencias de otros compuestos de las muestras [229, 236]. Finalmente también se han desarrollado inmunoensayos, basados en la emisión de señal tras la unión de la PLTX y sus análogos a un anticuerpo, aunque se desconocen las posibles reacciones cruzadas [229, 236, 250, 251]. En este sentido, ha de avanzarse más en las técnicas de detección para conseguir el método más óptimo para este grupo de toxinas emergente en Europa.

#### 1.2.3.2 Maitotoxinas (MTXs)

Las MTXs forman parte del grupo de toxinas que producen ciguatera [35, 252]. Y al igual que la ciguatoxina, son sintetizadas por *G. toxicus* [35, 253, 254]. La MTX se aisló en 1976 del pez cirujano *Ctenochaetus striatus* recolectado en Tahití [255], y en 1988 de cultivos de *G. toxicus* [256].

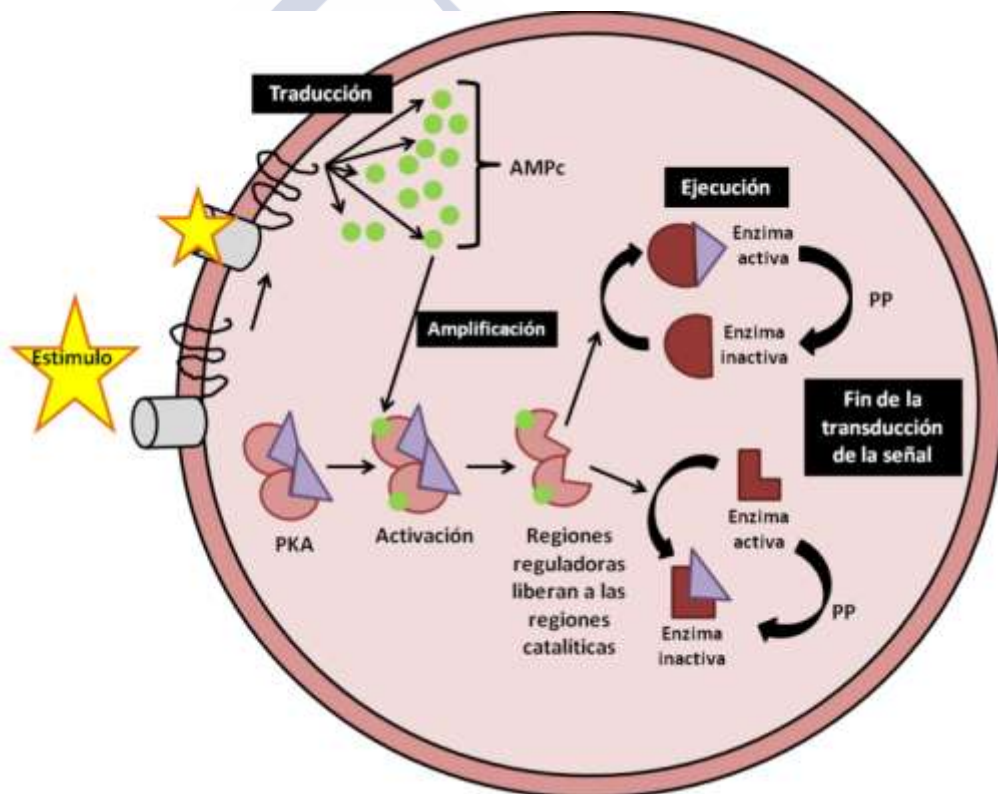
Hay diferentes efectos descritos tras la incubación con MTX en distintas líneas celulares, a pesar de que su mecanismo de acción se desconoce [35, 62]. El efecto más claro y mejor descrito del grupo de las MTXs es la activación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, asumiendo que activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (voltage-gated calcium channel, VGCC) [257-260]. Además las MTXs también modulan los niveles de inositol fosfato independientes del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular [261, 262]. Como resultado, los síntomas observados tras la intoxicación por MTXs, son muy parecidos a los que provocan las CTXs, con daños gastrointestinales y neurológicos. Estudios *in vivo* han demostrado que las MTXs son menos tóxicas que las CTXs vía oral, pero esta toxicidad se eleva hasta ser prácticamente igual cuando se administra vía ip. Cuando las MTXs se inoculan en altas concentraciones se observa muerte a tiempos cortos tras jadeos y convulsiones [35, 62, 253, 263]. La MTX no está regulada todavía a nivel europeo, sin embargo vía ip es altamente tóxica y se ha calculado una  $\text{LD}_{50}$  de 0.05  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  peso corporal [264].

Para detectar la MTX aún no se ha validado ningún método, pero sí se han desarrollado técnicas basadas en inmunodetección, tipo ELISA o radioinmunoensayos [35].

### **1.3 RUTAS INTRACELULARES IMPLICADAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TOXINAS MARINAS**

Las señales de transducción comienzan tras la llegada de un estímulo extracelular a receptores de la membrana plasmática, que a continuación activan una serie de rutas intracelulares que ofrecen una respuesta al estímulo inicial. En este contexto, los receptores de la señal pueden ser un canal iónico que altera el tránsito de iones a su través o un receptor de ligando que se acopla a proteínas G y activan la síntesis de AMPc, además de otros tipos de receptores [265, 266]. Tras la llegada del estímulo externo, el receptor transmite esta información al interior celular a través de

moléculas llamadas “segundos mensajeros” entre los que destacan el AMPc y el  $\text{Ca}^{2+}$  [267, 268]. La diseminación de estas moléculas por el citosol a diferentes localizaciones celulares, es la que amplifica y transduce la señal, activando diferentes enzimas efectoras que catalizan reacciones de fosforilación y desfosforilación de otras proteínas, activándolas o inhibiéndolas. Las proteínas kinasa (PKs) se encargan de fosforilar a otras enzimas, y se pueden activar tanto por AMPc, la PKA, como por  $\text{Ca}^{2+}$ , la PKC. El efecto de las proteínas kinasa es contrarrestado por las PPs, que hidrolizan los enlaces fosfato ejerciendo el efecto opuesto sobre la actividad de la enzima diana, y suelen ser las que ponen fin al proceso global de transducción de la señal [268].



**Figura 4: Esquema general de las señales de transducción.**

Las toxinas marinas que producen los microorganismos del fitoplancton, activan rutas intracelulares muy complejas. Según el mecanismo de acción se pueden diferenciar dos grupos de toxinas: las toxinas que activan canales

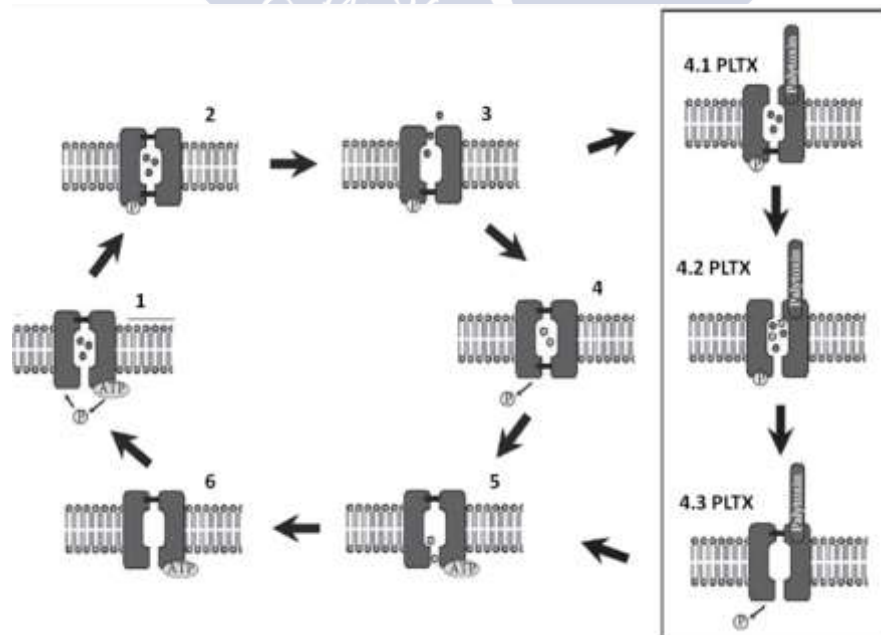
iónicos a nivel de membrana plasmática, o las toxinas que tienen dianas intracelulares.

Los grupos de toxinas que activan receptores de membrana, afectan principalmente a células excitables con canales iónicos en su membrana plasmática que regulan los niveles de iones celulares o modulan neurotransmisores.

El DA actúa a través del receptor de glutamato [66]. Hay tres tipos de receptores que conforman la familia de receptores del glutamato: N-methyl-D-aspartate (NMDA), alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) y el receptor de KA [269]. El DA posee mayor afinidad por los receptores de KA. Tras la unión DA-receptor KA se activa la excitación sináptica de glutamato, que activa a su vez los receptores NMDA. Como consecuencia hay un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desencadenándose así toda la cadena metabólica tóxica que conduce a la apoptosis [69, 70].

Los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (VGSC, VGPC y VGCC, respectivamente), sirven de diana para varios grupos de toxinas. Así las STXs, BTXs y CTXs tienen afinidad por los VGSC [36, 92, 136, 181]. Las STXs bloquean el canal inhibiendo temporalmente la permeabilidad al ión  $\text{Na}^+$ , alterando el potencial de membrana de células excitables [92]. Por otro lado, las BTXs y CTXs comparten sitio de unión en el canal de  $\text{Na}^+$  y provocan la apertura del VGSC de forma que se activa la entrada de  $\text{Na}^+$  al interior celular despolarizando la membrana plasmática [36, 136, 181]. Las CTXs también bloquean los VGPCs, con lo cual, el efecto de despolarización que estas toxinas provocan en la membrana debido a la interacción con los VGSCs, es potenciado [182]. Por otro lado, las MTXs inducen la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, seguramente a través de la activación de los VGCCs [257-260]. El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se relaciona con la activación de la excitación [270], además de que el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol está ampliamente relacionado con la activación de diferentes tipos de muerte celular [271].

La PLTX actúa sobre la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa [230]. Esta bomba libera al medio extracelular tres moléculas de  $\text{Na}^+$  e introduce dos moléculas de  $\text{K}^+$  al citosol, hidrolizando una molécula de ATP. Tras la hidrólisis del ATP, la bomba queda fosforilada, con las tres moléculas de  $\text{Na}^+$  en su interior. En este estado, la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa libera el  $\text{Na}^+$  que intercambia por dos moléculas de  $\text{K}^+$ , que permiten que el receptor pierda el grupo fosfato, quedando desfosforilado. Estas dos moléculas de  $\text{K}^+$  son liberadas al interior celular tras la unión del ATP al receptor. Seguidamente la bomba se dispone a hidrolizar ATP para comenzar de nuevo el ciclo. La PLTX tiene más afinidad por el receptor  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa cuando éste se encuentra en estado fosforilado. Cuando la toxina se une a la bomba, ésta se transforma en un canal inespecífico donde hay un libre tránsito de iones, lo que conlleva a una despolarización de la membrana plasmática, que provoca graves daños celulares [234, 236, 272-274]. Tras un tiempo, el canal con la PLTX puede llegar a desfosforilarse recuperando la conformación normal. Sin embargo, tras la unión de la toxina, la bomba puede quedar dañada, además de los efectos negativos ya generados en la célula tras la desestabilización de iones [275].

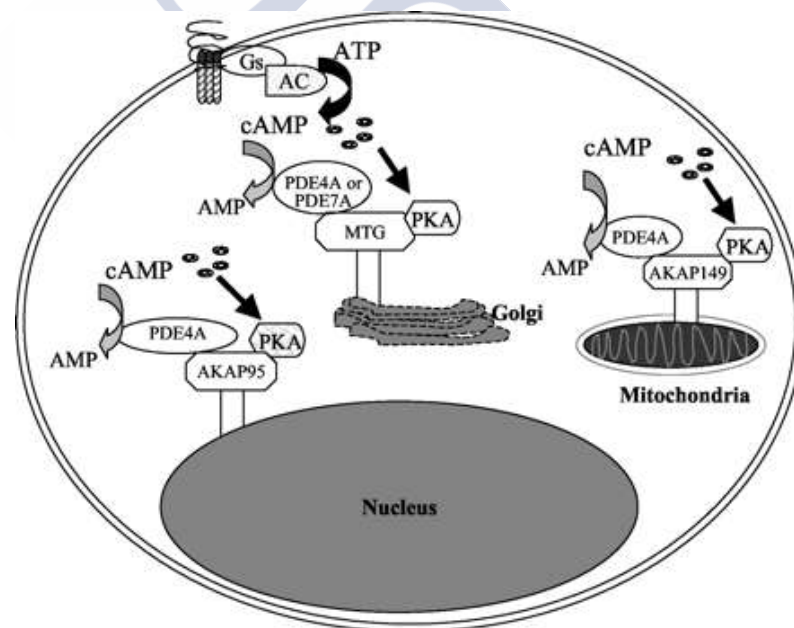


**Figura 5: Modelo de interacción de la PLTX y su diana, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa [236].**

El otro bloque de toxinas, tiene un mecanismo de acción que afecta a rutas intracelulares a través de enzimas que ejecutan actividades básicas y generales, provocando alteraciones metabólicas de un modo muy complejo, que pueden conducir a la muerte celular.

El OA y sus análogos, mediante la inhibición de las PP1 y PP2A pueden inhibir la liberación de histamina [276], provocar toxicidad en neuronas [99], inhibir la proliferación celular [277] o desarrollar daños a nivel de citoesqueleto, mediante la disrupción de filamentos de actina, que terminan siendo tóxicos para muchos tipos celulares [100, 104, 278, 279]. Las PPs desarrollan un papel fundamental en el metabolismo celular, por ello los efectos del OA afectan a un espectro muy amplio de funciones celulares [280, 281]. Por otro lado, la YTX incrementa el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en linfocitos T, por la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de nifedipina y SKF 96365. Además su efecto potencia el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que produce la MTX [282-284]. Esta toxina afecta también a las proteínas de adhesión celular, rompiendo la E-cadherina y alterando el sistema E-cadherina-catenina [285, 286]. Además la YTX modula los niveles de AMPc, disminuyéndolos en linfocitos T, e incrementándolos en la línea tumoral K-562. Este efecto ocurre tras la unión de la YTX a las PDEs, y es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  [153, 287]. También se observan efectos de la YTX sobre la mitocondria. En este sentido se ha descrito la apertura del poro mitocondrial tras la incubación con este compuesto en mitocondrias aisladas, así como cambios en la morfología de estos orgánulos tras la administración oral de YTX en ratones, además en numerosos estudios se ha observado un cambio del potencial de membrana mitocondrial en presencia de la toxina [150, 288, 289]. Por otro lado, las proteínas de anclaje de la kinasa A (AKAPs) son proteínas estructurales que unen diferentes componentes celulares como las PKAs o las PDEs [290]. El complejo formado por la AKAP-PKA-PDE se desplaza por diferentes localizaciones celulares en función de los gradientes de AMPc, dirigiéndose a la zonas donde hay mayor concentración de este segundo mensajero, regulando así su distribución espacio-temporal [291, 292]. En este contexto, la AKAP149 ancla la PDE4A y la PKA a la membrana

mitocondrial externa [293]. El AMPc se puede unir a las dos subunidades reguladoras de la PKA, liberando dos subunidades catalíticas que quedan activas y pueden fosforilar proteínas en esta zona [294]. El complejo AKAP149-PKA-PDE4A en esta localización cataliza diversas reacciones, entre las que destaca la fosforilación de proteínas que evitan la apertura del poro mitocondrial, y por lo tanto de cualquier proceso celular relacionado con esta estructura, como por ejemplo la apoptosis. Por ello, la translocación de este complejo a otras localizaciones puede desencadenar apoptosis mediada por la mitocondria [293]. El complejo AKAP-PKA-PDE se puede encontrar localizado en la membrana plasmática y en la envuelta nuclear, afectando a otros procesos celulares característicos de esas zonas [295, 296].



**Figura 6: Esquema de los diferentes tipos de proteína estructural AKAP según su localización. La AKAP 149 ancla a la PDE4A y PKA a la membrana mitocondrial externa [297].**

La YTX reduce los niveles de AKAP149 en el citosol y la viabilidad en la línea celular K-562, mientras que en los linfocitos humanos, la toxina aumenta la expresión de la proteína en el citosol y no afecta a la viabilidad

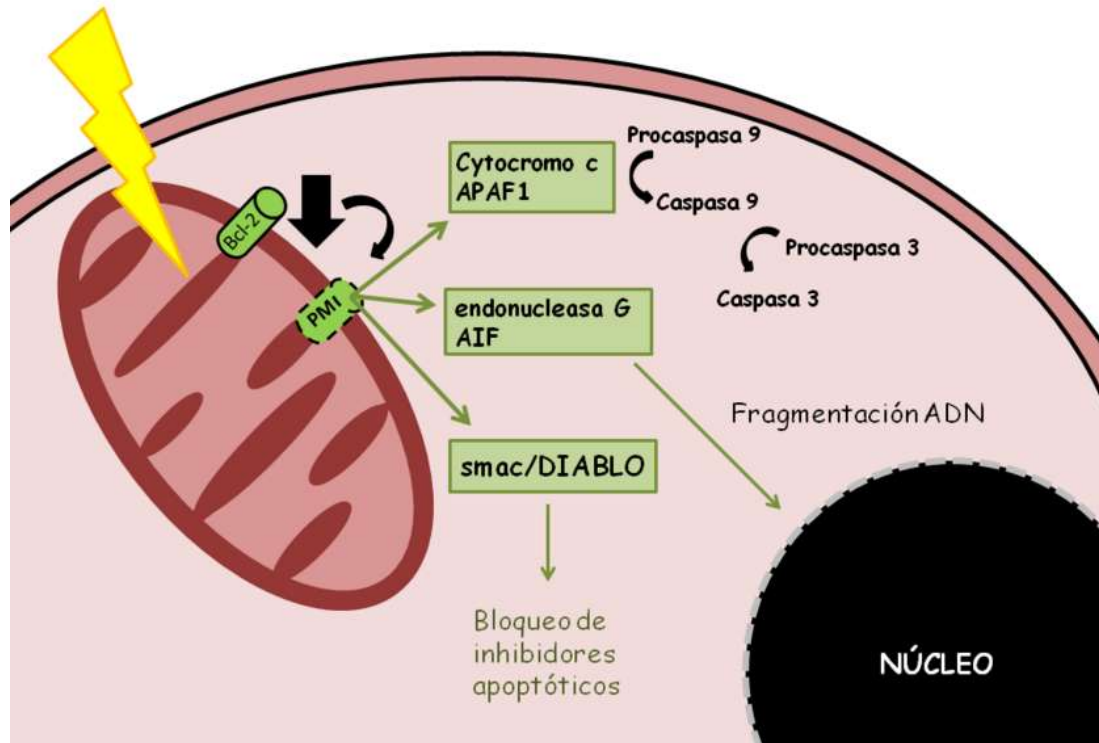
de las células [287]. La modulación de la AKAP149 puede estar relacionada con la disminución de la viabilidad celular inducida por la YTX [293].

#### **1.4 MUERTE CELULAR PROGRAMADA**

Lejos de ser un término negativo, la muerte celular programada, es un mecanismo de “suicidio” celular que beneficia al organismo en su conjunto. Este proceso se activa cuando una célula está dañada, evitando así que realice mal su función. Hay diferentes tipos de muerte celular programada: tipo I o apoptosis, tipo II o autofagocitosis y tipo III o necrosis programada [298].

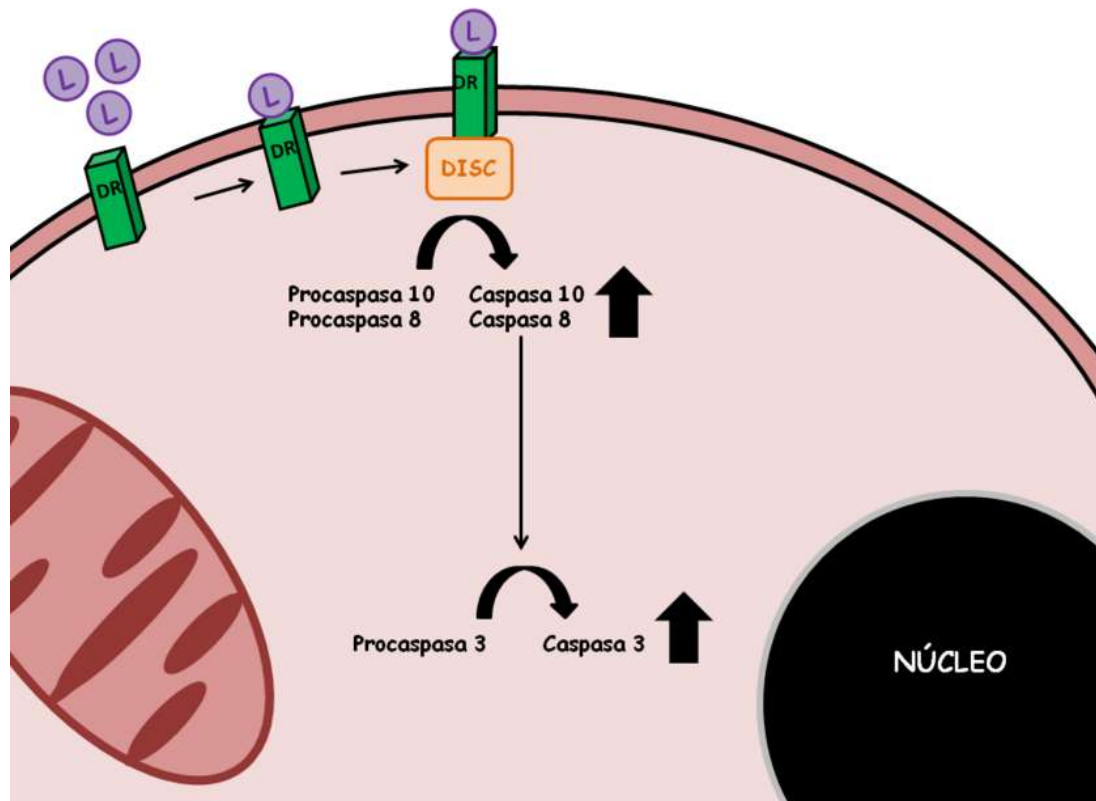
La apoptosis, o muerte celular programada tipo I, es un proceso complejo del que se han descrito muchas rutas celulares que intervienen en su activación [298-300]. El proceso apoptótico, se puede activar por vía intrínseca o mitocondrial, o por vía extrínseca o de receptor de muerte [301]. La apoptosis intrínseca se activa tras diferentes estímulos que llegan a la mitocondria en cuya membrana se abre el poro mitocondrial. Una de las proteínas que regula su apertura, es la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Esta proteína está anclada en la membrana mitocondrial externa y evita la apertura del poro mitocondrial. De tal forma que los estímulos apoptóticos disminuyen los niveles de la Bcl-2 en la membrana externa de la mitocondria y provoca que se abra el poro mitocondrial [293]. Seguidamente, comienza la liberación de factores inductores de apoptosis (Apoptotic Inductor Factor, AIF) como son el citocromo c, la smac/DIABLO y la endonucleasa G, entre otros desde el interior mitocondrial. Tras la liberación al citosol, el citocromo c se une a la proteína citosólica Apaf-1 (factor activador de proteasa) formando el “apoptosoma” que activa a la caspasa 9 y ésta a su vez activa a la caspasa 3. Por otro lado la smac/DIABLO bloquea los inhibidores apoptóticos, desencadenándose así toda la ruta que conduce a la muerte celular [302]. Además, la endonucleasa G y los factores inductores de

apoptosis se dirigen al núcleo donde promueven la fragmentación del ADN y condensación de la cromatina [303].



**Figura 7: Ruta de activación de la apoptosis intrínseca o mitocondrial. PM: poro mitocondrial.**

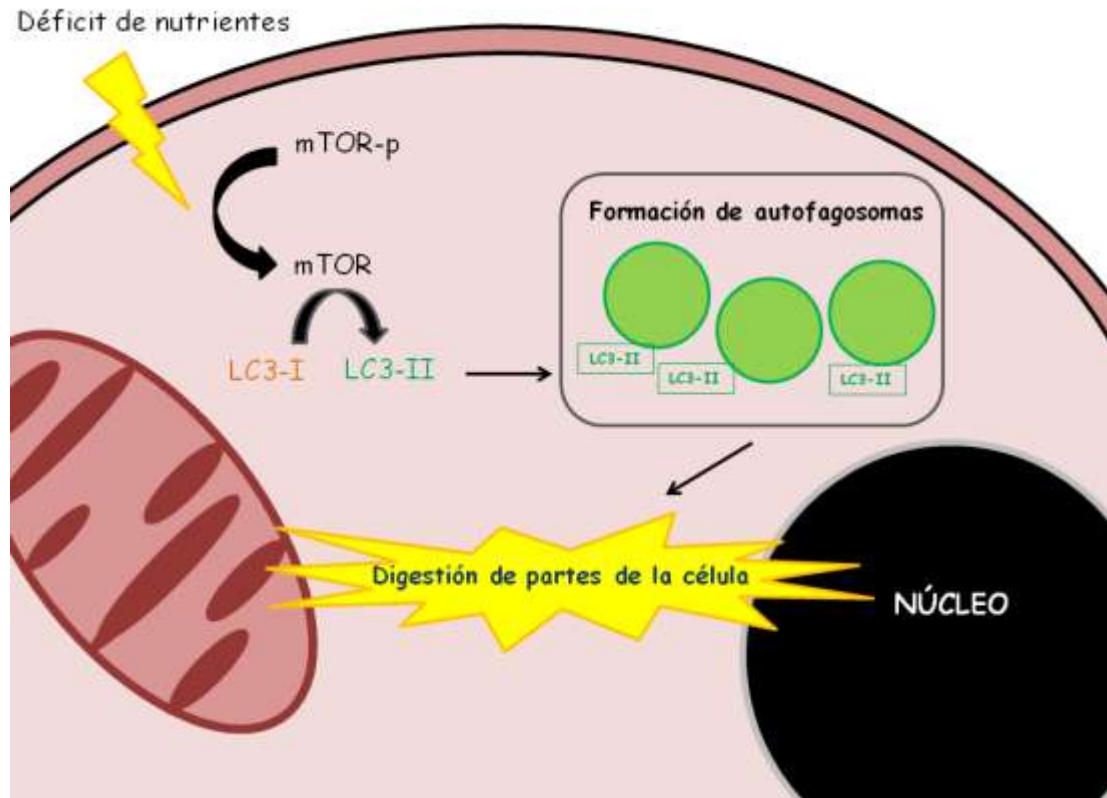
La otra vía de activación, la apoptosis extrínseca, comienza tras la unión de un ligando a receptores de muerte localizados en la membrana plasmática (Death Receptor, DR). El DR pertenece a la familia de receptores de factor de necrosis tumoral (Tumour Necrosis Factor Receptor, TNFR) [303]. Tras la unión del ligando, este receptor de transmembrana, forma un complejo en la cara interna de la membrana plasmática llamado DISC (Death Inducing Signaling Complex), que cataliza la activación de las caspasas 8 y 10. La caspasa 8 activa a la caspasa 3 continuando así toda la cadena apoptótica [158].



**Figura 8: Ruta de activación de la apoptosis extrínseca o por receptor de muerte. DR: Receptor de muerte, L: Ligando.**

La autofagocitosis o muerte celular programada tipo II se activa como un mecanismo de supervivencia cuando la célula tiene déficit de nutrientes. En este estado, la célula comienza a degradar partes de sí misma como mitocondrias dañadas, citosol y otras organelas, que le ayudan a tener los elementos esenciales para sintetizar nuevas proteínas y energía. Sin embargo, este proceso puede degenerar en la autofagocitosis de la célula entera, constituyendo un modelo de muerte celular programada diferente a la apoptosis [304]. La principal proteína envuelta en el proceso autofágico es la mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin), que se encarga de inhibir la autofagia cuando está activa, mientras que cuando se bloquea, se desencadena este tipo de muerte. La rapamicina, además del déficit de nutrientes, ejerce esta acción de bloqueo de la mTOR [305]. Tras su inhibición, comienzan a formarse las vesículas de digestión, llamadas autofagosomas, caracterizadas por la presencia de LC3 (Light Chain 3) en

su envuelta [306]. Además la autofagocitosis es independiente de caspasas, a diferencia de la apoptosis que requiere su activación [307].



**Figura 9: Ruta de activación de la autofagia.** mTOR-p: forma activa de la mTOR, fosforilada, LC3-I: forma citosólica de LC3, LC3-II: forma unida a la envuelta de los autofagosomas.

El tipo III de muerte celular programada es la necrosis programada y se puede activar por daños en el ADN o por la activación de DR. Además suele ocurrir con las caspasas, particularmente la caspasa 8, inhibidas, mientras que las proteínas RIP1 y RIP3 (receptor-interacting protein kinase) están activas [308].

#### 1.4.1 Muerte celular inducida por toxinas

Tras la activación de diferentes mecanismos de acción, las toxinas pueden inducir diversos tipos de muerte celular. Se ha descrito que el DA aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en las neuronas granulares cerebelares [69]. En estas células, junto con los cardiomiocitos, se acompaña el incremento de

Ca<sup>2+</sup> por una activación de la apoptosis, que se manifiesta con un aumento en el estrés oxidativo, alteración del potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo c, activación de caspasa 3 y rotura de PARP [309, 310]. El tratamiento de células Caco-2 con esta toxina, provoca una disminución de la viabilidad celular y daños en el ADN [311]. Por lo que en general, el DA parece estar activando la apoptosis a través de la mitocondria y no a través de DR.

Tras el tratamiento *in vitro* con OA también se observan marcadores apoptóticos como: descenso de la actividad mitocondrial, activación de caspasas, liberación de citocromo c, fragmentación de ADN así como liberación de especies reactivas de oxígeno [312-316]. También provocan disminución de la Bcl-2, activación de las caspasas 3 y 9, cambios en el potencial de membrana mitocondrial y liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), que se libera al medio extracelular tras la lisis de la membrana plasmática [317, 318]. Además el OA disminuye la viabilidad debido a la inhibición de la proliferación celular [319]. Sin embargo, la activación de la autofagocitosis por OA está poco estudiada. En este contexto, se demostró que la toxina aumenta los niveles de LC3 y autofagosomas, pero también incrementa los de mTOR activada, que bloquea la autofagia. Esto quiere decir que el OA puede estar activando la autofagocitosis por otra vía independiente a la mTOR [320]. Las DTXs, en concreto la DTX-2 también activa la apoptosis en cultivo primario de hepatocitos de rata, incrementa la caspasa 3 y detiene el ciclo celular, en menor grado que el OA [277].

Los AZAs tienen propiedades neurotóxicas y se observan marcadores apoptóticos tras la incubación con AZA1, tanto en neuroblastoma humano como en cultivo primario de neuronas neocorticales de ratón. En estas células, la toxina activa diferentes caspasas y provoca condensación nuclear [126, 321]. También en linfocitos T y células intestinales Caco-2 activa las caspasas 1 y 9, libera citocromo c al medio citosólico y fragmenta el ADN [322].

La YTX activa diferentes tipos de muerte celular programada, como la apoptosis y la paraptosis en multitud de líneas celulares [158, 323-326]. En neuronas cerebelares y en células de mioblastoma se observa contracción del núcleo y condensación de la cromatina, activación de las caspasas 3 y 9, liberación de citocromo c y smac/DIABLO, rotura de la poly(ADP)-ribosa polimerasa (PARP) (una diana típica de las caspasas), apertura del poro mitocondrial y rotura del citoesqueleto de F-actina [326-328]. También en células de hepatoma humano, la YTX provoca la condensación de cromatina, fragmentación de ADN además de la activación de caspasa 3, todo ello asociado a una disminución del potencial de membrana mitocondrial [324, 325]. Además, los niveles de  $Ca^{2+}$  que modula la YTX tienen un papel crucial en la activación de la apoptosis, pues las endonucleasas necesitan el ión  $Ca^{2+}$  para cortar el ADN, además, el  $Ca^{2+}$  también es necesario para la apertura de poro mitocondrial [288, 329]. Se puede concluir que la YTX activa apoptosis de una gran cantidad de líneas celulares, sin embargo, las rutas activadas son muy variadas según los casos, aunque todos relacionados con la vía intrínseca o mitocondrial. La activación de la autofagocitosis por parte de la YTX, se desconoce, a pesar de que posiblemente, también esté envuelta en este tipo de muerte celular programada [330].

Del grupo de las PTXs, el compuesto principal, la PTX-2 es altamente tóxica para diferentes tipos de líneas tumorales, disminuyendo proteínas anti-apoptóticas así como su expresión génica [331]. Esta toxina activa la apoptosis intrínseca en células tumorales deficientes en el gen p53, un gen pro-apoptótico inactivado o defectuoso en estas líneas [332, 333]. Además se observan marcadores de apoptosis intrínseca tras el tratamiento de PTX-2 en células de carcinoma humano hepatocelular, donde además parece estar actuando a través de los receptores de muerte DR4 y DR5 con la consecuente activación de la caspasa 8 [334]. Por lo tanto, este análogo está activando ambas vías de apoptosis. También la PTX-1 activa la apoptosis en hepatocitos de salmón donde se observó condensación de la cromatina y cambios en la forma de la célula [335]. Además la PTX-1 y 9 son

citotóxicas en hepatocitos de ratón, que sufren modificaciones de su morfología y de los filamentos de actina, mientras que la PTX-6 no muestra ninguno de estos efectos [336].

Las BTXs provocan fragmentación de ADN en linfocitos humanos, pero no se observaron más marcadores apoptóticos [337]. Sin embargo en la línea celular humana Jukart, diferentes análogos de BTX activan la apoptosis intrínseca, siendo la BTX-2 y 6 más potentes que la BTX-3 [338]. También se demostró que junto a los análogos anteriores, la BTX-9 inhibe la proliferación y produce daños en el ADN [339]. Por lo tanto las BTXs activan muerte celular a través de la apoptosis intrínseca o extrínseca [340].

Los grupos de las STXs y las PLTXs muestran citotoxicidad en diferentes tipos de células [214, 341-343], pero no se observan los marcadores típicos de apoptosis tras la incubación con ambas toxinas [341, 344, 345]. Lo mismo sucede con las MTXs que poseen propiedades tóxicas pero no activan completamente la apoptosis. En la línea de neuroblastoma, la MTX estimula la liberación de citocromo c al citosol pero no se llega a observar una activación de la caspasa 3 [346]. No hay descritos efectos sobre la apoptosis ni sobre la autofagocitosis por parte de las CTXs ni Cls.

En resumen, las toxinas marinas activan gran cantidad de rutas intracelulares, lo que las convierte en una herramienta farmacológica con un gran potencial para el estudio de diferentes procesos metabólicos. Con ello, se contribuye al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas así como la posibilidad de desarrollar fármacos específicos y efectivos, además de descubrir nuevas rutas de activación.



## 2. Objetivo

El conocimiento del mecanismo de acción de las toxinas marinas facilita desarrollar métodos de detección específicos y además, permite que estos compuestos se puedan utilizar como herramientas para explorar rutas intracelulares con posibles aplicaciones terapéuticas. En este sentido, la YTX, un compuesto con una baja toxicidad, tiene un gran potencial ya que posee efectos antialérgicos, inhibe la proliferación tumoral, y parece ser eficaz en enfermedades neurodegenerativas, aunque las rutas implicadas en estos procesos no están claras. El otro compuesto sujeto de este trabajo es la PLTX, que es un compuesto muy tóxico, con un mecanismo de acción perfectamente definido, pero cuya monitorización analítica para evitar intoxicaciones es muy difícil debido a su extrema complejidad molecular.

En este contexto, los objetivos de la presente tesis doctoral son:

- Estudiar las rutas intracelulares implicadas en el mecanismo de acción de la YTX, profundizando en los efectos derivados de la modulación de las PDEs.
- Determinar las condiciones óptimas de crecimiento y de producción de PLTX de especies del género *Ostreopsis* sp., y desarrollar métodos de detección de la toxina basados en su diana, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.



### 3. Publicacións

### **3.1 PRESENTACIÓN**

En este apartado se presentan los resultados de la tesis doctoral que han sido publicados en revistas internacionales. Cada artículo describe la metodología utilizada, así como las conclusiones y la discusión de los resultados obtenidos. Las 7 publicaciones que se presentan a continuación están divididas en dos secciones. La primera sección, que incluye 4 artículos, se centra en las rutas intracelulares implicadas en el mecanismo de acción de la YTX, a través del estudio de los niveles de las enzimas AKAP, PDE, PKA y PKC y su implicación en la activación de la muerte celular. En la segunda sección se describe la puesta a punto de métodos de detección para las PLTXs, utilizando como herramienta su diana. Además, esta sección también incluye el estudio del crecimiento y del perfil tóxico de varias cepas de *Ostreopsis* sp. bajo diferentes condiciones de cultivo. Estos dinoflagelados son especies emergentes en las costas europeas por lo que conocer las condiciones favorables para su desarrollo contribuye a la prevención de HABs. Sin embargo, cabe destacar que estas microalgas crecen en agregados adheridos a las superficies, siendo muy compleja su disgregación, debido a esto, la concentración de células en la columna de agua es un parámetro cuestionable para determinar la cantidad de dinoflagelados. En esta sección se incluyen 3 publicaciones.

De este modo, los resultados obtenidos se agrupan en dos secciones, resumidas a continuación:

#### **3.2 SECCIÓN I: Estudio de las rutas intracelulares activadas por el efecto de la YTX**

El estudio y el conocimiento del mecanismo de acción de las toxinas marinas es fundamental para descubrir a qué se debe su toxicidad, pero además estos compuestos resultan útiles como herramientas para estudiar rutas intracelulares, y descubrir nuevas dianas farmacológicas. En este sentido la YTX es un compuesto que actúa sobre las PDEs intracelulares y por lo tanto modula los niveles del segundo mensajero AMPc, que a su vez determina la actividad de la PKA. En este contexto se estudiaron los niveles del complejo que la isoforma 4A de la familia de las PDEs forma con la PKA

y con la AKAP149, el complejo AKAP149-PKA-PDE4A, en el citosol, en la mitocondria, en la membrana plasmática y en el núcleo tras la incubación con la toxina. Además se examinó la relación entre este complejo y las rutas de muerte celular activadas por la YTX. Por otro lado se estudió la relación de estos procesos con las distintas familias de PKCs. Finalmente se comparó el efecto de la YTX en 3 modelos celulares con diferente capacidad de división. Se estudiaron dos líneas celulares, la línea tumoral K-562, y la línea linfoblastoide no tumoral, producida a partir de linfocitos B humanos inmortalizados tras la inoculación del virus Epstein Barr [347], y se comparó el efecto de la toxina con linfocitos humanos purificados de sangre de donantes sanos como modelo sin capacidad de dividirse.

Estos estudios se realizaron usando diferentes técnicas de ensayo. La expresión proteica se midió mediante western blot. Los ensayos de co-localización de proteínas en la mitocondria y en el núcleo, así como la cuantificación de los niveles de receptores de la membrana plasmática o la actividad mitocondrial, se realizaron mediante citometría de flujo. Además se usaron técnicas de absorbancia y fluorescencia en placa para cuantificar la viabilidad celular. Para confirmar la participación de las rutas celulares, se puso a punto una técnica de silenciamiento de ARN.

A esta sección corresponden las siguientes publicaciones:

- I.1 Role of AKAP 149-PKA-PDE4A complex in cell survival and cell differentiation processes.
- I.2 Key role of phosphodiesterase 4A1 (PDE4A1) in autophagy regulation.
- I.3 Yessotoxin activates cell death pathways independent of Protein Kinase C in K-562 human leukemic cell line.
- I.4 Comparative study between the tumor K-562 and non-tumor lymphoblastoid cell lines: YTX toxicity resides in structural differences of PDE4A.

## **I.1 Papel del complejo AKAP149-PKA-PDE4A en procesos de supervivencia y diferenciación celular**

### Resumen

La localización celular de las AKAPs, PKAs y PDEs es un punto clave en la regulación espacio-temporal del segundo mensajero AMPc. En este artículo se estudia el papel de la distribución celular del complejo mitocondrial AKAP149-PKA-PDE4A y sus implicaciones en la muerte celular inducida por el tratamiento con YTX, conocida como modulador de las PDEs. La línea celular K-562 se incubó con YTX durante 24 y 48 horas, y se estudiaron los niveles de AKAP149, de PKA y de PDE4A en el citosol, en la membrana plasmática y en el núcleo. También se midieron marcadores apoptóticos en las mismas condiciones. Además, se comprobó el efecto de la YTX en la viabilidad celular tras silenciar la AKAP149 y la PDE4A. Se observa una disminución de los niveles del complejo en el citosol tras el tratamiento con YTX. En las primeras 24 horas de incubación con la toxina, el complejo aumentó en la membrana plasmática mientras que 48 horas después de la incubación, los niveles del complejo aumentaron en el dominio nuclear. Además, tras 24 horas de tratamiento con YTX, los niveles de la Bcl-2 disminuyeron y la expresión de la caspasa 3 junto con la actividad de la caspasa 8 se incrementaron. Mientras que tras 48 horas de incubación con la toxina, no se observó ninguno de estos efectos. Estos resultados sugieren que a las 24 horas de incubación se activa la muerte celular apoptótica mientras que después de 48 horas se activa una muerte celular no-apoptótica. Cuando se silencian AKAP149 y la PDE4A, la YTX no induce muerte celular. En resumen, la localización del complejo AKAP149-PKA-PDE4A está relacionada con el efecto de la YTX en la línea celular K-562. Cuando este complejo se encuentra principalmente en la membrana plasmática, la apoptosis se activa, mientras que cuando se localiza en el núcleo, se activan procesos de muerte celular no-apoptótica o de diferenciación celular. Por lo tanto, la distribución e integridad del complejo AKAP149-PKA-PDE4A tiene un papel crucial en la supervivencia celular.

**Role of AKAP 149–PKA–PDE4A complex in cell survival and cell differentiation processes:**

[http://ac.els-cdn.com/S1357272514001435/1-s2.0-S1357272514001435-main.pdf?\\_tid=7ec6faf4-4f9a-11e4-94bd-00000aab0f02&acdnat=1412848749\\_0907f97eba698e58169a4ccb69884b29](http://ac.els-cdn.com/S1357272514001435/1-s2.0-S1357272514001435-main.pdf?_tid=7ec6faf4-4f9a-11e4-94bd-00000aab0f02&acdnat=1412848749_0907f97eba698e58169a4ccb69884b29)



## **I.2 La fosfodiesterasa 4A1 (PDE4A1) tiene una función clave en la regulación de la autofagia**

### Resumen

La YTX posee un gran potencial por sus efectos farmacológicos en procesos alérgicos, como inhibidor de la proliferación tumoral, o en enfermedades neurodegenerativas. Por ello conocer su mecanismo de acción es muy importante. En este artículo, se estudió el tipo de muerte celular no-apoptótica tras 48 horas de tratamiento con la YTX. La YTX aumenta los niveles de AMPc, que activa a la PKA en el núcleo y esta a su vez fosforila el factor de transcripción CREB (cAMP response element binding) que activa la síntesis de proteínas de diferenciación celular [287, 348, 349]. Además, la YTX reduce la viabilidad sin activar la apoptosis (apartado I.1). Por ello se estudiaron marcadores de diferenciación celular de la línea K-562 tras la incubación con la toxina. También se estudiaron marcadores autofágicos tras el tratamiento con YTX. Se incubaron las células de la línea K-562 con la YTX durante 24 y 48 horas. En estas condiciones se comprobó la diferenciación celular mediante el estudio de la expresión de la proteína phospho-CREB y el receptor de transferrina (TfR). Por otro lado, también se midieron los niveles de la proteína mTOR y de la LC3B para estudiar la activación de la autofagia. Los resultados muestran que tras 48 horas de incubación con YTX no se activa la diferenciación celular, pero sin embargo sí se pone en marcha la autofagia. Además a las 24 horas de tratamiento con la toxina, ninguno de estos procesos se activa, corroborando que a este tiempo el mecanismo por el que las células disminuyen su viabilidad es por la activación de la apoptosis. También se estudia el papel que desempeña el isotipo PDE4A1 en el efecto de la YTX. Se observa que esta enzima es crucial para la activación de la autofagia en la línea celular K-562, mediante ensayos en los que la PDE4A1 no estaba silenciada.

## **Key role of phosphodiesterase 4A1 (PDE4A1) in autophagy regulation**

Andrea Fernández-Araujo<sup>a</sup>, Amparo Alfonso<sup>a</sup>, Mercedes R. Vieytes<sup>b</sup> Luis M. Botana<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Dept. Farmacología, Facultad de Veterinaria, 27002 Lugo. Spain

<sup>b</sup> Dept. Fisiología, Facultad de Veterinaria, 27002 Lugo. Spain

\* Correspondence to:

Prof. Luis M. Botana

Dept. Farmacología, Fac. Veterinaria, 27002 Lugo, Spain

Tfn/Fax: 34 982 822 233. E mail: [Luis.Botana@usc.es](mailto:Luis.Botana@usc.es)



**Abstract**

Understanding the mechanism of action of the Yessotoxin (YTX) is crucial since it has potential pharmacological effects in allergic processes, as tumor proliferation inhibitor, or in neurodegenerative diseases. In this paper, the type of non-apoptotic cell death was studied after 48 hours of treatment with the toxin. Differentiation events were studied since it was described increment in cAMP levels in K-562 cell line and also decline of cell viability through a non-apoptotic cell death after YTX incubation. In addition, autophagic hallmarks were studied after the toxin exposure. K-562 cells were incubated with YTX for 24 and 48 hours. Under these conditions, cell differentiation was studied through the cyclic nucleotide response element binding (phospho-CREB) and the Transferrin Receptor (TfR) expression. On the other hand, the mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) and Light Chain 3B (LC3B) levels were measured to check autophagy activation. The results showed that cell differentiation was not occurring after 48 hours of incubation with the toxin while autophagy was triggered. Furthermore at 24 hours none of these processes were activated, corroborating the apoptosis as the main cell death type at this time. Moreover, the key role of the isotype PDE4A1 in autophagy activation was demonstrated by PDE4A1-silencing of K-562 cells before YTX incubations.

*Keywords*

Autophagy, YTX, mTOR, LC3, TfR.

## Introduction

Yessotoxins (YTX) group are marine toxins produced by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* and *Gonyaulax spinifera* [1]. These phycotoxins were originally isolated from the digestive gland of scallops *Patinopecten yessoensis* [2]. Phosphodiesterases (PDEs) are described as YTX target [3, 4]. In K-562 cells, the mitochondrial complex A-Kinase Anchoring Protein 149 (AKAP 149)-Protein Kinase A (PKA)-type 4A PDE (PDE4A) migrates from the mitochondria to plasma membrane and then to the nuclear envelope after the treatment with YTX [5]. The localization of the complex is involved in the activation of different cell death types, as apoptosis is triggered when the complex is located in the plasma membrane. However, when the complex is located in the nuclear envelope, a non-apoptotic cell death mechanism becomes activated [5]. YTX is also related with other types of programmed cell death such as paraptosis or autophagy [6, 7]. However non-differentiation events were described after YTX incubation.

The erythroleukemia K-562 cell line is an undifferentiated lineage that can be differentiated to various blood cell types after several stimuli [8]. This cell line is typically differentiated into megakaryocyte or erythrocyte lineage [9, 10]. After short-term treatment with YTX, cAMP levels were increased in the K-562 cell line [11]. It was described that the increment in cAMP levels are related with cellular differentiation in different cell lines [12, 13]. Moreover, the decreased levels of K-562 cells viability observed after 48 hours of YTX treatment [5], could be due to cell differentiation and thus the cell proliferation rate could decrease with respect to untreated cells [14, 15]. The catalytic (C) subunit of PKA diffuses into the nucleus through the nuclear envelope after its activation and separation from the regulatory (R) subunits [16], and in the nucleus, the catalytic portions of the protein kinases such as PKA or mitogen-activated protein kinases (MAPK), can phosphorylate the cAMP Response Element Binding (CREB) [17]. The active form of CREB, phospho-CREB, is a transcription factor that begins to traduce new genes to cellular differentiation [18, 19]. In the myeloid leukemia K-562 cell line, also called erythroleudemia cell line, the transcription factor phospho-CREB activates the erythroid differentiation [20]. In this sense, the Transferrin Receptor CD71 (TfR), is described as the erythroid precursor marker, and its levels decrease in mature erythrocytes [21]. The TfR is overexpressed in several types of tumor cell lines [22,

23]. This transmembrane glycoprotein, CD71, is responsible for the iron uptake from the extracellular medium into the cytosol playing a key role in K-562 metabolism [24, 25]. Therefore, alterations in its internalization dynamics can also result in cell death activation. In this sense, the CD71 can be related with the activation of apoptotic cell death after its internalization inhibition independently of iron availability [26]. The prolonged CD71 internalization inhibition, leads to a decrease in cell iron uptake [27]. Under low iron availability, the cell activates the recycling pathways to obtain the metal from iron-rich organelles and macromolecules through the activation of autophagy [28]. This autophagic mechanism, is a survival strategy to obtain basic elements when cells have deficit in nutrients. Also it is responsible for the turnover and reutilization of damaged proteins and organelles, but can degenerate into autophagic cell death [29, 30]. Autophagy involves the sequestration of damage organelles and proteins in double-membrane vacuoles called autophagosomes. These vacuoles fuse with lysosomes to form autolysosomes to degrade the material leaving available nutrients to cell growth [29, 31]. Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) has a key role in autophagy activation since under normal conditions this protein is phosphorylated (phospho-mTOR) and inhibits the autophagy. However, after nutrients deprivation or rapamycin treatment, the phosphorylation of mTOR is inhibited and this protein turns in the inactive form, hence triggering autophagy [29, 31, 32]. Autophagosomes that sequestered different parts of the cells are covered by the Light Chain 3 (LC3) protein [29, 31, 33]. There are 3 isoforms of LC3 protein in mammals: LC3A, LC3B and LC3C [34]. LC3 is synthesized as the cytosolic form of LC3-I to then form the LC3-II protein bound to the lipid membranes of the autophagosomes [34]. So mTOR and LC3 proteins are essential in autophagic processes. The cell viability decrease obtained in previous works after 48 hours of treatment with YTX lead us to investigate which type of cell death was being activated at this time. Furthermore the involvement of the mitochondrial AKAP 149-PKA-PDE4A complex and its movement to different cellular localizations with the cell death activation is also studied in this work.

## Materials and methods

### *Reagents and solutions*

YTX was from CIFGA Laboratories (Lugo, Spain). Anti- $\beta$ -tubulin I, Bovine serum albumin (BSA),  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Trizma hydrochloride, Triton X-100, glycine, trizma base, SDS (sodium dodecyl sulphate), hemin and Tween<sup>®</sup>20 were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$  and glucose were from Panreac (Barcelona, Spain). Anti-LC3B (Light Chain 3), anti-PDE4A, anti-VDAC1 (Voltage-dependent anion channel 1) and rapamycin were from ABCAM (CA, USA). Anti-Histone 1, anti- $\beta$ -Actin, anti-phospho-mTOR, Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and goat Anti-Rabbit IgG peroxidase conjugated were from Millipore (Ternecula, USA). Anti-phospho-CREBpSer133 was from Immunostep (Salamanca, Spain). Anti-Mouse IgG horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody was from GE Healthcare (Barcelona, Spain). Anti-CD71 phycoerythrin conjugated (anti-PE-CD71) and PDE4A1 siRNA (human) were from Santa Cruz Biotechnology (California, USA).

Polyacrylamide gels and molecular weight marker Precision Plus Protein<sup>™</sup> Standards Kaleidoscope<sup>™</sup> were purchased from BioRad<sup>®</sup> (Barcelona, Spain). Protease Inhibitor Complete Tablets and Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets were from Roche (Madrid, Spain). Free calcium and magnesium PBS used in flow cytometry assays was purchased from Gibco, Life Technologies (Madrid, Spain).

Physiological saline solution composition was (in mM):  $\text{Na}^+$  142.3;  $\text{K}^+$  5.94;  $\text{Ca}^{2+}$  1;  $\text{Mg}^{2+}$  1.2;  $\text{Cl}^-$  126.2;  $\text{HCO}_3^-$  22.85;  $\text{HPO}_4^{2-}$  1.2,  $\text{SO}_4^{2-}$  1.2; glucose 1 g/L was added to the medium giving an osmotic pressure of  $290 \pm 10$  mOsm/kg of  $\text{H}_2\text{O}$  and pH was adjusted to 7.2 with HCl 0.1 N from Panreac (Barcelona, Spain), and  $\text{CO}_2$ . PBS used to wash the western blotting membranes consisted of  $\text{NaCl}$  137 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10.14 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.76 mM;  $\text{KCl}$  2.68 mM; pH was adjusted to 7.2 with NaOH.

### *Cell culture*

K-562 cell line was from the National Cancer Institute (NCI's) and maintained in the Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 50 units/ml penicillin and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin. All these reagents were from Gibco, Life Technologies (Madrid, Spain). Cells were

growing at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Incubations with 30 nM YTX were carried out under these conditions of temperature, humidity and percentage of CO<sub>2</sub>.

#### *Subcellular fractionation*

3.10<sup>6</sup> cells per condition were incubated 24 and 48 hours with and without 30 nM YTX and cytosolic and nuclear fractions were obtained as explained before [5].

#### *Western blotting analysis*

Bradford from BioRad<sup>®</sup> (Barcelona, Spain) assay and the Direct Detect Spectrometer from Millipore (Ternecula, USA) were used to know sample protein concentration and BSA was used as protein standard. The different subcellular fractions were blotted to PVDF membrane by reduced SDS-PAGE. To determine the protein size and also to monitor the progress of electrophoretic runs, Precision Plus Protein<sup>™</sup> Standards Kaleidoscope<sup>™</sup> molecular weight marker was used. After blockage with 0.5% BSA the membranes were incubated 10 minutes with anti-phospho-CREB pSer133, anti-LC3B and anti-phospho-mTOR, then were washed three times with PBS and 0.1% Tween<sup>®</sup>20 and incubated for 10 minutes with secondary anti-mouse IgG horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody. After three washes, chemiluminescence was visualized with SuperSignal<sup>®</sup> West Pico (low intensity) (ThermoScientific, 34080), with SuperSignal<sup>®</sup> West Femto (high intensity) (ThermoScientific, 34095), or with Clarity<sup>™</sup> western ECL substrate (BioRad<sup>®</sup>). The chemiluminiscent signal was detected with the Diversity GeneSnap software and analyzed by the Diversity 4 gel documentation and analysis system. Relative protein expression was calculated in relation to β-actin expression for each experiment in cytosolic fraction and with Histone 1 in nuclear fraction [35]. Experiments were carried out at least three times by duplicate. The subcellular fraction purity was tested by measuring control proteins of each fraction: VDAC1/porin protein is present in the mitochondrial membrane and in plasma membrane. VDAC1 was positive in cytoplasm fraction that includes the mitochondrial portion. Histone 1 was only present in the nuclear fraction. And β-tubulin is located in both cytosol and nuclear fraction [36, 37].

*Flow cytometry assay and K-562 differentiation*

$2 \times 10^6$  cells per condition were incubated for 24 and 48 hours with and without 30 nM YTX. Under the same conditions, cells were incubated with 40  $\mu$ M hemin. Then, cells were washed twice with saline solution and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy Sciences) for 20 minutes at 4°C. Cells were centrifuged and washed with 500 $\mu$ L of PBS with 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Then, the cells were centrifuged and permeabilized by incubating on ice for 10 minutes with PBS-5% BSA-0.1% Triton X-100. The cells were then washed twice with PBS, following by the incubation with anti-PE-CD71 in a 1:100 dilution for 30 minutes at 37°C in darkness. Finally, the cells were washed twice with PBS and resuspended in a final volume of 100 $\mu$ L of PBS pH 7.2 and analyzed by flow cytometry technique. The data obtained from the measurement of the fluorescence intensity were analyzed by the IDEAS 4.0 Cell Image Analysis software.

*Transfection by lipid-based method (Genlantis)*

GeneSilencer<sup>®</sup> solutions from Genlantis (San Diego, USA) were prepared as described before [38].  $1.2 \times 10^6$  cells were incubated in a total volume of 500  $\mu$ l of RPMI 1640 medium with GeneSilencer<sup>®</sup> solutions and after 5 hours of transfection 500  $\mu$ l of RPMI 1640 was added and 19 hours later the cells were treated with 30 nM YTX and 80 nM rapamycin in each case for 24 and 48 hours. Control siRNA from Santa Cruz was used as negative control for evaluating RNAi off-target effects.

*Statistical analysis*

All the experiments were carried out at least three times by duplicate. Student's *t*-test and ANOVA were used to examine statistical significance, assumed for  $p < 0.05$ . Results were expressed as the means  $\pm$  SEM.

**Results**

Previous studies have shown the cytotoxic effect of YTX in K-562 cell line. Cells treated with YTX for 24 and 48 hours decreased their viability [11]. After 24 hours of YTX treatment, the apoptotic programmed cell death was activated, while after 48 hours apoptotic hallmarks were not detected. At this time, the complex AKAP 149-PKA-PDE4A was located in the nuclear envelope [5]. There, C subunits of PKA can diffuse through the nuclear envelope after its activation and phosphorylate the transcription factor CREB [16, 39]. Therefore, in this context, the

levels of phospho-CREB were checked. Figure 1 shows the phosphorylated CREB levels after 48 hours in the presence of YTX. Under these conditions, the nuclear expression of active CREB significantly increased a 15% (figure 1A), suggesting some K-562 cell differentiation probably into erythrocytes [40]. Hemin has been described as a potent K-562 cell line differentiation inductor into erythrocytes, through the decrease of CD71 levels in the plasma membrane [41-43]. Therefore, CD71 expression was measured in the K-562 cellular cover by flow cytometry after YTX treatment and compared to hemin-treated cells. Figure 2 shows the CD71 expression in the K-562 plasma membrane after 24 and 48 hours of treatment with YTX and hemin. Figures 2A to 2F show representative images of cells in brightfield (channel 05) and phycoerythrin (PE) intensity channels (channel 04). The percentage of phycoerythrin-CD71 (PE-CD71) intensity was obtained from histograms generated by IDEAS 4.0 Cell Image Analysis software (figure 2A-2F). The diagrams generated by the software represent in the X axis the PE intensity and in Y axis the cellular population. The displacement of the histogram to the right implies higher PE intensities and subsequent more levels of the CD71 in the cell membrane. Figures 2A, 2B and 2C show the cell images and histograms of PE-CD71 intensity in untreated, hemin- and YTX-treated cells respectively after 24 hours while in figures 2D, 2E and 2F, 48 hours treatments are shown. In hemin-treated cells, a displacement of the histograms towards the left with respect to untreated cells was observed, however in YTX-treated cells higher percentage of PE-CD71 intensity was shown by the displacement of the histogram towards the right. Figure 2G summarize in a graph these results and opposite effects are observed after YTX or hemin exposition. Hemin decreased 7% and 10% the CD71 expression after 24 and 48 hours respectively, while its expression was 18% and 10% enhanced by YTX after 24 and 48 hours, respectively. Therefore, considering these results, K-562 cell differentiation into erythrocytes was not activated by the treatment with the toxin. Since differentiation was not occurring, other types of cell death were checked after YTX exposure, in order to explain the results obtained in the Transferrin Receptor (TfR). The CD71 receptor can be related with the iron uptake and autophagy activation, therefore this type of cell death was studied [28]. Increased levels of the TfR, CD71 in the cell plasma membrane could be related with a deficit trafficking of CD71 towards the cytosol and as a consequence, autophagic cell death could be triggered, stimulated through nutrients deprivation [32]. So, different autophagic

hallmarks were checked after 24 and 48 hours of YTX incubation. As it was mentioned, autophagy is activated by rapamycin through the inhibition of mTOR from a phosphorylated to an unphosphorylated state, followed by the formation of vacuoles covered with LC3 protein [29, 32, 44]. Therefore, figure 3 shows the phospho-mTOR protein expression after 24 and 48 hours YTX incubation. No differences were found in phospho-mTOR levels compared to untreated K-562 cell line after 24 hours of YTX incubation (figure 3A). While the levels of the protein were significantly decreased by 41% after rapamycin treatment, in a similar fashion to co-incubation of YTX and rapamycin, that induced a 33% decrease of phosphorylated mTOR expression (figure 3A). However, after 48 hours of the treatment, YTX significantly decreased by 56% the phospho-mTOR expression (figure 3C). In the same way protein levels were decreased significantly by 85% and 66% after rapamycin and YTX-rapamycin treatments, respectively (figure 3C). Therefore, the results point to the activation of autophagy cell death only after 48 hours but not after 24 hours of the toxin incubation. In order to clarify if the whole autophagic process was taking place, we checked the LC3B protein isotype. This protein usually is located in the autophagosome envelope after autophagy activation [45]. Figure 4 shows LC3B levels after incubation with YTX. Surprisingly, after 24 hours LC3B expression was significantly increased 47% respect to untreated cells, this effect being an 88% increase after rapamycin treatment (figure 4A). After 48 hours of treatment with YTX and rapamycin, LC3B levels were highly increased 154% and 100% respectively (figure 4C). Moreover, it was observed that the protein PDE4A1 is crucial in those pathways activated by YTX in the K-562 cell line. After YTX treatment, PDE4A1-silenced K-562 cells avoid the translocation of mitochondrial complex AKAP 149-PKA-PDE4A from the cytosol and in consequence K-562 cell death is inhibited [5]. Therefore, autophagy hallmarks were studied after the exposition to the toxin in PDE4A1-silenced K-562 cell line. Figure 5 shows the effectiveness of lipid-based transfection method after PDE4A1-silencing for 48 and 72 hours. As figure 5A represents, a decrease of 50% and 55% in PDE4A expression was observed after 48 and 72 hours of transfection, respectively. Next the autophagic hallmarks were checked in the PDE4A1-silenced K-562 population. In figure 6, phospho-mTOR expression is shown after 24 and 48 hours of YTX and rapamycin treatment in untransfected and PDE4A1-silenced cells. As it was described, no effect in mTOR phosphorylated expression was observed after 24

hours of treatment with the toxin, while a significantly decrease of 41% was detected in rapamycin-treated cells (figure 6A). In PDE4A1-silenced cells no changes were observed in phospho-mTOR expression after YTX exposure while a decrease of 60%, similar to untransfected cells, was detected in rapamycin treatment (figure 6A). So, after 24 hours, PDE4A1 does not change the effect of the treatments on phospho-mTOR protein. Figure 6D shows the expression of mTOR phosphorylated after 48 hours of YTX and rapamycin treatment in untransfected and PDE4A1-silenced cells. Rapamycin incubation decrease significantly 85% the phospho-mTOR expression in untransfected cells and 72% in PDE4A1-silenced population. Therefore, 48 hours after incubation, PDE4A1-silencing does not change the effect of rapamycin on phospho-mTOR expression, as expected, since rapamycin directly acts on phospho-mTOR. However the phosphorylated mTOR levels were different in untransfected and PDE4A1-silenced cells after YTX treatment. YTX-treated untransfected cells decreased significantly by 56% the phospho-mTOR expression, while after PDE4A1-silencing, no changes in the phospho-mTOR levels were observed after YTX treatment (figure 6D). In addition, LC3B expression was studied in PDE4A1-silenced population (figures 7). The expression of this protein is significantly increased after PDE4A1-silencing. LC3B levels are 179% higher in PDE4A1-silenced control cells compared to untransfected control K-562 cells (figure 7A). However, while in untransfected cells the LC3B expression increase after YTX or rapamycin treatment, the levels of this protein are significantly decreased by 80% and 120% after YTX and rapamycin exposure for 24 hours respectively in PDE4A1-silenced population as compared to PDE4A1-silenced control cells (figure 7A). After 48 hours of treatment, LC3B expression is also significantly increased in PDE4A1-silenced untreated population compared to untransfected control cells (figure 7D). In this case, similar to the result after 24 hours incubation, LC3B levels are significantly decreased after YTX and rapamycin treatment in PDE4A1-silenced cells, around 70% and 100% respectively, compared to untreated PDE4A1-silenced cells.

Therefore, our data show that no K-562 differentiation was occurring after YTX treatment, since the protein receptor CD71 was increased after the incubation with the toxin. Furthermore, 48 hours after YTX exposition, the autophagy hallmarks phospho-mTOR and LC3B protein levels are modified, while after 24 hours only LC3B but not phospho-mTOR was changed. Moreover, an important interaction

between PDE4A1 and LC3B protein is shown after PDE4A1-silenced experiments and a surprising synergism occurs between YTX and rapamycin treatment with this silenced population of cells.

### **Discussion**

Recent studies have shown in K-562 a decrease in cell viability through different cell death types after long-term incubations with YTX. While after YTX treatment for 24 hours apoptotic cell death was activated, a non-apoptotic cell death pathway was taking over after 48 hours of toxin exposure. Different theories were pointed out about the non-apoptotic cell death type after 48 hours. At this time, the mitochondrial complex AKAP 149-PKA-PDE4A increases its levels in the nucleus [5]. There, the catalytic subunits of PKA anchored to AKAP 149 could be translocated into the nucleus through the nuclear envelope to phosphorylate CREB protein, and activate K-562 cell line differentiation [16, 19, 20]. Phosphorylated CREB protein is involved in the transcription of new genes leading K-562 cell differentiation to erythrocytes [20, 46]. As a consequence of cell differentiation, cell viability could decrease through the lost of cell proliferation [14]. However the results of the transferrin membrane receptor, CD71, show no cell differentiation into erythrocytes. The measurement of the CD71 after 24 and 48 hours of toxin treatment, has shown an opposite effect to those observed in cells incubated with hemin, a K-562 differentiation inducer. The CD71 is overexpressed in cells with high proliferation rate, in tumor cells and in erythroid precursors [21, 24]. Hemin activates K-562 cell line differentiation into erythrocytes through the decrease of the Transferrin Receptor, CD71 in the cell plasma membrane [21, 43]. However, YTX treatment increased significantly the CD71 expression at 24 and 48 hours. The increment of the CD71 in the plasma membrane can be due to the inhibition of the receptor internalization [24]. This inhibition in the first 24 hours can be related with the activation of apoptosis, as it was described after gambogic acid treatment of different tumor cell lines [26]. But the effect of gambogic acid is also mediated by the activation of mitochondrial apoptosis since the compound was detected also in the cytoplasm, not only at transmembrane level [47]. So the mitochondrial apoptotic pathway and the internalization inhibition of CD71 receptor can be connected through several pathways [48, 49]. After 24 hours, the mitochondrial complex AKAP 149-PKA-PDE4A migrates to the plasma membrane and apoptosis was activated in

K-562 cell line [5]. The inhibition of the CD71 internalization could be mediated by the increased levels of PKA in this localization after YTX treatment, since this protein is involved in endocytotic events [50]. In addition, the autophagic protein phospho-mTOR did not decrease its levels, corroborating the activation of apoptosis in the first 24 hours with YTX [5]. Moreover, the PDE4A1 enzyme and the AKAP 149-PKA-PDE4A complex do not interact with mTOR since the protein levels were not changed, and this was also confirmed by the results shown with the PDE4A1-silenced cells. After 24 hours, the levels of LC3B protein were significantly increased. Although LC3B is intimately associated to autophagic processes [45], the higher levels of this protein detected in the first 24 hours of the YTX treatment can be related with apoptosis. LC3B protein is described in the activation of extrinsic apoptotic cell death after its interaction with extrinsic apoptotic factor Fas through the caveolin-1 (Cav-1) protein [51]. This result correlates with the caspase 8 activation observed only after 24 hours of YTX incubation previously described [5]. When the cells are treated with YTX, no external ligands activate death-inducing signaling complex (DISC) that mediates the activation of procaspase 8 into caspase 8 after the binding of the ligand to the complex [52]. Therefore the activation of caspase 8 seems to take place through the internal activation of Fas receptor and this can happen after LC3B interaction with Cav-1 [51]. Moreover LC3 has a PKA phosphorylation site and through this phosphorylation it leads to the inhibition of the autophagy [53]. This interaction could be happening due to the high cytosolic levels of PKA measured in the first 24 hours during YTX treatment [5]. Therefore after 24 hours of treatment, the LC3B is not involved in autophagic events but it can be triggering apoptosis. Therefore, at this time, only apoptosis is being activating by YTX treatment and no autophagy events were observed. Furthermore, after 24 hours of treatment and 48 hours of transfection, PDE4A1-silencing triggers an increase of LC3B levels in control cells higher than those observed after YTX or rapamycin incubation in the untransfected population. Also, this high expression of LC3B protein does not induce cell death, since viability assays do not show K-562 viability decrease (data not shown). Surprisingly, when K-562 PDE4A1-silenced are treated with YTX or rapamycin, LC3B expression are significantly decreased respect to PDE4A1-silenced control cells. Therefore, the treatments with YTX or rapamycin increased LC3B protein, and PDE4A1-silencing also increased its levels, although the synergism of both PDE4A1-silencing and YTX or rapamycin incubation

decreased LC3B expression after 24 hours to levels close to the untransfected control. This effect was more evident after 48 hours of treatment and 72 hours of PDE4A1-silencing. At this time, PDE4A1-silenced control cells increased LC3B expression, as well as YTX and rapamycin treatments in untransfected cells. However, the protein returns to untransfected control levels after the incubation with YTX or rapamycin in PDE4A1-silenced population. Little is known about the PDEs implication in autophagic pathways. However, the PDE subtype 4A4 (PDE4A4) was described and related to the autophagosomes formation through the interaction with the scaffold protein p62 (sequestosome1 SQSTM1), involved in autophagosomes formation [54-56]. PDE4A4 recruits p62 in a reversible way, after the PDE4 inhibition with rolipram, by the binding of the inhibitor to the catalytic pocket of the PDE4A4. The authors focused on the fact that rapamycin inhibits the PDE4A-p62 aggregation by irreversibly sequestering the p62, lowering the amount of free p62 to aggregate with PDE4A4, so PDE4 is related with the autophagic p62 protein after rolipram stimulation, but not after rapamycin incubation [56]. Other investigations suggest that autophagy hallmarks present in extensor digitorum longus (EDL) muscles of fasted rats are decreased after rolipram treatment [57]. But the PDE4A1 protein expression is reduced in our PDE4A1-silenced population, not inhibited, so we are showing a new involvement of the PDE4A1 protein in the conventional rapamycin-induced autophagic pathway. Furthermore, the siRNA used to silence the PDE4A is recommended to PDE4A1 silencing in human cells, so a different PDE4A subtype is shown as modulator of these pathways. Another interesting observation obtained pertains to the LC3B protein levels after 24 hours of YTX incubation. These results could explain the activation of the death receptor and subsequent caspase 8 activation detected after YTX treatment in recent studies [5]. Caspase 8 could be activated by LC3B interaction with the Fas receptor through Cav-1 [51]. This theory had never been described previously to explain a mechanism after YTX exposure [58].

On the other hand, after 48 hours of YTX incubation have shown increase of phospho-CREB levels in the nucleus. These results suggest K-562 differentiation into erythrocytes, as it was explained above. However differentiation was not occurring since the CD71 receptor increases its levels in the plasma membrane after 48 hours of YTX incubation. So by discarding K-562 differentiation at 48 hours of

treatment with the toxin, other type of programmed cell death was postulated as an alternative to explain the decrease in cell viability. A recent study demonstrated that the treatment with YTX activates autophagy after endoplasmic reticulum stress [7]. Furthermore, our previous results shown that in the first 24 hours of YTX exposure, caspase 8 was activated but after 48 hours this activation disappears [5]. In addition it was described that autophagy is dependent on caspase 8 activity, when caspase 8 is activated, the autophagy is blocked [59]. Therefore, after 24 hours of treatment, autophagy cell death was not occurring, however after 48 hours, autophagic hallmarks were observed. At this time of treatment, activation of CREB protein was detected and the involvement of this protein with autophagy is not clear. Some authors have described that formoterol activates CREB and acts on Akt-mTOR pathway to finally increase the levels of LC3B, having a connection between phospho-CREB and autophagy activation [60]. Other authors describe that the antiapoptotic protein Bcl-2 inhibits Beclin-1 and autophagy is blocked. The Bcl-2 is regulated by CREB so that downregulation of CREB decreases Bcl-2 and autophagy is triggered [61, 62]. However our results suggest that 48 hours after YTX treatment autophagy is activated and phospho-CREB levels increased, and previous works have shown no effect in Bcl-2 expression after 48 hours of YTX treatment [5]. Therefore, the implication of the transcription factor, phospho-CREB, in autophagy remains unclear. Since after 48 hours of YTX incubation phospho-mTOR and LC3B expression demonstrate autophagy activation, the role of phospho-CREB in this pathway should be studied. The activation of autophagy at this time but not before could be explained by the prolonged deficient endocytosis of iron by the inhibition of CD71 traffic to the cytoplasm. Since after iron deprivation, phospho-mTOR levels are decreased in K-562, suggesting autophagy activation through nutrient deprivation [63]. The PDE4A1-silencing results in autophagic proteins levels are very intriguing. In autophagic cells incubated with rapamycin, no interactions were observed between PDE4A1 and phospho-mTOR proteins. However, after 48 hours YTX treatment in PDE4A1-silenced population, phospho-mTOR protein levels return to untreated levels. Therefore, autophagy activated by YTX is dependent on PDE4A1 protein. So, as our previous study shown, after 48 hours of YTX exposure, the AKAP 149-PKA-PDE4A complex is increased in the nuclear envelope and after PDE4A1-silencing, the complex was not translocated from the cytoplasm [5]. And the present results show autophagy activation. In SH-SY5Y cells it was described a similar effect after

rapamycin treatment. This compound triggers the type II $\alpha$  Regulatory subunit of PKA (RII $\alpha$ ) phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK), to then activate the nuclear translocation of the C subunit of PKA [64]. So YTX effect in K-562 cell line after 48 hours can be activating autophagy through the complex AKAP 149-PKA-PDE4A migration to the nucleus. Moreover, other studies point to PKA as a modulator of the mTOR and autophagy [65]. The RI $\alpha$  of PKA is needed to autophagy induction, RI $\alpha$ -silenced cells decreased autophagy and increased phospho-mTOR expression and mTOR activity [65]. Our studies suggest that after 48 hours of YTX exposure, cytosolic RII $\alpha$  of PKA was decreased but it was increased in the nucleus, and autophagy was triggered, while after PDE4A-silencing, RII $\alpha$  expression was not changed in the cytosol and autophagy was avoided (figures 6 and 7) [5]. Therefore, PKA could be having a key role in autophagy after its activation and translocation to nucleus.

In summary, the results presented in this paper, elucidate the non-apoptotic pathway activated in K-562 by YTX after 48 hours of incubation. It is also demonstrated in this work that YTX can induce cross talks between apoptosis and autophagy cell deaths. Moreover, new theoretical activation of extrinsic apoptotic cell death was pointed out after YTX treatment through the cytosolic PKA, LC3B and the interaction of this protein with Fas receptor activating the caspase 8. A model proposing the suggested mechanisms is shown in figure 8. On the other hand, autophagy activation by the toxin point the YTX as a potential pharmacological compound against cancer disorders, since autophagy is becoming a therapy to tumor cells because it is a pathway typically altered in this type of cells [66, 67]. Furthermore the involvement of PDE4A1 in rapamycin-activated autophagic pathway was demonstrated downstream of mTOR inhibition and upstream of LC3 production. Also the synergism between PDE4A1-silencing and YTX or rapamycin treatment produce a decrease on LC3B expression levels while these two events separately increased the protein levels.

### **Acknowledgements**

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofunded-grants. From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía y Competitividad, AGL2009-13581-C02-01, AGL2012-

40185-CO2-01 and Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, GRC2013-016, and through Axencia Galega de Innovación, Spain, ITC-20133020 SINTOX, IN852A 2013/16-3 MYTIGAL. From CDTI under ISIP Programme, Spain, IDI-20130304 APTAFOOD.

From the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA – Research Executive Agency (FP7/2007-2013) under grant agreement Nos. 265409  $\mu$ AQUA, 315285 CIGUATOOLS and 312184 PHARMASEA. Andrea Fernández Araujo is supported by a fellowship from Subprograma de Formación de Personal Investigador (AGL2009-13581-C02-01), Spain.

**Statement of conflicts of interest**

None.



## References

1. Satake M, MacKenzie L, Yasumoto T: **Identification of Protoceratium reticulatum as the biogenetic origin of yessotoxin.** *Natural Toxins* 1997, **5**(4):164-167.
2. Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T: **Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning.** *Tetrahedron Letters* 1987, **28**(47):5869-5872.
3. Alfonso A, de la Rosa L, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity: Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes.** *Biochemical Pharmacology* 2003, **65**(2):193-208.
4. Alfonso C, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Quantification of yessotoxin using the fluorescence polarization technique, and study of the adequate extraccion procedure.** *Analytical Biochemistry* 2005, **344**:266-274.
5. Fernández-Araujo A, Tobío A, Alfonso A, Botana LM: **Role of AKAP 149–PKA–PDE4A complex in cell survival and cell differentiation processes.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2014, **53**(0):89-101.
6. Korsnes MS, Espenes A, Hetland DL, Hermansen LC: **Paraptosis-like cell death induced by yessotoxin.** *Toxicology in vitro* 2011, **25**(8):1764-1770.
7. Rubiolo JA, López-Alonso H, Martínez P, Millán A, Cagide E, Vieytes MR, Vega FV, Botana LM: **Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3.** *Cellular Signalling* 2014, **26**(2):419-432.
8. Tsiftoglou AS, Pappas IS, Vizirianakis IS: **Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells.** *Pharmacology & Therapeutics* 2003, **100**(3):257-290.
9. Huang HL, Chen YC, Huang YC, Yang KC, Pan H, Shih SP, Chen YJ: **Lapatinib induces autophagy, apoptosis and megakaryocytic differentiation in chronic myelogenous leukemia K562 cells.** *PLoS One* 2011, **6**(12):e29014.
10. Osti F, Corradini FG, Hanau S, Matteuzzi M, Gambari R: **Human leukemia K562 cells: induction to erythroid differentiation by guanine, guanosine and guanine nucleotides.** *Haematologica* 1997, **82**(4):395-401.
11. Tobío A, Fernández-Araujo A, Alfonso A, Botana LM: **Role of yessotoxin in calcium and cAMP-crosstalks in primary and K-562 human lymphocytes: The effect is mediated by Anchor kinase a mitochondrial proteins.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2012, **113**(12):3752-3761.
12. Vassaux G, Gaillard D, Ailhaud G, Négrel R: **Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca(2+)-elevating agent.** *Journal of Biological Chemistry* 1992, **267**(16):11092-11097.

13. Copsel S, Garcia C, Diez F, Vermeulem M, Baldi A, Bianciotti LG, Russel FG, Shayo C, Davio C: **Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation.** *J Biol Chem* 2011, **286**(9):6979-6988.
14. Ren JG, Seth P, Everett P, Clish CB, Sukhatme VP: **Induction of erythroid differentiation in human erythroleukemia cells by depletion of malic enzyme 2.** *PLoS One* 2010, **5**(9).
15. Tortora G, Clair T, Katsaros D, Ally S, Colamonici O, Neckers LM, Tagliaferri P, Jahnsen T, Robins RK, Cho-Chung YS: **Induction of megakaryocytic differentiation and modulation of protein kinase gene expression by site-selective cAMP analogs in K-562 human leukemic cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**(8):2849-2852.
16. Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS, Tsien RY: **Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion.** *Molecular Biology of the Cell* 1993, **4**:993-1002.
17. Shaywitz AJ, Greenberg ME: **CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:821-861.
18. Pellegrini M, Cheng JC, Voutila J, Judelson D, Taylor J, Nelson SF, Sakamoto KM: **Expression profile of CREB knockdown in myeloid leukemia cells.** *BMC Cancer* 2008, **8**:264.
19. Li Y, Yin W, Wang X, Zhu W, Huang Y, Yan G: **Cholera toxin induces malignant glioma cell differentiation via the PKA/CREB pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(33):13438-13443.
20. Di Pietro R, di Giacomo V, Caravatta L, Sancilio S, Rana RA, Cataldi A: **Cyclic nucleotide response element binding (CREB) protein activation is involved in K562 erythroleukemia cells differentiation.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2007, **100**(4):1070-1079.
21. Marsee DK, Pinkus GS, Yu H: **CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens.** *American Journal of Clinical Pathology* 2010, **134**(3): 429-435.
22. Ryschich E, Huszty G, Knaebel HP, Hartel M, Büchler MW, Schmidt J: **Transferrin receptor is a marker of malignant phenotype in human pancreatic cancer and in neuroendocrine carcinoma of the pancreas.** *European Journal of Cancer* 2004, **40**(9):1418-1422.

23. Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE, Mason DY: **Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance.** *Journal of Clinical Pathology* 1983 **36(5)**:539–545.
24. Daniels TR, Delgado T, Helguera G, Penichet ML: **The transferrin receptor part II: Targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells.** *Clinical Immunology* 2006, **121(2)**:159-176.
25. Bottomley SS, Wolfe LC, Bridges KR: **Iron metabolism in K562 erythroleukemic cells.** *J Biol Chem* 1985, **260(11)**:6811-6815.
26. Kasibhatla S, Jessen KA, Maliartchouk S, Wang JY, English NM, Drewe J, Qiu L, Archer SP, Ponce AE, Sirisoma N *et al*: **A role for transferrin receptor in triggering apoptosis when targeted with gambogic acid.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102(34)**:12095-12100.
27. Ponka P, Lok CN: **The transferrin receptor: role in health and disease.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999, **31**: 1111-1137.
28. Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT: **Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis.** *Histochem Cell Biol* 2008, **129(4)**:389-406.
29. Codogno P, Meijer AJ: **Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death.** *Cell Death and Differentiation* 2005, **12**:1509–1518.
30. Kurz T, Eaton JW, Brunk UT: **The role of lysosomes in iron metabolism and recycling.** *Int J Biochem Cell Biol* 2011, **43(12)**:1686-1697.
31. Stern ST, Adiseshaiyah PP, Crist RM: **Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity.** *Particle and Fibre Toxicology* 2012, **9**:20.
32. Klionsky DJ, Emr SD: **Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation.** *Science* 2000, **290(5497)**:1717-1721.
33. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, Lotze MT, White E: **Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment.** *Clin Cancer Res* 2011, **17(4)**:654-666.
34. Lazova R, Camp RL, Klump V, Siddiqui SF, Amaravadi RK, Pawelek JM: **Punctate LC3B Expression Is a Common Feature of Solid Tumors and Associated with Proliferation, Metastasis, and Poor Outcome.** *Clinical Cancer Research* 2012, **18(2)**:370-379.
35. Tobío A, Alfonso A, Botana LM: **C-kit mutations and PKC crosstalks: PKC translocates to nucleus only in cells HMC560,816.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2011, **112(9)**:2637-2651.
36. Lawen A, Ly JD, Lane DJR, Zarschler K, Messina A, Pinto VD: **Voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1)—a mitochondrial protein, rediscovered**

as a novel enzyme in the plasma membrane. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005, **37**(2):277-282.

37. Walss C, Kreisberg JI, Ludueña RF: **Presence of the  $\beta$ II isotype of tubulin in the nuclei of cultured mesangial cells from rat kidney.** *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1999, **42**(4):274-284.

38. Tobío A, Alfonso A, Fernández-Araujo A, Alonso E, Botana LM: **Protein Kinase C Modulates Aurora-kinase Inhibition Induced by CCT129202 in HMC-1560,816 Cell Line.** *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 2013, **12**:265-276.

39. Sample V, DiPilato LM, Yang JH, Ni Q, Saucerman JJ, Zhang J: **Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP.** *Nature Chemical Biology* 2012, **8**(4):375-382.

40. Mei Y, Yin N, Jin X, He J, Yin Z: **The regulatory role of the adrenergic agonists phenylephrine and isoproterenol on fetal hemoglobin expression and erythroid differentiation.** *Endocrinology* 2013, **154**(12):4640-4649.

41. Honma Y, Okabe-Kado J, Hozumi M, Uehara Y, Mizuno S: **Induction of erythroid differentiation of K562 human leukemic cells by herbimycin A, an inhibitor of tyrosine kinase activity.** *Cancer Res* 1989, **49**(2):331-334.

42. Rowley PT, Ohlsson-Wilhelm BM, Farley BA, LaBella S: **Inducers of erythroid differentiation of K562 human leukemia cells.** *Experimental Hematology* 1981, **9**(1):32-37.

43. Wu XR, Xue M, Li XF, Wang Y, Wang J, Han QL, Yi ZC: **Phenolic metabolites of benzene inhibited the erythroid differentiation of K562 cells.** *Toxicol Lett* 2011, **203**(3):190-199.

44. Khan MI, Mohammad A, Patil G, Naqvi SA, Chauhan LK, Ahmad I: **Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles.** *Biomaterials* 2012, **33**(5):1477-1488.

45. Wu J, Dang Y, Su W, Liu C, Ma H, Shan Y, Pei Y, Wan B, Guo J, Yu L: **Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B—Two novel markers of autophagosome.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, **339**(1):437-442.

46. Zhang L, Zambon AC, Vranizan K, Pothula K, Conklin BR, Insel PA: **Gene expression signatures of cAMP/protein kinase A (PKA)-promoted, mitochondrial-dependent apoptosis. Comparative analysis of wild-type and cAMP-deathless S49 lymphoma cells.** *Journal of Biological Chemistry* 2008, **283**(7):4304-4313.

47. Yang Y, Yang L, You QD, Nie FF, Gu HY, Zhao L, Wang XT, Guo QL: **Differential apoptotic induction of gambogic acid, a novel anticancer natural product, on hepatoma cells and normal hepatocytes.** *Cancer Lett* 2007, **256**(2):259-266.

48. Tampo Y, Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Keszler A, Joseph J, Kalyanaraman B: **Oxidative Stress–Induced Iron Signaling Is Responsible for Peroxide-Dependent Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein in Endothelial Cells.** *Circulation Research* 2003, **92**:56-63.
49. Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Joseph J, Kalyanaraman B: **Oxidative Stress–Induced Iron Signaling Is Responsible for Peroxide-Dependent Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein in Endothelial Cells. Role of Transferrin Receptor–Dependent Iron Uptake** *The Journal of Biological Chemistry* 2002 **277**(19):17179-17187.
50. Salazar G, Gonzalez A: **Novel mechanism for regulation of epidermal growth factor receptor endocytosis revealed by protein kinase A inhibition.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**(5):1677-1693.
51. Chen ZH, Lam HC, Jin Y, Kim HP, Cao J, Lee SJ, Ifedigbo E, Parameswaran H, Ryter SW, Choi AM: **Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(44):18880-18885.
52. Korsnes MS, Espenes A: **Yessotoxin as an apoptotic inducer.** *Toxicon* 2011, **57**:947-958.
53. Cherra SJ, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW, Chu CT: **Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation.** *J Cell Biol* 2010, **190**(4):533-539.
54. Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T: **Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies.** *J Biol Chem* 2010, **285**(8):5941-5953.
55. Day JP, Lindsay B, Riddell T, Jiang Z, Allcock RW, Abraham A, Sookup S, Christian F, Bogum J, Martin EK *et al*: **Elucidation of a structural basis for the inhibitor-driven, p62 (SQSTM1)-dependent intracellular redistribution of cAMP phosphodiesterase-4A4 (PDE4A4).** *J Med Chem* 2011, **54**(9):3331-3347.
56. Christian F, Anthony DF, Vadrevu S, Riddell T, Day JP, McLeod R, Adams DR, Baillie GS, Houslay MD: **p62 (SQSTM1) and cyclic AMP phosphodiesterase-4A4 (PDE4A4) locate to a novel, reversible protein aggregate with links to autophagy and proteasome degradation pathways.** *Cell Signal* 2010, **22**(10):1576-1596.
57. Lira EC, Goncalves DA, Parreiras-E-Silva LT, Zanon NM, Kettelhut IC, Navegantes LC: **Phosphodiesterase-4 inhibition reduces proteolysis and atrogenes expression in rat skeletal muscles.** *Muscle Nerve* 2011, **44**(3):371-381.
58. Korsnes MS: **Yessotoxin as a Tool to Study Induction of Multiple Cell Death Pathways.** *Toxins* 2012, **4**(7):568-579.

59. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ: **Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8.** *Science* 2004, **304**(5676):1500-1502.
60. Joassard OR, Amirouche A, Gallot YS, Desgeorges MM, Castells J, Durieux AC, Berthon P, Freyssenet DG: **Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013, **45**(11):2444-2455.
61. Wang M, Crager M, Pugazhenthii S: **Modulation of apoptosis pathways by oxidative stress and autophagy in beta cells.** *Exp Diabetes Res* 2012, **2012**:647914.
62. Jambal P, Masterson S, Nesterova A, Bouchard R, Bergman B, Hutton JC, Boxer LM, Reusch JE, Pugazhenthii S: **Cytokine-mediated down-regulation of the transcription factor cAMP-response element-binding protein in pancreatic beta-cells.** *J Biol Chem* 2003, **278**(25):23055-23065.
63. Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K: **The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1.** *Cancer Science* 2009, **100**(5):970-977.
64. Liu Y, Su Y, Wang J, Sun S, Wang T, Qiao X, Run X, Li H, Liang Z: **Rapamycin decreases tau phosphorylation at Ser214 through regulation of cAMP-dependent kinase.** *Neurochemistry international* 2013, **62**(4):458-467.
65. Mavrakis M, Lippincott-Schwartz J, Stratakis CA, Bossis I: **Depletion of type IA regulatory subunit (RI $\alpha$ ) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency.** *Human Molecular Genetics* 2006, **15**(19):2962-2971.
66. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S: **The role of autophagy in cancer development and response to therapy.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(9):726-734.
67. Kimmelman AC: **The dynamic nature of autophagy in cancer.** *Genes Dev* 2011, **25**(19):1999-2010.

### Figure legends

**Figure 1: Effect of YTX on nuclear phospho-CREB expression in human K-562 cell line.** (A): Percentage of nuclear phospho-CREB levels in K-562 cell line after the incubation with 30 nM YTX for 48 hours (37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Mean±SEM of three experiments. Nuclear phospho-CREB values were calculated respect to Histone-1 band intensity. 10.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 µg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells. (B): Representative experiment after 48 hours of incubation. (C): Representative proteins as positive and negative controls of the nuclear fraction purity.

**Figure 2: Effect of YTX on plasma membrane levels of CD71 receptor in K-562 cell line:** Representative cellular images and histograms of the CD71 expression in control cells, hemin- and YTX-treated cells after 24 hours (A, B, C respectively) and after 48 hours (D, E, F respectively) of incubation. Brightfield images are represented in channel 05 and PE intensity images are shown in channel 04. (G): Percentage of cells with CD71 expression in plasma membrane after YTX treatment. Open bars: 40 µM hemin-treated cells after 24 (on the left) and 48 hours (on the right). Black bars: 30 nM YTX-treated cells after 24 (on the left) and 48 hours (on the right). Data referred to untreated cells. Mean±SEM of three experiments (5000 cells were analyzed in each experiment). (\*) Significant differences between untreated and hemin- and YTX-treated cells.

**Figure 3: Effect of YTX on cytosolic phospho-mTOR expression in human K-562 cell line.** (A) and (C): Percentage of cytosolic phospho-mTOR levels in K-562 cell line after the incubation with 30 nM YTX, 80 nM rapamycin, and co-incubation of both for 24 and 48 hours, respectively (37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Mean±SEM of three experiments. Cytosolic phospho-mTOR values were calculated respect to β-actin band intensity. 4.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 µg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX- and rapamycin-treated cells. (B) and (D): Representative experiments after 24 and 48 hours of incubation, respectively. (E): Representative proteins as positive and negative controls of the cytosolic fraction purity.

**Figure 4: Effect of YTX on cytosolic LC3B expression in human K-562 cell line.** (A) and (C): Percentage of cytosolic LC3B levels in K-562 cell line after the incubation with 30 nM YTX and 80 nM rapamycin for 24 and 48 hours, respectively (37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Mean±SEM of three experiments. Cytosolic LC3B values were calculated respect to β-actin band intensity. 4.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 µg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences

between untreated and YTX- and rapamycin-treated cells. **(B)** and **(D)**: Representative experiment after 24 and 48 hours of incubation, respectively. **(E)**: Representative proteins as positive and negative controls of the cytosolic fraction purity.

**Figure 5: Determination of PDE4A1 silencing efficiency by western blotting analysis in K-562 cell line.** **(A)**: Percentage of cytosolic PDE4A levels in K-562 cell line after 48 and 72 hours of PDE4A1 siRNA transfection (37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic PDE4A values were calculated respect to β-actin band intensity. 4.10<sup>6</sup> cells per condition were treated and 20 μg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untransfected and siPDE4A1 transfected K-562 cell line. **(B)** and **(C)**: Representative experiment after 48 and 72 hours of PDE4A1-silenced K-562 cell line respectively. **(D)**: Representative proteins as positive and negative controls of the cytosolic fraction purity.

**Figure 6: Effect of YTX on cytosolic phospho-mTOR expression in PDE4A1-silenced K-562 cell line.** Cells were first incubated with the PDE4A1 siRNA for 24 hours and then for 24 and 48 hours plus with 30 nM YTX and 80 nM rapamycin (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A)** and **(D)**: Percentage of cytosolic phospho-mTOR levels in K-562 cell line after 24 and 48 hours, respectively. Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic phospho-mTOR values were calculated respect to β-actin band intensity. 4.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 μg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX- and rapamycin-treated cells. **(B)** and **(C)**: Representative experiment of western blot band intensity of cytosolic phospho-mTOR in untransfected and PDE4A1-silenced cells respectively after 24 hours of treatment. **(E)** and **(F)**: Representative experiment of western blot band intensity of cytosolic phospho-mTOR in untransfected and PDE4A1-silenced cells respectively after 48 hours of treatment. **(G)**: Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 7: Effect of YTX on cytosolic LC3B expression in PDE4A1-silenced K-562 cell line.** Cells were first incubated with the PDE4A1 siRNA for 24 hours and then for 24 and 48 hours plus with 30 nM YTX and 80 nM rapamycin (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A)** and **(D)**: Percentage of cytosolic LC3B levels in K-562 cell line. Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic LC3B values were calculated respect to β-actin band intensity. 4.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 μg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX- and rapamycin-treated cells. (#) Significant differences between untransfected and PDE4A1-silenced cells. **(B)** and **(C)**: Representative experiment of western blot bands intensity of cytosolic LC3B in untransfected and PDE4A1-silenced cells respectively after 24 hours of treatment. **(E)** and

(F): Representative experiment of western blot bands intensity of cytosolic LC3B in untransfected and PDE4A1-silenced cells respectively after 48 hours of treatment. (D): Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 8: Possible models activated after YTX incubation.** Model of pathways activated after incubation with YTX for 24 and 48 hours. YTX binds to PDE4A in the AKAP 149-PKA-PDE4A complex in the outer mitochondrial membrane. Black arrows: In the first 24 hours, the complex migrates from the mitochondria to the plasma membrane, CD71 internalization is avoided by PKA in the plasma membrane and LC3B expression is increased in the cytosol. PKA phosphorylates LC3B protein and the inactive form of LC3B binds to DR through Cav-1 to trigger extrinsic apoptosis. Dotted arrows: After 48 hours of toxin incubation, the complex migrates from the plasma membrane to the nuclear envelope and CREB is phosphorylated by the catalytic subunit of PKA. CD71 internalization remains avoided and as a consequence of prolonged iron deprivation, phospho-mTOR decreased and LC3B increased leading to autophagy activation. White arrows: results of this paper. Grey arrows: info of other papers. (?) The transcription factor phospho-CREB could activate the synthesis of genes involved in autophagy. R and C are subunits of PKA. CD71: Transferrin receptor CD71. DR: Death Receptor. Cav-1: Caveolin-1.



## Figures

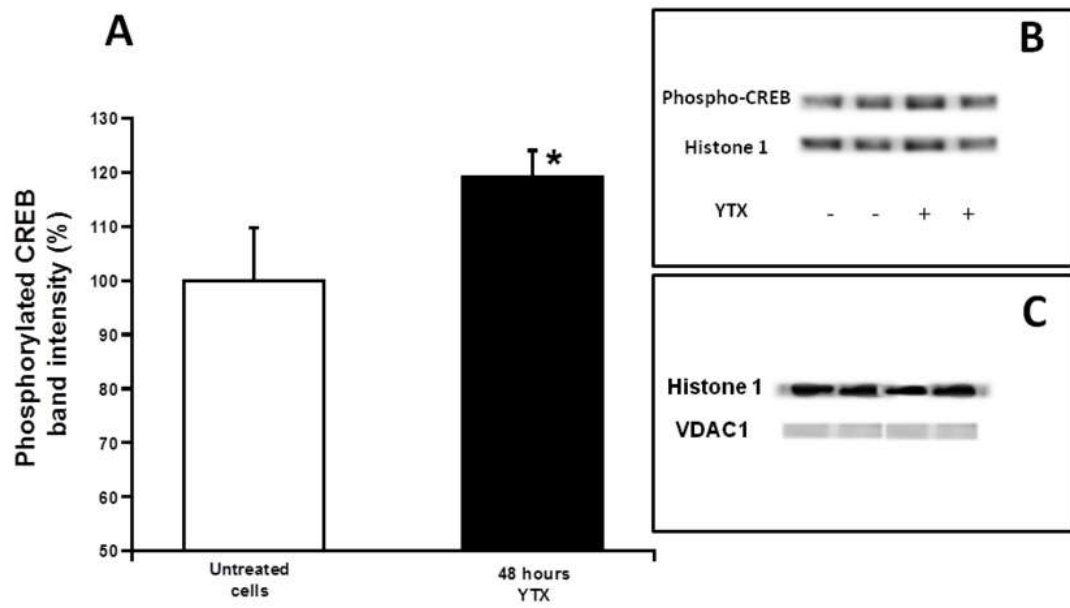


Figura 1



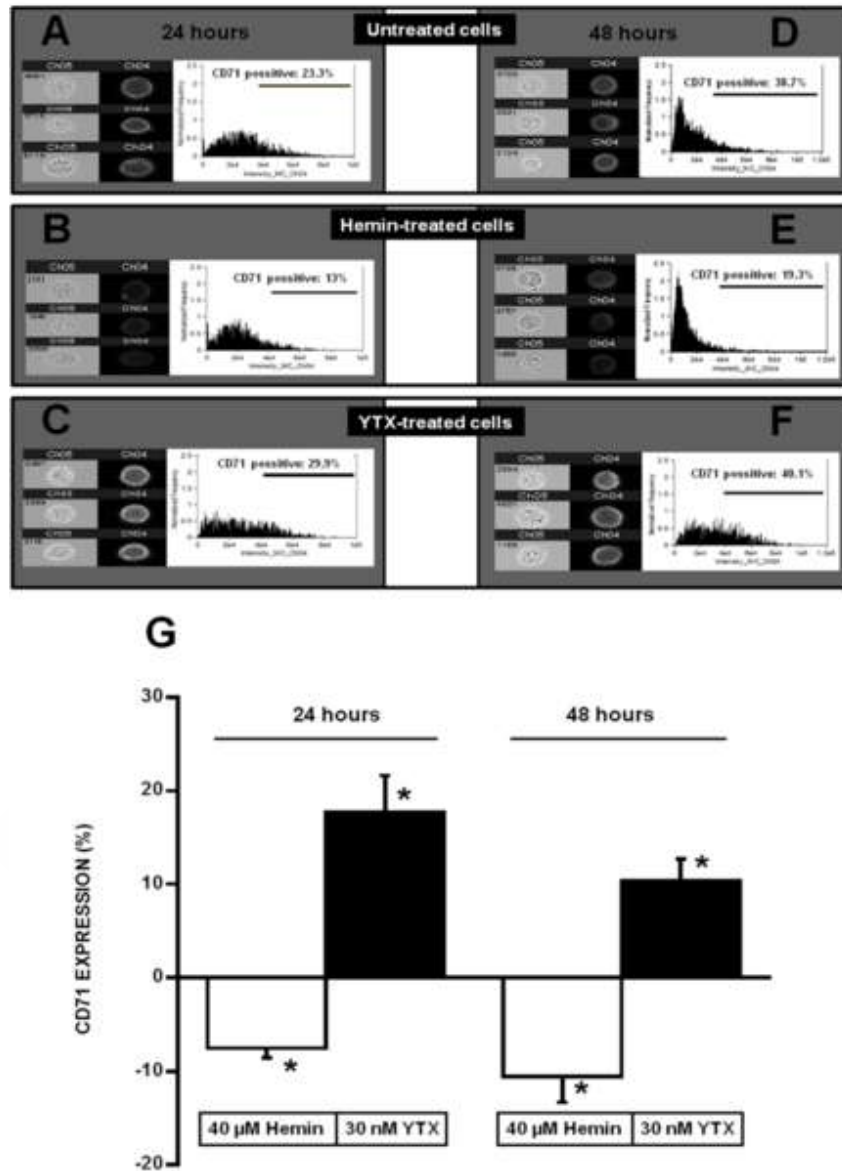


Figura 2

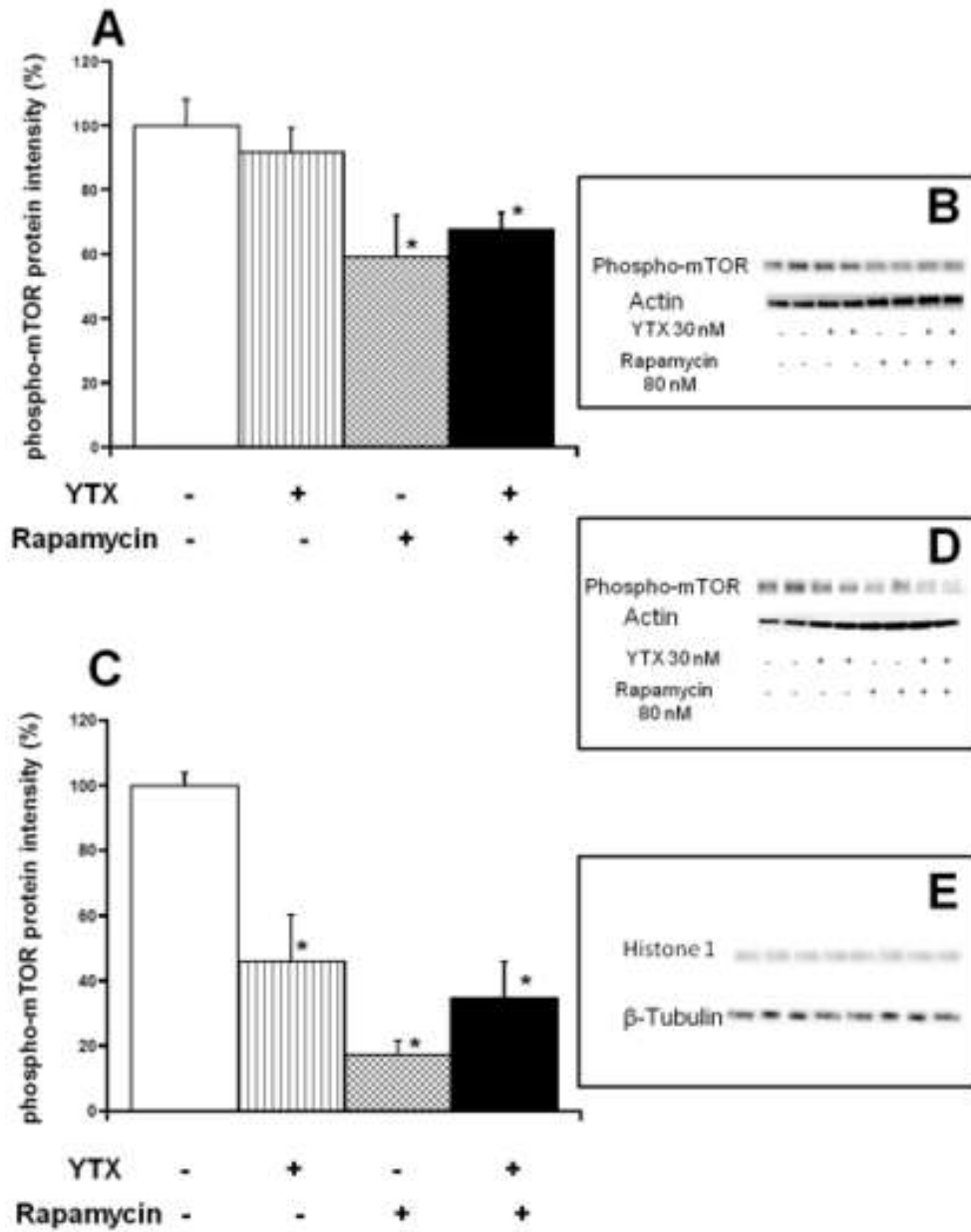


Figura 3

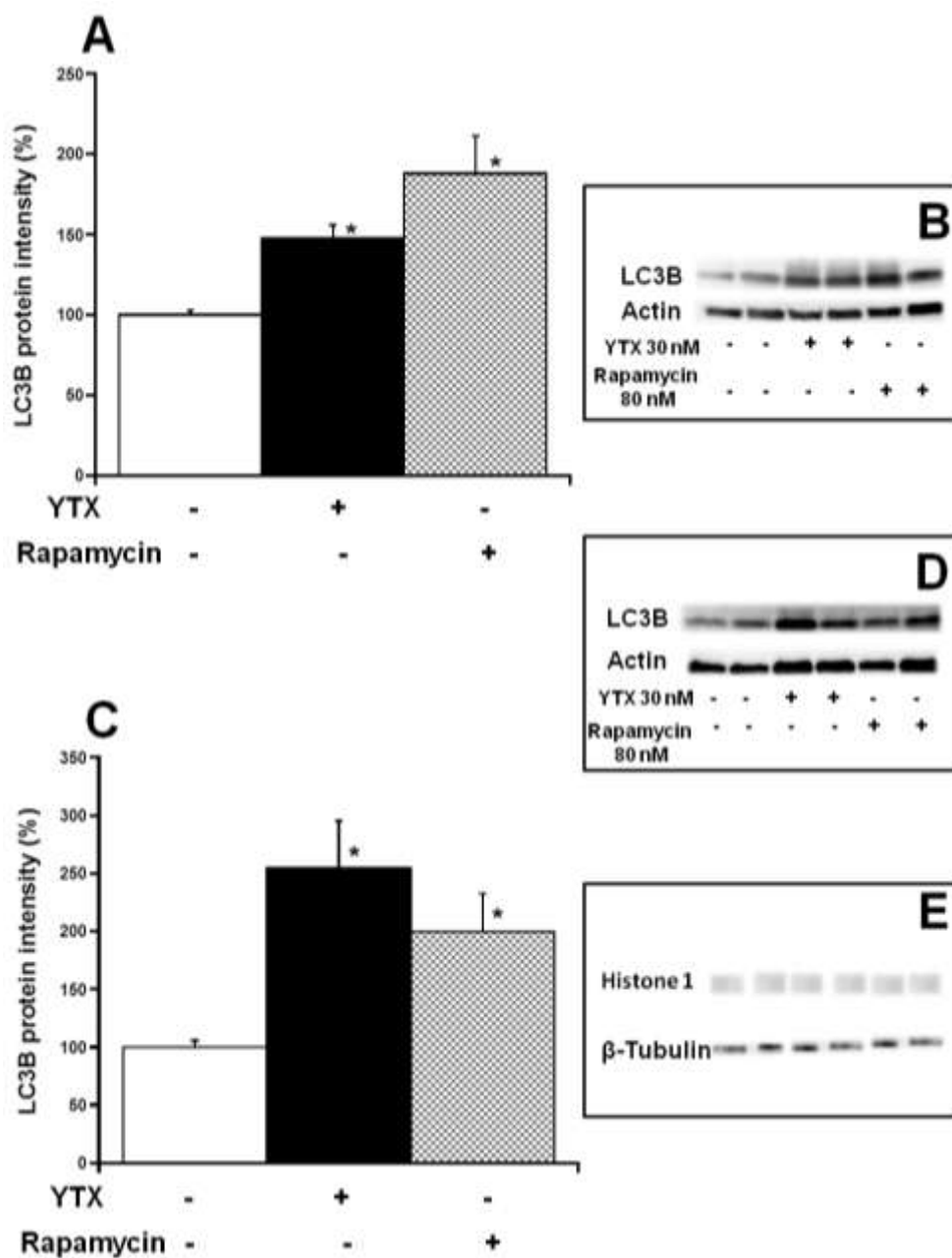


Figura 4

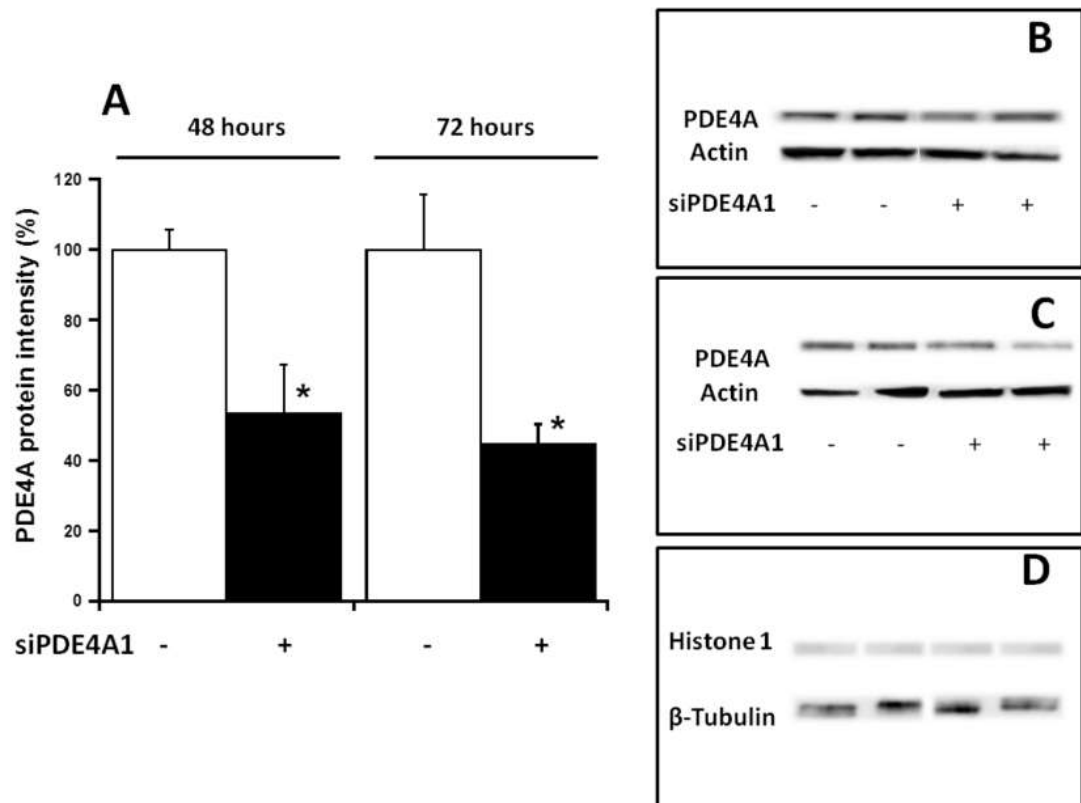


Figura 5



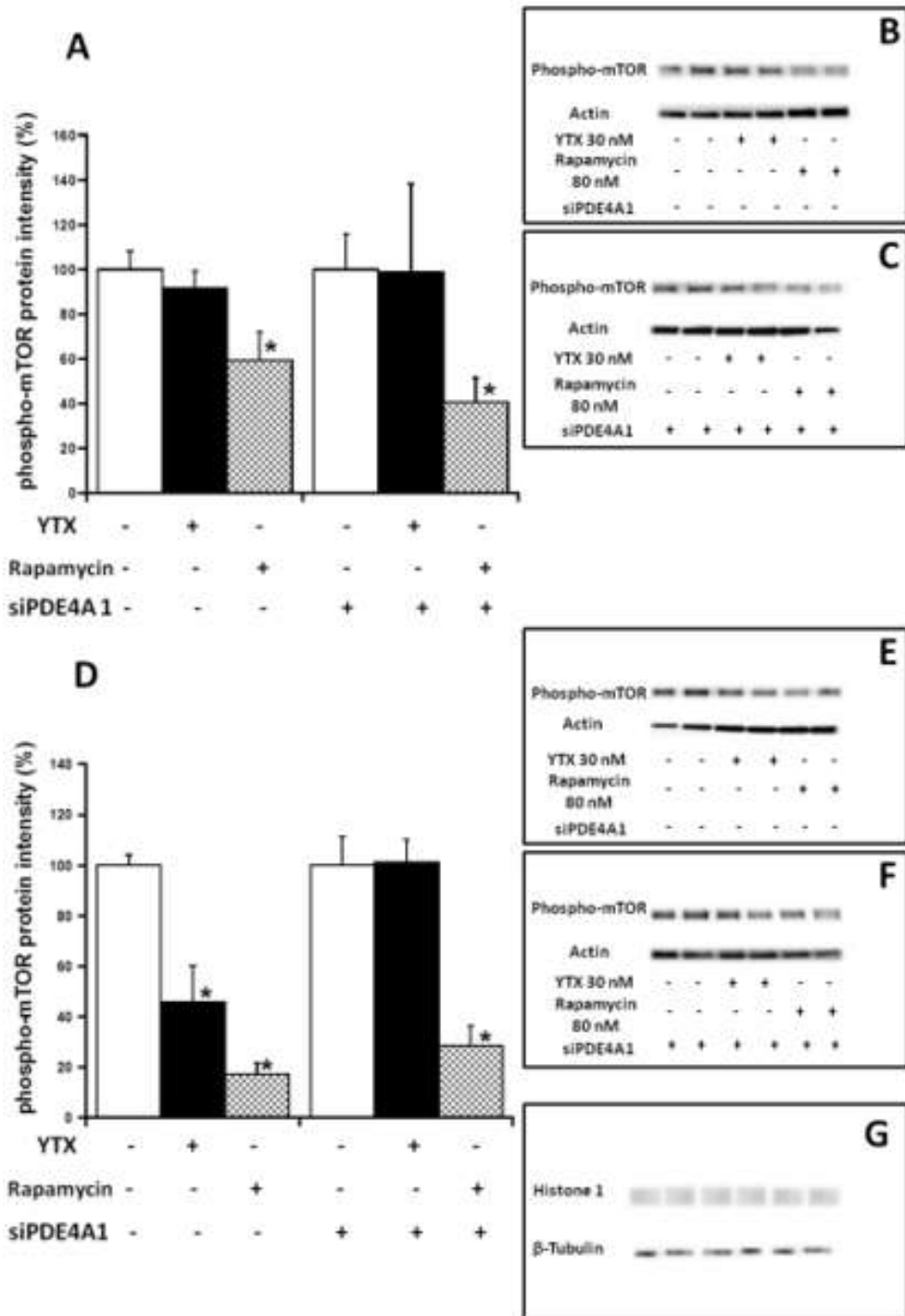


Figura 6

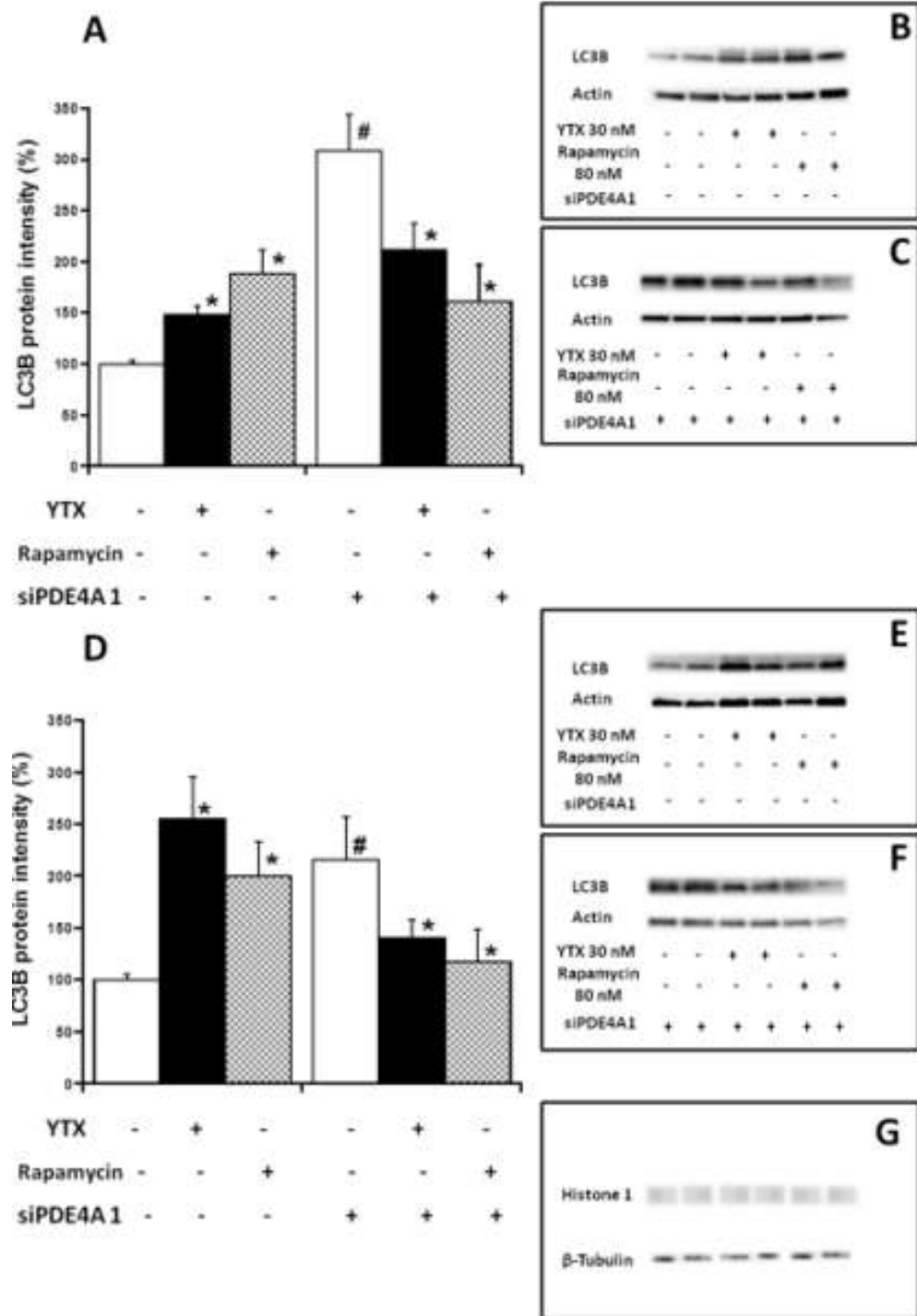


Figura 7

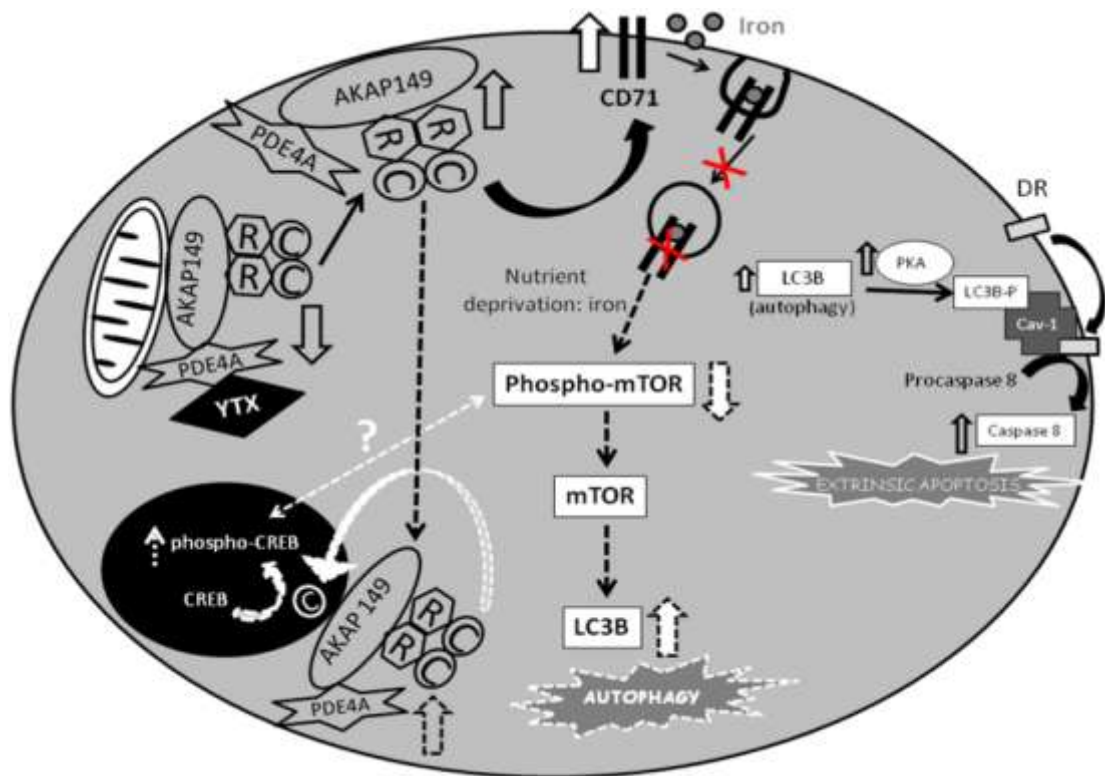


Figura 8



### **I.3 Las rutas de muerte celular activadas por la yesotoxina son independientes de la proteína kinasa C en la línea celular K-562**

#### Resumen

El grupo de las PKCs son enzimas involucradas en eventos de supervivencia o muerte según el modelo celular. La YTX modula la expresión de estas proteínas además de activar diferentes rutas de muerte celular. Esta toxina induce apoptosis y autofagia tras 24 y 48 horas de incubación, respectivamente, en la línea celular K-562. Además, la toxina lleva a cabo su acción a través de la PDE4A1. Por lo tanto, se estudiaron los niveles de dos subtipos de PKC, la clásicas (cPKCs) y dentro de las PKCs nuevas, la PKC $\delta$ , tras el tratamiento con la YTX durante 24 y 48 horas. Además se comprobó la función de estas proteínas en las rutas de muerte activadas por la YTX, así como la relación de los dos tipos de PKC con la PDE4A1. Se midió la expresión de las cPKCs y de la PKC $\delta$  en el citosol, en la membrana plasmática y en el núcleo, tanto en la línea celular K-562 como cuando estas células tienen la PDE4A1 silenciada. También se estudió la viabilidad con el ensayo lactato deshidrogenasa (LDH) tras el tratamiento con la toxina en células normales, así como en células con las cPKCs, la PKC $\delta$  o la PDE4A1 silenciada. Como resultado, la PKC $\delta$  mostró tener un papel fundamental para la supervivencia de las células K-562, ya que al silenciarla, las células disminuyen su viabilidad. Además, se observó que la YTX modula ambas formas de PKC, aunque los cambios en la expresión de estas proteínas son independientes de la muerte celular que activa la toxina. También se observó que la modulación de ambas PKCs es dependiente de PDE41, ya que el patrón de expresión de las PKCs varía tras la silenciamiento de esta proteína.

## **Yessotoxin activates cell death pathways independent of Protein Kinase C in K-562 human leukemic cell line**

Andrea Fernández-Araujo<sup>†</sup>, Amparo Alfonso<sup>†</sup>, Mercedes R. Vieytes<sup>§</sup>, Luis M. Botana<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup>Dept. Farmacología, Facultad de Veterinaria, 27002 Lugo. Spain

<sup>§</sup> Dept. Fisiología, Facultad de Veterinaria, 27002 Lugo. Spain

\* Correspondence to:

□ Prof. Luis M. Botana

□ Dept. Farmacología, Fac. Veterinaria, 27002 Lugo, Spain

Tfn/Fax: 34 982 822 233. E mail: [Luis.Botana@usc.es](mailto:Luis.Botana@usc.es)



**Abstract**

Protein Kinase C (PKC) is a group of enzymes involved in pro-survival or pro-apoptotic events depending on the cellular model. Moreover, Yessotoxin (YTX) modulates its expression and activates different cell death pathways. In K-562 tumor cell line, YTX induces apoptosis and autophagy after 24 and 48 hours of incubation, respectively, and the toxin carries out its action through the subtype A1 phosphodiesterase 4 (PDE4A1). Therefore, the levels of two subtypes of PKC, conventional (cPKC) and  $\delta$  isotype of novel PKC (PKC $\delta$ ) were studied at these times after YTX incubation. Also their involvement in the cell death activated by the toxin and their relationship with PDE4A1 was checked. The expression of cPKC and PKC $\delta$  in cytosol, plasma membrane and nucleus was studied in normal and PDE4A1-silenced cells. Furthermore, cell viability of normal cells, as well as cPKC-, PKC $\delta$ - and PDE4A1-silenced cells was tested by Lactate Dehydrogenase (LDH) assay. As a result, PKC $\delta$  showed a key role in K-562 cell survive, since without this protein, K-562 cell decreased their viability. Furthermore, modulation of PKCs by YTX treatment was observed, however, the changes in the expression of these proteins are independent of cell death activated by the toxin. In addition, the modulation of PKCs detected is PDE4A1-dependent, since the silencing of this protein change PKC expression pattern.

*Keywords*

cPKC, PKC delta, YTX, PDE4A, viability.

## Introduction

Yessotoxin (YTX) is a group of marine polyether toxins synthesized by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* and *Gonyaulax spinifera* [1]. Its name is related with the isolation of the toxin for the first time from the digestive gland of scallops *Patinopecten yessoensis* [2]. The main target at cellular level of YTX are the phosphodiesterases (PDEs) [3-6]. As a result of the interaction PDEs are activated and a decrease on cAMP levels was reported in human lymphocytes [7, 8]. However opposite results were obtained on cAMP levels after YTX incubation of human leukemic K-562 cell line [9]. While YTX does not induce cell death of blood lymphocytes, different types of programmed cell death were observed in the tumor K-562 cell line. Apoptotic programmed cell death was described after 24 hours of YTX treatment, but after 48 hours an autophagic cell death process took place [9-11].

Several subtypes of Protein Kinase C (PKC) were reported to be involved in the metabolic pathways activated by YTX [12, 13]. The PKC family belongs to the serine/threonine protein kinases group that widely mediates metabolic pathways in cells related to proliferation, apoptosis and differentiation [14]. A total of 10 PKC isoforms were described in mammalian cells, and PKCs are classified in three groups: conventional, novel and atypical PKCs [14-16]. Conventional PKC (cPKC) contains PKC $\alpha$ , the variants PKC $\beta$ I and PKC $\beta$ II, and PKC $\gamma$ . The catalytic domain of these isozymes has a tandem C1 domain with a binding site to diacylglycerol (DAG) and phosphatidylserine (PS), and a C2 domain that binds to Ca<sup>2+</sup>. Therefore cPKCs are Ca<sup>2+</sup>- and DAG-dependent [17, 18]. The second group is the novel PKC (nPKC) with PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  and PKC $\theta$  isotypes. The nPKC group has the same C1 tandem domain than cPKCs, that makes this group sensitive to DAG and PS, but the C2 domain does not bind to Ca<sup>2+</sup>, therefore this group is insensitive to Ca<sup>2+</sup>. The last group is the atypical PKC (aPKC) with PKC $\iota$  and PKC $\zeta$  isotypes. This group has an atypical single copy of C1 domain and no C2 domain is present in its structure. In this sense, aPKC group is only sensitive to PS since no Ca<sup>2+</sup> or DAG binding sites are available [15-18].

In the K-562 cell line, PKCs are involved in megakaryocytic differentiation processes and cellular proliferation decrease after phorbol myristate acetate treatment [19-21]. PKC $\beta$ II has been reported to mediate in K-562 cell proliferation, while

PKC $\alpha$  is required for K-562 megakaryocytic differentiation [22]. On the other hand, PKC $\delta$  has been described in this cell type in the mediation of cell growth arrest after type I interferons  $\alpha$  treatment [23]. Furthermore, PKCs are widely related with apoptotic cell death activation or inhibition and PKC $\delta$  activates apoptosis after its migration to the nucleus or mitochondria [24-26]. Therefore, the aim of this work is to elucidate the role of cPKC and the  $\delta$  isotype of nPKCs in the cell death activated by YTX in K-562 tumor cell line.

## Materials and methods

### *Reagents and solutions*

YTX was obtained from CIFGA Laboratories (Lugo, Spain). Anti- $\beta$ -tubulin I, Bovine serum albumin (BSA), CaCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Trizma hydrochloride, Triton X-100, glycine, trizma base, SDS and Tween<sup>®</sup>20 were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). NaCl, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> and glucose were from Panreac (Barcelona, Spain). Anti-PDE4A was from ABCAM (CA, USA). Anti-Histone 1, anti- $\beta$ -Actin, anti-cPKC, Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane was from Millipore (Temecula, USA). Anti-PKC $\delta$  was from BD Biosciences (Madrid, Spain). Anti-Mouse IgG horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody was purchased from GE Healthcare (Barcelona, Spain). PDE4A1, cPKC and PKC $\delta$  siRNA (human), were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA).

Polyacrylamide gels and molecular weight marker Precision Plus Protein<sup>™</sup> Standards Kaleidoscope<sup>™</sup> were purchased from BioRad<sup>®</sup> (Barcelona, Spain). Protease Inhibitor Complete Tablets and Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets were from Roche (Spain).

Physiological saline solution composition was (in mM): Na<sup>+</sup> 142.3; K<sup>+</sup> 5.94; Ca<sup>2+</sup> 1; Mg<sup>2+</sup> 1.2; Cl<sup>-</sup> 126.2; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 22.85; HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1.2, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1.2; glucose 1 g/L was added to the medium giving an osmotic pressure of 290 $\pm$ 10 mOsm/kg of H<sub>2</sub>O and pH was adjusted to 7.2 with HCl 0.1 N and CO<sub>2</sub>. PBS used to wash the western blotting membranes consisted of NaCl 137 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.14 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 mM; KCl 2.68 mM; pH was adjusted to 7.2 with NaOH.

### *Cell culture*

K-562 cell line was purchased from the National Cancer Institute (NCI's) and maintained in the Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. All these reagents were from Gibco, Invitrogen (Spain). Cells were growing at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Incubations with 30 nM YTX were carried out under these conditions of temperature, humidity and percentage of CO<sub>2</sub>.

### *Subcellular fractionation*

3.10<sup>6</sup> cells per condition were incubated 24 and 48 hours with and without 30 nM YTX and then were centrifuged and washed with saline solution. Cells were resuspended in lysis buffer with the following composition: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1X Complete Protease Inhibitor and 1X Phosphatase Inhibitor Cocktail. The extract was sonicated and centrifuged (9300 g, 10 minutes, 4°C). The supernatant with the cytosolic fraction was transferred to a new tube and stored at -20°C until protein quantification. The pellet was re-suspended in the lysis buffer, vortexed, sonicated and kept 20 minutes on ice, sonicated again and centrifuged, 13400 g, 20 minutes, 4°C. In these conditions, the plasma membrane proteins were separated in the supernatant fraction [12].

Nuclear proteins were obtained by resuspending 10.10<sup>6</sup> cells in lysis buffer A (in mM): HEPES 10, MgCl<sub>2</sub> 1.5, KCl 10, DTT 0.5, 0.05% Triton X-100, 1X Complete Protease Inhibitor and 1X Phosphatase Inhibitor Cocktail, with pH 7.9 and left them 10 minutes on ice. The homogenate was centrifuged (2000 g, 10 minutes, 4°C), resuspended in buffer B (in mM): HEPES 5, MgCl<sub>2</sub> 1.5, EDTA 0.2, DTT 0.5, 0.3 NaCl; with pH 7.9. The samples were sonicated in 4 cycles of 10 seconds, rested 30 minutes on ice, centrifuged (24000 g, 20 minutes, 4°C) and stored the supernatant with the nuclear proteins at -20°C.

### *Western blotting analysis*

Bradford assay and the Direct Detect Spectrometer from Millipore (Germany) were used to know sample protein concentration and BSA was used as protein standard. The different subcellular fractions were blotted to PVDF membrane by reduced SDS-PAGE. To determine the protein size and also to monitor the progress

of electrophoretic runs, Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™ molecular weight marker was used. After blockage with 0.5% BSA the membranes were incubated 10 minutes with anti-cPKC, anti- PKC $\delta$  and anti-PDE4A, then were washed three times with PBS and 0.1% Tween®20 and incubated for 10 minutes with secondary anti-mouse IgG horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody. After three washes, chemiluminescence was visualized with SuperSignal® West Pico (low intensity) or with SuperSignal® West Femto (high intensity) both from Pierce (ThermoScientific, USA) also Clarity Western ECL substrate (medium intensity) was used from BioRad®. The chemiluminiscent signal was detected with the Diversity GeneSnap software and analyzed by the Diversity 4 gel documentation and analysis system. Relative protein expression was calculated in relation to  $\beta$ -actin expression for each experiment in cytosolic fraction and with Histone 1 in nuclear fraction [27]. Experiments were carried out at least three times by duplicate. The subcellular fraction purity was tested by measuring control proteins of each fraction: VDAC1/porin protein is present in the mitochondrial membrane and in plasma membrane. VDAC1 was positive in cytoplasm fraction that includes the mitochondrial portion. Histone 1 was only present in the nuclear fraction. And  $\beta$ -tubulin is located in both cytosol and nuclear fraction [28, 29].

#### *Transfection by lipid-based method (Genlantis)*

GeneSilencer® (T500020) solutions from Genlantis (San Diego, USA) were prepared as described before [30].  $1.2 \times 10^6$  cells were incubated in a total volume of 500  $\mu$ l of RPMI 1640 medium with GeneSilencer® solutions and after 5 hours of transfection 500  $\mu$ l of RPMI 1640 was added and 19 hours later the cells were treated with 30 nM YTX for 24 and 48 hours. YTX treatment of silenced cells for 24 and 48 hours occurs after 48 and 72 hours of silencing. Control siRNA (sc-37007) was used as negative control for evaluating RNAi off-target effects.

#### *Cell viability*

K-562 cells were centrifuged (1500 r.p.m., 5 minutes, 4°C) after treatment. The supernatant was used to measure LDH by using the in vitro Toxicology Assay Kit (TOX7, Sigma) following the commercial protocol. The assays were carried on with a cell number population per condition of  $3 \cdot 10^5$  cells.

### *Statistical analysis*

All the experiments were carried out at least three times by duplicate. Student's *t*-test and ANOVA were used to examine statistical significance, assumed for  $p < 0.05$ . Results were expressed as the means  $\pm$  SEM.

### **Results**

PKCs were described as enzymes with a relevant role in YTX effect [12, 13], and it is well known the modulatory role of PKCs on apoptotic cell death [31]. The PKC $\delta$  subtype is closely related with the activation of apoptosis after its migration to the nucleus or mitochondria [25, 32]. On the other hand, different types of cell death were activated by YTX in K-562 erythroleukemia cell line. Previous work reported that apoptosis was triggered after treatment of K-562 cells with YTX for 24 hours, while at 48 hours autophagy was activated [10, 11]. We therefore studied the expression of different PKC isoforms after YTX treatment for 24 and 48 hours of the K-562 human cell line.

Figure 1 shows the levels of cPKC and PKC $\delta$  in the cytosol after exposure of K-562 cells to YTX for 24 and 48 hours. Regarding the cytosolic cPKC expression (figure 1A), no variations were observed after 24 hours of YTX incubation, while a significant decrease of 45% was detected after a for 48 hours. However, PKC $\delta$  levels were increased to 134% when compared to untreated K-562 cells after 24 hours of incubation with the toxin, while after 48 hours a decrease of 33% was observed (figure 1D). In order to clarify if the changes in the cytosolic levels of PKCs isoforms were a result of protein translocation, plasma membrane and nuclear expression of PKCs was studied. Protein levels in the plasma membrane are shown in figure 2. After 24 and 48 hours of the treatment with the toxin, no significant changes were observed either on cPKC or PKC $\delta$  levels in this localization. However, in the nucleus, different effects were observed (figure 3). No significant effect on nuclear cPKC levels was detected after 24 hours of YTX treatment, while after a 48 hours incubation, nuclear cPKC expression was significantly decreased by 50% (figure 3A). On the other hand, PKC $\delta$  levels in the nucleus, figure 3D, were 29% significantly decreased after 24 hours of YTX treatment, while no effect was observed after 48 hours. Therefore YTX did not change cPKC levels in the first 24 hours of treatment, while after 48 hours of incubation this protein expression was

decreased in the cytosol and nucleus. However, PKC $\delta$  levels were decreased in the nucleus to increase in the cytosol after 24 hours of the exposure to the toxin, and after 48 hours of incubation, its expression was decreased in the cytosol.

In human tumoral K-562 erythroleukemia the key role of phosphodiesterase4 A1 subtype (PDE4A1) in the pathways activated by YTX was demonstrated previously [11]. Therefore, the next step was to study if the changes in PKCs expression were regulated downstream by PDE4A1 after YTX treatment. Therefore, cytosolic cPKC and PKC $\delta$  levels were measured when PDE4A1 expression was silenced. Figure 4 shows PDE4A1-silencing efficiency after 48 and 72 hours following previous protocols [11]. In this regard, PDE4A expression was significantly decreased by 59% and 54% after 48 and 72 hours of silencing, respectively. Then, cPKC and PKC $\delta$  levels were checked in a PDE4A1-silenced population after incubation with YTX. Figure 5 shows cytosolic cPKC expression after exposure to YTX for 24 and 48 hours (figure 5A and 5C, respectively) in normal and PDE4A1-silenced K-562 cells. Cytosolic cPKC levels after incubation with YTX for 24 hours were not modified in the control, while PDE4A1-silenced cells show a decrease in cPKC expression of 31% (figure 5A). However, 24 hours later, the PDE4A1-silenced control population underwent a 60% cPKC decrease, and a 26% increase after exposure to YTX (figure 5C).

Figure 6 shows PKC $\delta$  expression in PDE4A1-silenced cells after 24 (figure 6A) and 48 hours (figure 6C) of exposure to YTX. Cell silencing to PDE4A1 causes an increase of PKC $\delta$  levels by 38% in the first 24 hours, while in the presence of YTX the effect on the expression is a 58% decrease (figure 6A). Surprisingly, an opposite behaviour of cytosolic PKC $\delta$  was observed in normal and silenced cells after incubation with the toxin when apoptosis is activated. However, after 48 hours of exposure to YTX, PKC $\delta$  decreased by 28% in PDE4A1-silenced cells, showing the same pattern as control cells (figure 6C). The movement of PKC $\delta$  from the nucleus to the cytoplasm observed in figures 1D and 3D, could be linked to the apoptotic cell death activated by YTX [11, 32]. The decrease on cPKC and PKC $\delta$  levels after 48 hours (figures 1 and 3) could be due to autophagic cell death activation in K-562 cells [10].

Considering these results, we studied the relevance of PKCs in the activation of cell death routes by YTX, and the viability of K-562 cells after incubation with YTX

in cPKC- and PKC $\delta$ -silenced cells. First cPKC and PKC $\delta$ -silencing efficiency was checked by western blotting after 48 and 72 hours of silencing (figure 7). cPKC was 31% and 35% significantly decreased after 48 and 72 hours of transfection, respectively. PKC $\delta$  expression was reduced by 28% and 25% after 48 and 72 hours of transfection, respectively. Then, cPKC-, PKC $\delta$ - and PDE4A1-silencing viability was also studied (figure 8). No effect of silencing was observed on cell viability, except in the case of PKC $\delta$ -silenced cells for 72 hours, that causes a 39% decrease of viability. Therefore, YTX treatment was performed according to these silencing efficiency values. Figure 9 shows cell viability results in untreated and YTX-treated cells in normal and cPKC-, PKC $\delta$ - or PDE4A1-silenced cells by LDH assay. In the first 24 hours of exposure to YTX, the viability was decreased by 12%, 21% and 12%, in normal, cPKC and PKC $\delta$ -silenced cells, respectively. However, no effect was observed after YTX incubation in the PDE4A1-silenced population. On the other hand, after 48 hours of YTX treatment, the viability decreased 79% in control cells, 80% in cPKC-silenced population and 66% in PKC $\delta$ -silenced cells. Remarkably, PDE4A1-silencing ablated the viability reduction induced by YTX.

Therefore our results suggest that PKC expression and localization are modulated by YTX and show a tight link with the PKCs subtypes studied and PDE4A1. However these changes in PKC levels were not related to the cell death pathways activated by YTX, since cell death was not avoided when PKCs were inhibited.

### Discussion

Previous studies have evidenced apoptotic activation after exposure to YTX for 24 hours, and autophagy being triggered after 48 hours with the toxin in K-562 human tumor cells [10, 11]. With these premises, we studied the role of cPKC and PKC $\delta$  in YTX activated pathways, since these proteins were recently associated to the elusive mechanism of action of the toxin [12, 13]. Furthermore, PKCs are pro-surviving or pro-apoptotic agents with different effects depending on the cell type [31, 33, 34]. After 24 hours of treatment with the toxin, cPKC does not modify its levels in the different localizations of the cell, so YTX seems to have no effect in this protein when apoptosis is activated [11]. However, a close relationship between cPKC and PDE4A1 was observed. While no response to YTX exposure was detected after PDE4A1-silencing, YTX induces cPKC decrease suggesting the activation of

an alternative non-death cell pathway independent of PDE4A1, since after silencing this protein, no cell death is detected. On the other hand, PKC $\delta$  changes its localization from the nucleus to the cytosol in the first 24 hours of YTX exposure. Typically, the activation of PKC $\delta$  implies its translocation from the cytosol to the nucleus and then it is cleaved and activated by caspase 3 to trigger apoptosis [25, 35, 36]. However, other localizations of PKC $\delta$  in the cytosol, such as the mitochondria, are also related with apoptotic activation [37, 38]. Our previous data, pointed to mitochondria as the main target to YTX in K-562 cell line through the mitochondrial complex AKAP149-PKA-PDE4A [9, 11]. Therefore, PKC $\delta$  migration to the mitochondria is linked to cytochrome c release to the cytosol and activation of intrinsic apoptosis [32, 37].

The increment of PKC $\delta$  in the cytosolic fraction, could be leading to the activation of this programmed cell death type after 24 hours of YTX incubation. Furthermore, PDE4A1-silencing induces the increment of PKC $\delta$  expression to return it to basal levels after YTX incubation. Therefore, after exposure to YTX or PDE4A1-silencing, PKC $\delta$  expression is increased, although both treatments together, return PKC $\delta$  to basal levels. The same effect was observed in LC3B expression of K-562 cells after 48 hours of exposure to the toxin in PDE4A1-silenced population [10]. However, after 24 hours of treatment with the toxin of PKC $\delta$ -silenced population, no interaction was observed between PKC $\delta$  and decrease in cell viability due to the toxin effect. Therefore, PKC $\delta$  translocation from the nucleus to the cytosol is not mediating in YTX mechanism of action. Furthermore, the active form of caspase 3 is increased after 24 hours of YTX incubation [11]. PKC $\delta$  is cleaved by this type of caspase and the activated short form of PKC $\delta$  can phosphorylate and induce the activation of caspase 3 [36]. The levels of PKC $\delta$  after 24 hours of toxin treatment are increased at the same time of caspase 3 activation. Therefore we are not detecting PKC $\delta$  cleavage by caspase 3, or perhaps the activation of the caspase is not enough to cleave the protein.

On the other hand, 48 hours after YTX treatment, when autophagic cell death is activated [10], both PKC types, conventional and  $\delta$  subtype, are decreased in the cytosol. The PKC implication in autophagy, as for apoptosis, is also dependent on cell type [39]. In this regard, it was described the contribution of PKC to autophagy either as inductor or inhibitor [39, 40]. Moreover, in K-562 cell line,  $\alpha$  and  $\beta$  cPKCs subtypes are necessary to induce autophagy cell death after acadesine exposure [41],

and on the other hand PKC activation attenuates the autophagy in HEK293 cells [42]. Our results show a decrease in both cytosolic cPKC and PKC $\delta$  expression and that cPKC levels in nucleus are also decreased at this time. cPKC is closely related to PDE4A1, since after 48 hours of exposure to the toxin, control PDE4A1-silenced population shows very low levels of cPKC, and surprisingly YTX increases its expression but it does not reach basal levels. Since PDE4A1 was decreased in the cytosol after YTX treatment [11], the fall of this protein by YTX induction or by PDE4A1-silencing is enough to decrease the cPKC levels. These results suggest that cytosolic cPKC decrement after 48 hours of exposure to the toxin, does not imply cell death, since the same cPKC expression in cytosol was obtained in PDE4A1-silenced cells with or without YTX treatment, and in these conditions no cell death was observed [11].

Few data are available about PDEs crosstalks with PKCs. However, it was reported that the activation of cPKC from the cytosol to the plasma membrane coexists with an increase of PDE4A in cytosol [12]. Opposite to this, the decrease of PDE4A expression in the cytosol, as it was described in K-562 cell after YTX incubation [11], could avoid cPKC activation and translocation to the plasma membrane. However PKC $\delta$  expression is decreased only in the cytosol fraction after 48 hours of exposure to YTX, and this effect is independent on PDE4A1. PKC $\delta$  levels decrement observed after YTX incubation for 48 hours does not imply cell death, since the same reduction is observed in a PDE4A1-silenced population and no cell death was detected [11]. Furthermore, after 72 hours of PKC $\delta$  silencing a large percentage of cell death is observed. It has been suggested the key role of PKC $\delta$  in the metabolism of the human K-562 tumor cell line, since this protein is related with pro-surviving routes [43]. This PKC subtype is not studied in the K-562 cell line, so further results must be done since it seems to be a crucial protein in this lineage. In this regard, the PKC $\delta$  translocation to the nucleus accompanied by the cytosolic activation of Nuclear Factor-kappa B and its migration also to the nucleus, protecting K-562 cells against ionizing radiation [44]. But PKC $\delta$  implication in pro-survival or pro-apoptotic pathways is still unclear [33, 45]. Finally, either cPKC or PKC $\delta$ -silenced populations do not change cell viability decrement induced by YTX after 48 hours. These results suggest, similarly than in the first 24 hours of incubation, that the effect of YTX on cell death is independent of the role of these types of PKC.

In summary, either cPKC or PKC $\delta$  are not related with cell death pathways activated by YTX, but they are regulated downstream by PDE4A1, a crucial protein of the mechanism of action of YTX. This toxin shows different effects on cell death or survival depending on the cellular model. Furthermore, PKCs involvement on cell death activation or inhibition is also specific on cellular model. Therefore, the obtained results can be specific of our lineage. In this sense, YTX produces its action through the PDE4A1 protein, followed by the activation of pathway cascades linked with cell death activation. However, the modulation of PKCs independently of cell death suggests the activation of non-cell death pathways activated by the toxin. Figure 10 shows the modulation of both subtypes of PKC in control and PDE4A1-silenced cells. Moreover, the role of PKC $\delta$  in K-562 cell line must be further studied, since our results demonstrate its importance in K-562 viability.

### **Acknowledgements**

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofunded-grants. From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía y Competitividad, AGL2009-13581-C02-01, AGL2012-40185-CO2-01 and Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, GRC2013-016, and through Axencia Galega de Innovación, Spain, ITC-20133020 SINTOX. From CDTI under ISIP Programme, Spain, IDI-20130304 APTAFOOD.

From the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA – Research Executive Agency (FP7/2007-2013) under grant agreement Nos. 265409  $\mu$ AQUA, 315285 CIGUATOOLS and 312184 PHARMASEA. Andrea Fernández Araujo is supported by a fellowship from Subprograma de Formación de Personal Investigador (AGL2009-13581-C02-01), Spain.

## References

1. Satake M, MacKenzie L, Yasumoto T: **Identification of Protoceratium reticulatum as the biogenetic origin of yessotoxin.** *Nat Toxins* 1997, **5(4)**:164-167.
2. Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T: **Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning.** *Tetrahedron Letters* 1987, **28(47)**:5869-5872.
3. Pazos MJ, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Kinetic Analysis of the Interaction between Yessotoxin and Analogues and Immobilized Phosphodiesterases Using a Resonant Mirror Optical Biosensor.** *Chemical Research in Toxicology* 2005, **18(7)**:1155-1160.
4. Alfonso C, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Quantification of yessotoxin using the fluorescence polarization technique and study of the adequate extraction procedure.** *Analytical Biochemistry* 2005, **344(2)**:266-274.
5. Pazos MJ, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Vieites JM, Botana LM: **Resonant mirror biosensor detection method based on yessotoxin–phosphodiesterase interactions.** *Analytical Biochemistry* 2004, **335(1)**:112-118.
6. Pazos MJ, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Study of the Interaction between Different Phosphodiesterases and Yessotoxin Using a Resonant Mirror Biosensor.** *Chemical Research in Toxicology* 2006, **19(6)**:794-800.
7. Alfonso A, de la Rosa L, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity: Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes.** *Biochemical Pharmacology* 2003, **65(2)**:193-208.
8. Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **A rapid microplate fluorescence method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases.** *Analytical Biochemistry* 2004, **326(1)**:93-99.
9. Tobío A, Fernández-Araujo A, Alfonso A, Botana LM: **Role of yessotoxin in calcium and cAMP-crosstalks in primary and K-562 human lymphocytes: The effect is mediated by Anchor kinase a mitochondrial proteins.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2012, **113(12)**:3752-3761.
10. Fernandez-Araujo A, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM: **Key role of phosphodiesterase 4A1 (PDE4A1) in autophagy regulation.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2014, **Submitted**.
11. Fernandez-Araujo A, Tobio A, Alfonso A, Botana LM: **Role of AKAP 149-PKA-PDE4A complex in cell survival and cell differentiation processes.** *Int J Biochem Cell Biol* 2014, **53C**:89-101.

12. Alonso E, Vale C, Vieytes MR, Botana LM: **Translocation of PKC by Yessotoxin in an in Vitro Model of Alzheimer's Disease with Improvement of Tau and  $\beta$ -Amyloid Pathology.** *ACS Chemical Neuroscience* 2013, **4**(7):1062-1070.
13. López AM, Rodríguez JJG, Mirón AS, Camacho FG, Grima EM: **Immunoregulatory potential of marine algal toxins yessotoxin and okadaic acid in mouse T lymphocyte cell line EL-4.** *Toxicology Letters* 2011, **207**(2):167-172.
14. Gutcher I, Webb PR, Anderson NG: **The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C.** *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**(6):1061-1070.
15. Newton AC: **Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm.** *Biochem J* 2003, **370**:361-371.
16. Newton AC: **Protein kinase C: poised to signal.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010, **298**(3):E395-402.
17. Mellor H, Parker PJ: **The extended protein kinase C superfamily.** *Biochem J* 1998, **332** ( Pt 2):281-292.
18. Newton AC: **Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions.** *Chem Rev* 2001, **101**(8):2353-2364.
19. Hocevar BA, Morrow DM, Tykocinski ML, Fields AP: **Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia cell proliferation and differentiation.** *J Cell Sci* 1992, **101** ( Pt 3):671-679.
20. Koeffler HP, Bar-Eli M, Territo MC: **Phorbol Ester Effect on Differentiation of Human Myeloid Leukemia Cell Lines Blocked at Different Stages of Maturation.** *Cancer Research* 1981, **41**(3):919-926.
21. Ojima Y, Duncan MT, Nurhayati RW, Taya M, Miller WM: **Synergistic effect of hydrogen peroxide on polyploidization during the megakaryocytic differentiation of K562 leukemia cells by PMA.** *Exp Cell Res* 2013, **319**(14):2205-2215.
22. Murray NR, Baumgardner GP, Burns DJ, Fields AP: **Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation.** *J Biol Chem* 1993, **268**(21):15847-15853.
23. Kaur S, Parmar S, Smith J, Katsoulidis E, Li Y, Sassano A, Majchrzak B, Uddin S, Tallman MS, Fish EN *et al*: **Role of protein kinase C-delta (PKC-delta) in the generation of the effects of IFN-alpha in chronic myelogenous leukemia cells.** *Exp Hematol* 2005, **33**(5):550-557.
24. Tanaka Y, Gavrielides MV, Mitsuuchi Y, Fujii T, Kazanietz MG: **Protein Kinase C Promotes Apoptosis in LNCaP Prostate Cancer Cells through Activation of p38**

- MAPK and Inhibition of the Akt Survival Pathway.** *Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**(36):33753-33762.
25. Cross T, Griffiths G, Deacon E, Sallis R, Gough M, Watters D, Lord JM: **PKC-d is an apoptotic lamin kinase.** *Oncogene* 2000, **19** 2331-2337.
26. Murriel CL, Mochly-Rosen D: **Opposing roles of  $\delta$  and  $\epsilon$ PKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003, **420**(2):246-254.
27. Tobío A, Alfonso A, Botana LM: **C-kit mutations and PKC crosstalks: PKC translocates to nucleus only in cells HMC560,816.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2011, **112**(9):2637-2651.
28. Lawen A, Ly JD, Lane DJR, Zarschler K, Messina A, Pinto VD: **Voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1)—a mitochondrial protein, rediscovered as a novel enzyme in the plasma membrane.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005, **37**(2):277-282.
29. Walss C, Kreisberg JI, Luduena RF: **Presence of the betaII isotype of tubulin in the nuclei of cultured mesangial cells from rat kidney.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1999, **42**(4):274-284.
30. Tobío A, Alfonso A, Fernández-Araujo A, Alonso E, Botana LM: **Protein kinase C modulates Aurora-kinase inhibition induced by CCT129202 in HMC-1<sup>560, 816</sup> cell line.** *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2013, **12**(3):265-276.
31. Horbinski C, Chu CT: **Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death.** *Free Radic Biol Med* 2005, **38**(1):2-11.
32. Majumder PK, Pandey P, Sun X, Cheng K, Datta R, Saxena S, Kharbanda S, Kufe D: **Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome C release and apoptosis.** *Journal of Biological Chemistry* 2000.
33. Brodie C, Blumberg PM: **Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta.** *Apoptosis* 2003, **8**(1):19-27.
34. Couldwell WT, Hinton DR, He S, Chen TC, Sebat I, Weiss MH, Law RE: **Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines.** *FEBS Lett* 1994, **345**(1):43-46.
35. Scheel-Toellner D, Pilling D, Akbar AN, Hardie D, Lombardi G, Salmon M, Lord JM: **Inhibition of T cell apoptosis by IFN- $\beta$  rapidly reverses nuclear translocation of protein kinase C- $\delta$ .** *European Journal of Immunology* 1999, **29**(8):2603-2612.
36. Hampson P, Chahal H, Khanim F, Hayden R, Mulder A, Assi LK, Bunce CM, Lord JM: **PEP005, a selective small-molecule activator of protein kinase C, has potent antileukemic activity mediated via the delta isoform of PKC.** *Blood* 2005, **106**(4):1362-1368.

37. Sumitomo M, Ohba M, Asakuma J, Asano T, Kuroki T, Hayakawa M: **Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells.** *J Clin Invest* 2002, **109**(6):827-836.
38. Li L, Lorenzo PS, Bogi K, Blumberg PM, Yuspa SH: **Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(12):8547-8558.
39. Bosco R, Melloni E, Celeghini C, Rimondi E, Vaccarezza M, Zauli G: **Fine tuning of protein kinase C (PKC) isoforms in cancer: shortening the distance from the laboratory to the bedside.** *Mini Rev Med Chem* 2011, **11**(3):185-199.
40. Huang C, Liu W, Perry CN, Yitzhaki S, Lee Y, Yuan H, Tsukada YT, Hamacher-Brady A, Mentzer RM, Jr., Gottlieb RA: **Autophagy and protein kinase C are required for cardioprotection by sulfaphenazole.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010, **298**(2):H570-579.
41. Robert G, Ben Sahra I, Puissant A, Colosetti P, Belhacene N, Gounon P, Hofman P, Bost F, Cassuto JP, Auberger P: **Acadesine Kills Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Cells through PKC-Dependent Induction of Autophagic Cell Death.** *PLoS ONE* 2009, **4**(11):e7889.
42. Jiang H, Cheng D, Liu W, Peng J, Feng J: **Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **395**(4):471-476.
43. Diaz Bessone MI, Berardi DE, Campodonico PB, Todaro LB, Lothstein L, Bal de Kier Joffe ED, Urtreger AJ: **Involvement of PKC delta (PKCdelta) in the resistance against different doxorubicin analogs.** *Breast Cancer Res Treat* 2011, **126**(3):577-587.
44. Cataldi A, Rapino M, Centurione L, Sabatini N, Grifone G, Garaci F, Rana R: **NF-kappaB activation plays an antiapoptotic role in human leukemic K562 cells exposed to ionizing radiation.** *J Cell Biochem* 2003, **89**(5):956-963.
45. Jackson DN, Foster DA: **The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation and survival.** *FASEB J* 2004, **18**(6):627-636.

### Figure legends

**Figure 1: Effect of YTX on cytosolic cPKC and PKC $\delta$  expression in K-562 cell line.** Cells were incubated for 24 and 48 hours with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A) and (D):** Percentage of cytosolic cPKC and PKC $\delta$  levels, respectively, after 24 and 48 hours of treatment. Mean  $\pm$  SEM of three experiments. Cytosolic cPKC and PKC $\delta$  values were calculated respect to  $\beta$ -actin band intensity.  $3.10^6$  cells per condition were lysed and 20  $\mu$ g of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells. **(B) and (C):** Representative experiments of western blot band intensity of cytosolic cPKC in K-562 cells after 24 and 48 hours of treatment, respectively. **(E) and (F):** Representative experiment of western blot band intensity of cytosolic PKC $\delta$  in K-562 cells after 24 and 48 hours of treatment, respectively. **(G):** Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 2: Effect of YTX on cPKC and PKC $\delta$  expression in plasma membrane of K-562 cell line.** Cells were incubated for 24 and 48 hours with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A) and (D):** Percentage of cPKC and PKC $\delta$  levels in plasma membrane, respectively, after 24 and 48 hours of treatment. Mean  $\pm$  SEM of three experiments. Plasma membrane cPKC and PKC $\delta$  values were calculated respect to  $\beta$ -actin band intensity.  $3.10^6$  cells per condition were lysed and 15  $\mu$ g of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. **(B) and (C):** Representative experiments of western blot band intensity of cPKC in plasma membrane of K-562 cells after 24 and 48 hours of treatment, respectively. **(E) and (F):** Representative experiment of western blot band intensity of PKC $\delta$  in plasma membrane of K-562 cells after 24 and 48 hours of treatment, respectively. **(G):** Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 3: Effect of YTX on nuclear cPKC and PKC $\delta$  expression in K-562 cell line.** Cells were incubated for 24 and 48 hours with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A) and (D):** Percentage of nuclear cPKC and PKC $\delta$  levels, respectively, after 24 and 48 hours of treatment. Mean  $\pm$  SEM of three experiments. Nuclear cPKC and PKC $\delta$  values were calculated respect to Histone 1 band intensity.  $10.10^6$  cells per condition were lysed and 20  $\mu$ g of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells. **(B) and (C):** Representative experiments of western blot band intensity of nuclear cPKC in K-562 cells after 24 and 48 hours of treatment, respectively. **(E) and (F):** Representative experiment of western blot band intensity of nuclear PKC $\delta$  in K-562 cells after 24 and 48 hours of treatment, respectively. **(G):** Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 4: PDE4A1 silencing efficiency by western blotting analysis in K-562 cell line.** (A): Percentage of cytosolic PDE4A levels in K-562 cell line after 48 and 72 hours of PDE4A1 siRNA transfection, respectively (37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic PDE4A values were calculated respect to β-actin band intensity. 4.10<sup>6</sup> cells per condition were silenced and 20 μg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untransfected and siPDE4A1 transfected K-562 cell line. (B) and (C): Representative experiment after 48 and 72 hours of PDE4A1-silenced K-562 cell line, respectively. (D): Representative proteins as positive and negative controls of the cytosolic fraction purity.

**Figure 5: Effect of YTX on cytosolic cPKC expression in untransfected and PDE4A1-silenced K-562 cell line.** Cells were first incubated with the PDE4A1 siRNA for 24 hours and then for 24 and 48 hours plus with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). (A) and (C): Percentage of cytosolic cPKC levels in untransfected and PDE4A1-silenced K-562 cell line after 24 and 48 hours of treatment with YTX, respectively. Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic cPKC values were calculated respect to β-actin band intensity. 2.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 μg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells. (#) Significant differences between sicPKC transfected and untransfected control K-562 cell line. (B) and (D): Representative experiment of western blot band intensity of cytosolic cPKC in untransfected and PDE4A1-silenced cells after 24 and 48 hours of treatment. (E): Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 6: Effect of YTX on cytosolic PKCδ expression in untransfected and PDE4A1-silenced K-562 cell line.** Cells were first incubated with the PDE4A1 siRNA for 24 hours and then for 24 and 48 hours plus with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). (A) and (C): Percentage of cytosolic PKCδ levels in untransfected and PDE4A1-silenced K-562 cell line after 24 and 48 hours of treatment with YTX, respectively. Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic PKCδ values were calculated respect to β-actin band intensity. 2.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 μg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells. (#) Significant differences between siPKCδ transfected and untransfected control K-562 cell line (B) and (D): Representative experiment of western blot band intensity of cytosolic PKCδ in untransfected and PDE4A1-silenced cells after 24 and 48 hours of treatment. (E): Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 7: cPKC and PKC $\delta$  silencing efficiency by western blotting analysis in K-562 cell line.** (A): Percentage of cytosolic cPKC and PKC $\delta$  levels in K-562 cell line after 48 and 72 hours of cPKC and PKC $\delta$  siRNA transfection (37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Mean  $\pm$  SEM of three experiments. Cytosolic cPKC and PKC $\delta$  values were calculated respect to  $\beta$ -actin band intensity.  $2 \cdot 10^6$  cells per condition were treated and 20  $\mu$ g of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untransfected and sicPKC or siPKC $\delta$  transfected K-562 cell line. (B) and (C): Representative experiment after 48 and 72 hours of transfection of cPKC and PKC $\delta$ -silenced K-562 cell line after, respectively. (D): Representative proteins as positive and negative controls of the cytosolic fraction purity.

**Figure 8: K-562 cell viability after cPKC, PKC $\delta$  and PDE4A1 silencing.** Percentage of K-562 cell line viability after cPKC, PKC $\delta$  and PDE4A1-silencing for 48 and 72 hours. Mean  $\pm$  SEM of three experiments. 300000 cells per condition were used to measure cell viability by LDH assay. (\*) Significant differences between untransfected and sicPKC, siPKC $\delta$  or siPDE4A1 transfected K-562 cell line.

**Figure 9: Effect of YTX on cell viability in cPKC, PKC $\delta$  and PDE4A1-silenced K-562 cell lines.** Cells were incubated with cPKC, PKC $\delta$  and PDE4A1 siRNA for 24 hours, and then for 24 and 48 hours plus with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Percentage of cPKC, PKC $\delta$  and PDE4A1-silenced K-562 cell line viability after YTX treatment for 24 and 48 hours. Mean  $\pm$  SEM of three experiments. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells in each case.

**Figure 10: cPKC and PKC $\delta$  modulation by YTX in control and PDE4A1-silenced K-562 cell line.** Schematic representation of modulation of cPKC and PKC $\delta$  levels after the incubation with YTX for 24 and 48 hours (black and grey letters, respectively). Up, PKC levels are represented in control cells after 24 hours and 48 hours of YTX incubation. In the first 24 hours cPKC does not change its levels in any localization of the cell, while PKC $\delta$  moves from the nucleus to the cytosol. After 48 hours both cPKC and PKC $\delta$  are decreased in the cytosol. Down, PKC levels are represented in PDE4A1-silenced cells. First the cells are incubated with the PDE4A1 siRNA for 24 hours and then for 24 and 48 hours plus with YTX. PDE4A1-silenced population does not change cPKC expression in the first 24 hours while PKC $\delta$  levels are increased. However, cPKC expression is decreased and PKC $\delta$  does not change its levels 24 hours later. Cells treated with YTX after PDE4A1-silencing decreases both cytosolic cPKC and PKC $\delta$  after 24 hours, while after 48 hours of treatment cPKC is increased and PKC $\delta$  decreased.

## Figures

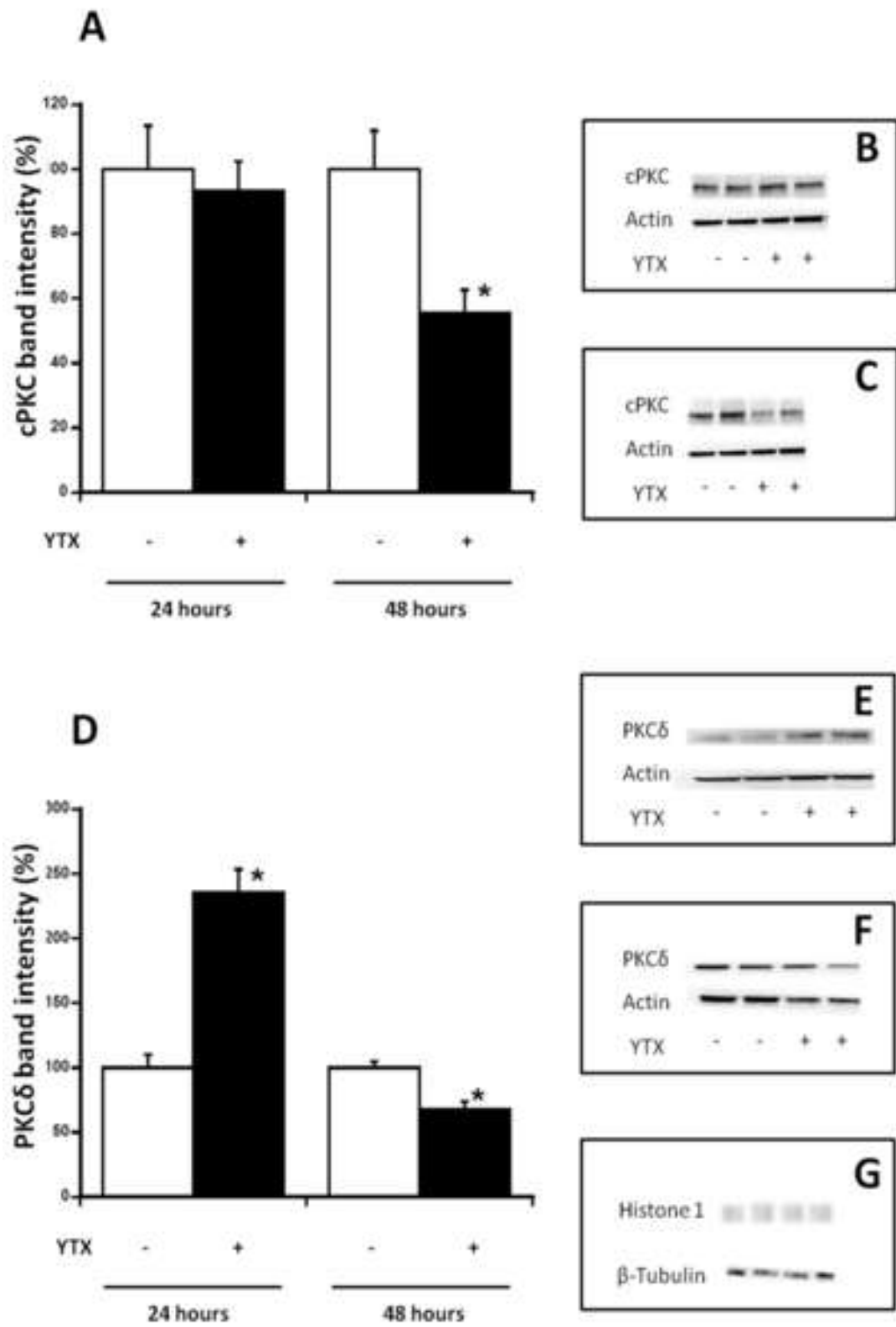


Figura 1

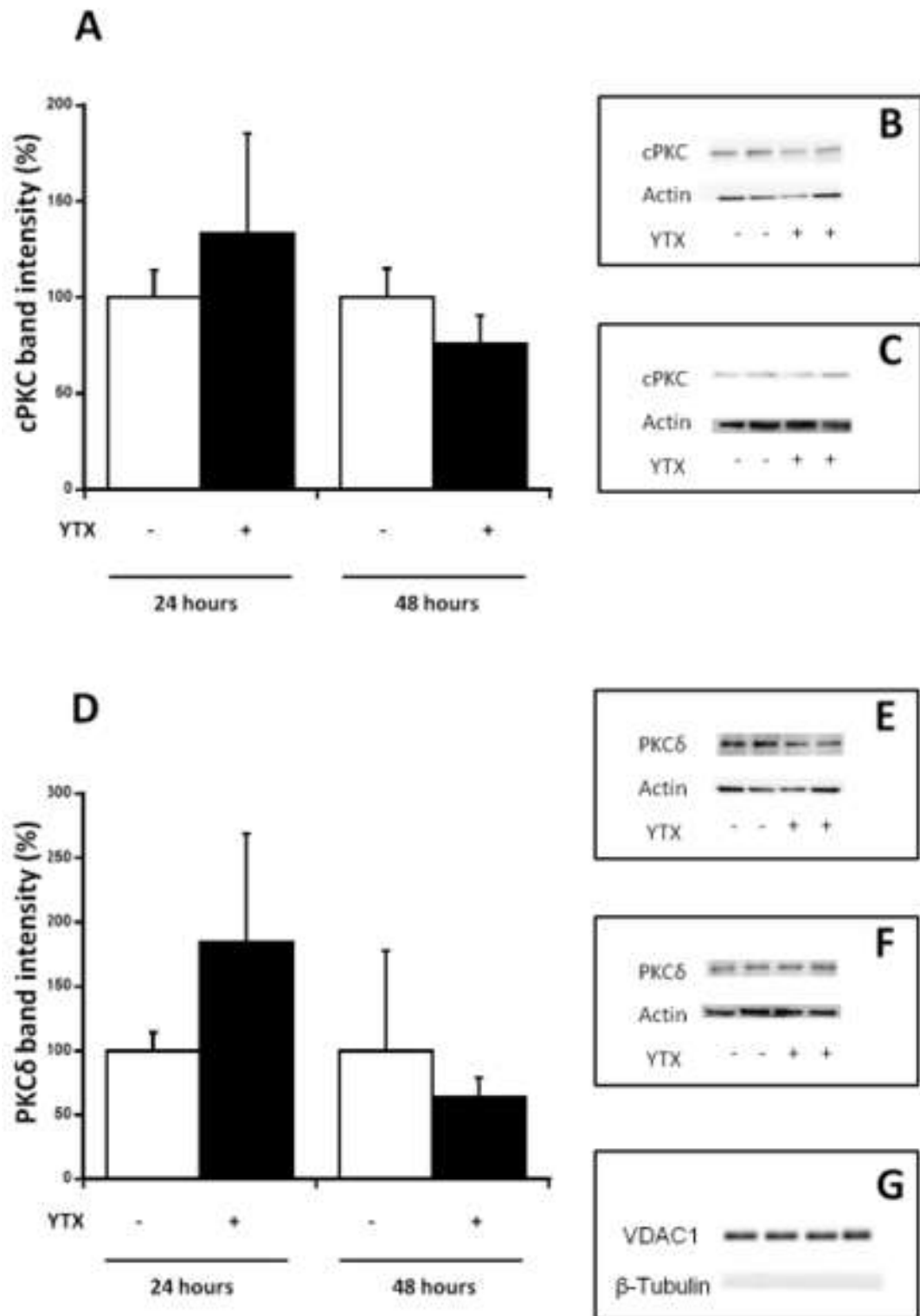


Figura 2

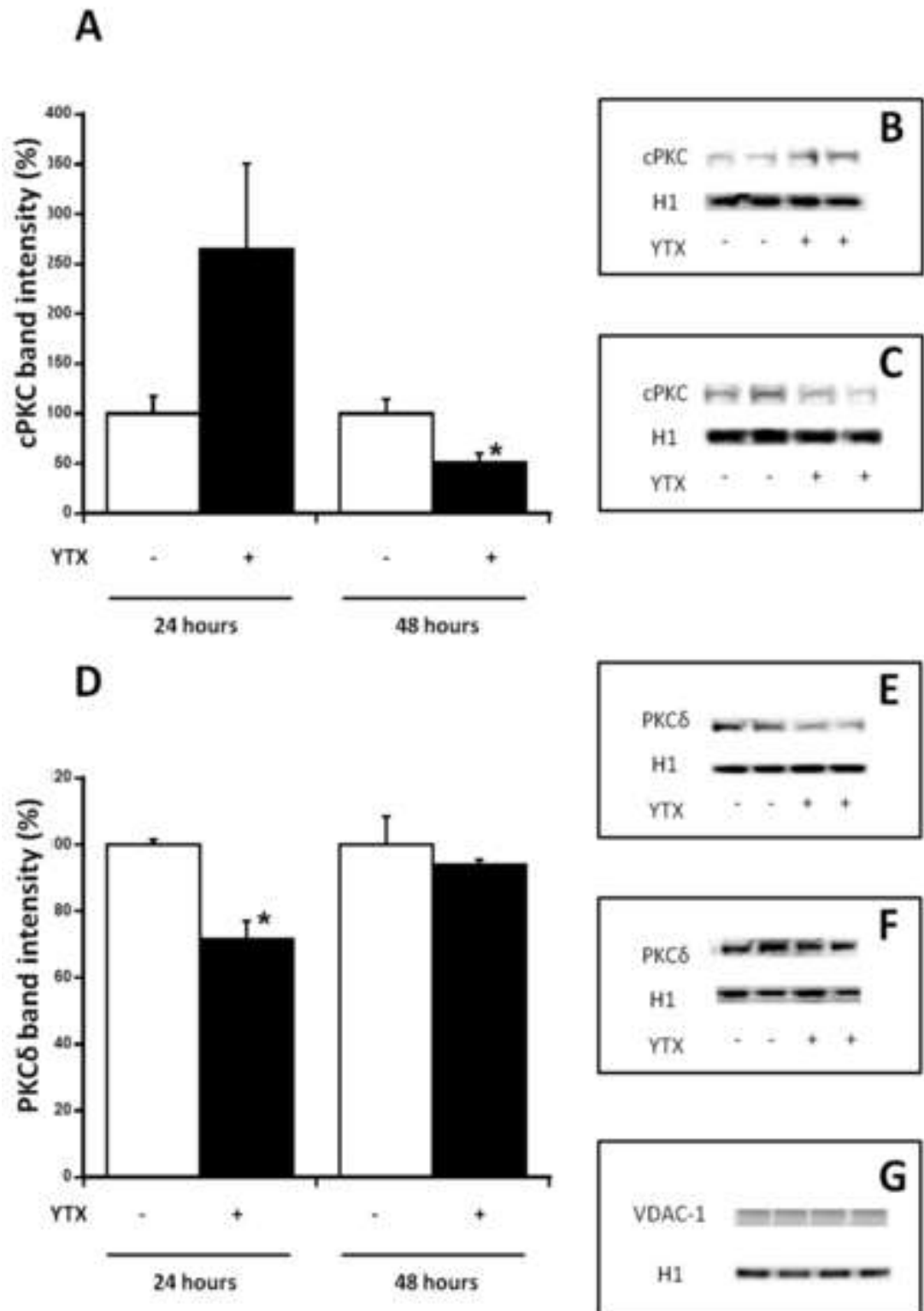


Figura 3

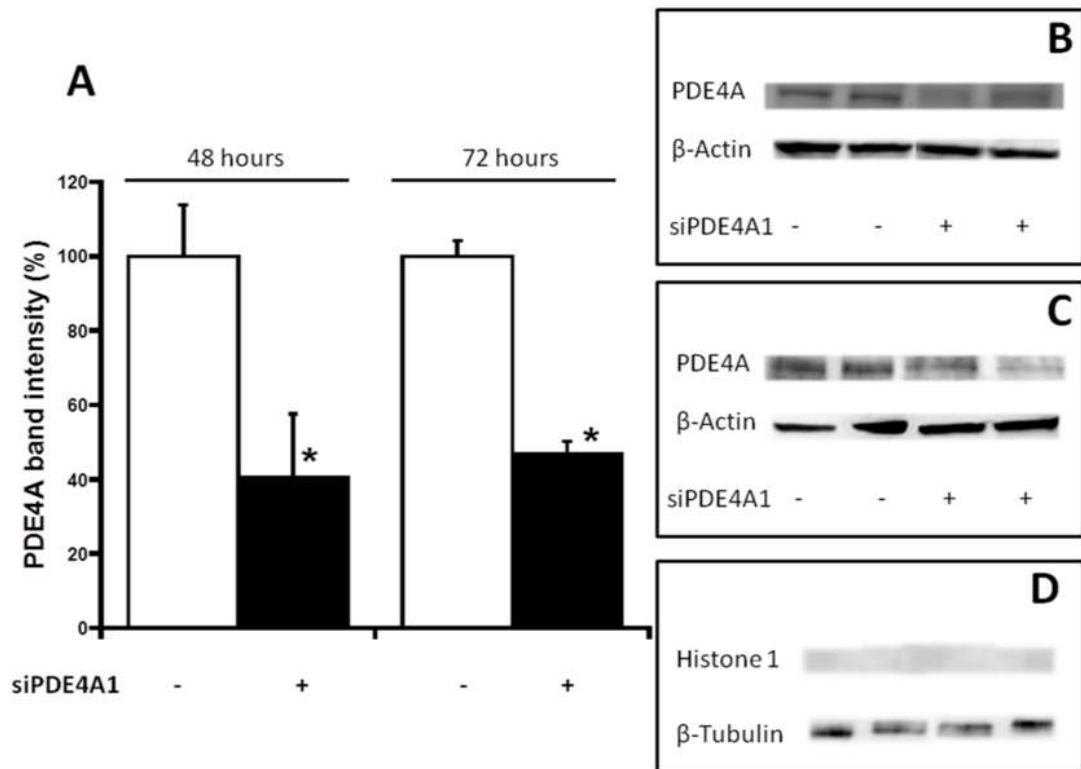


Figura 4



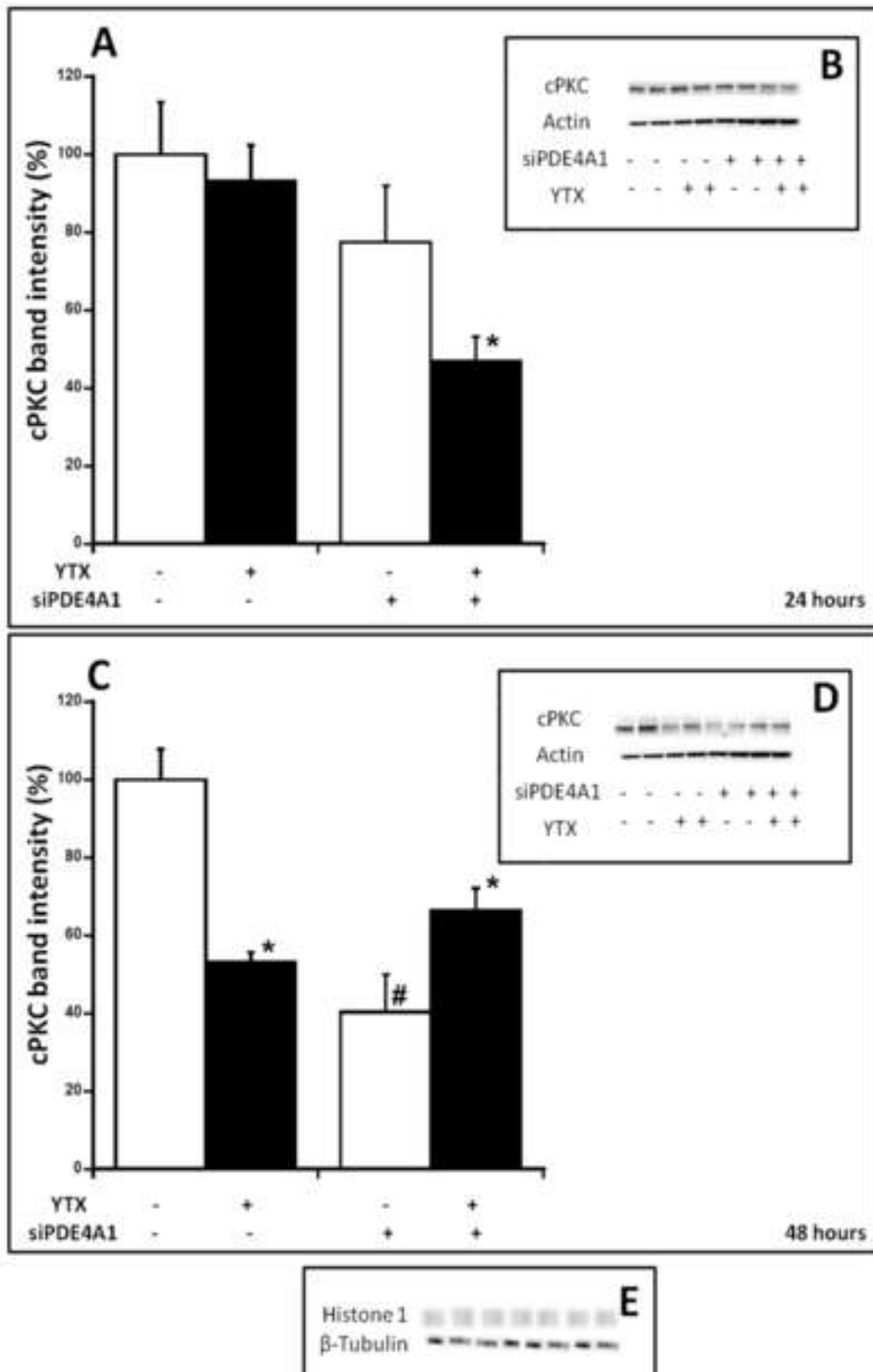


Figura 5

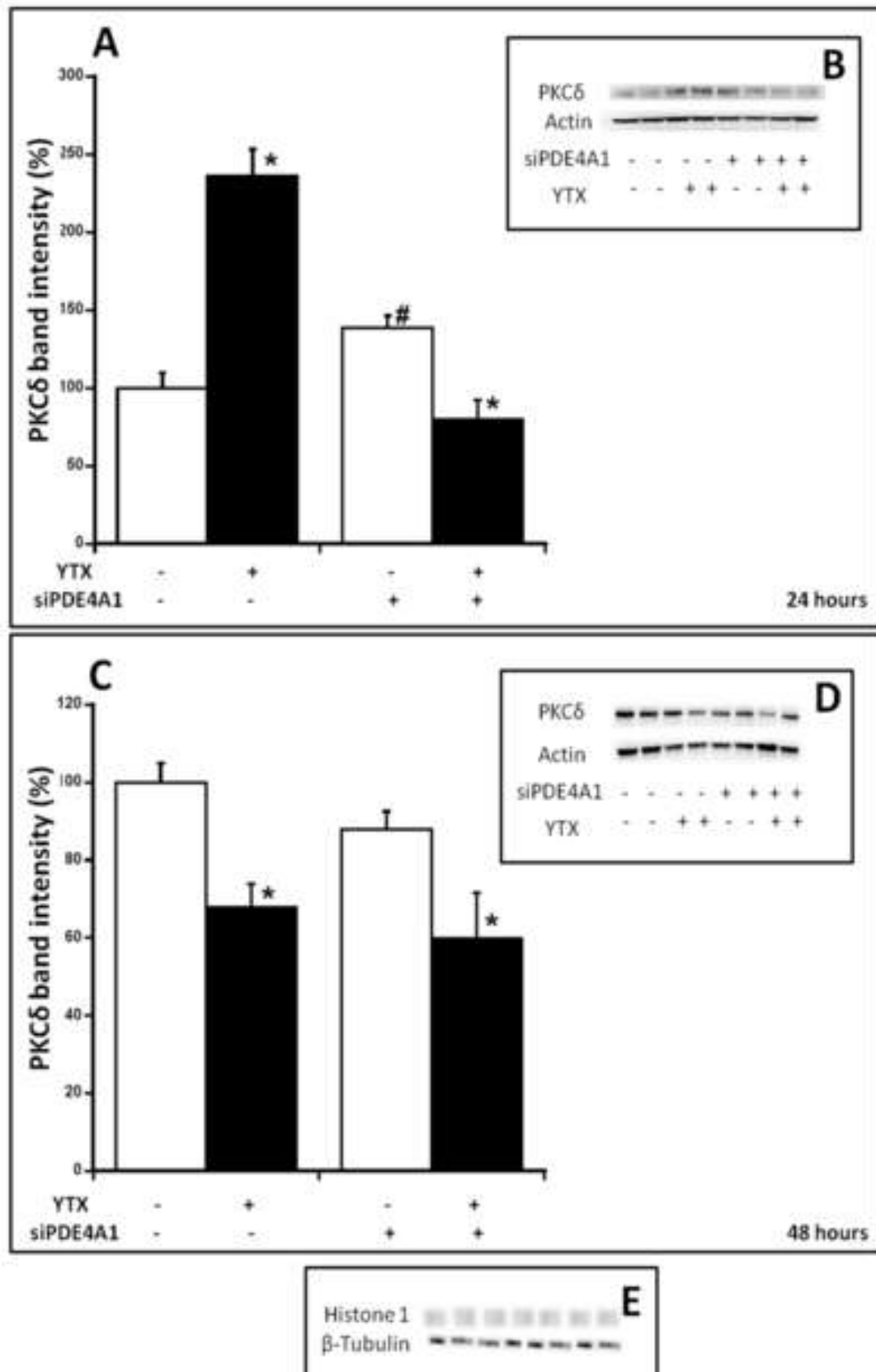


Figura 6

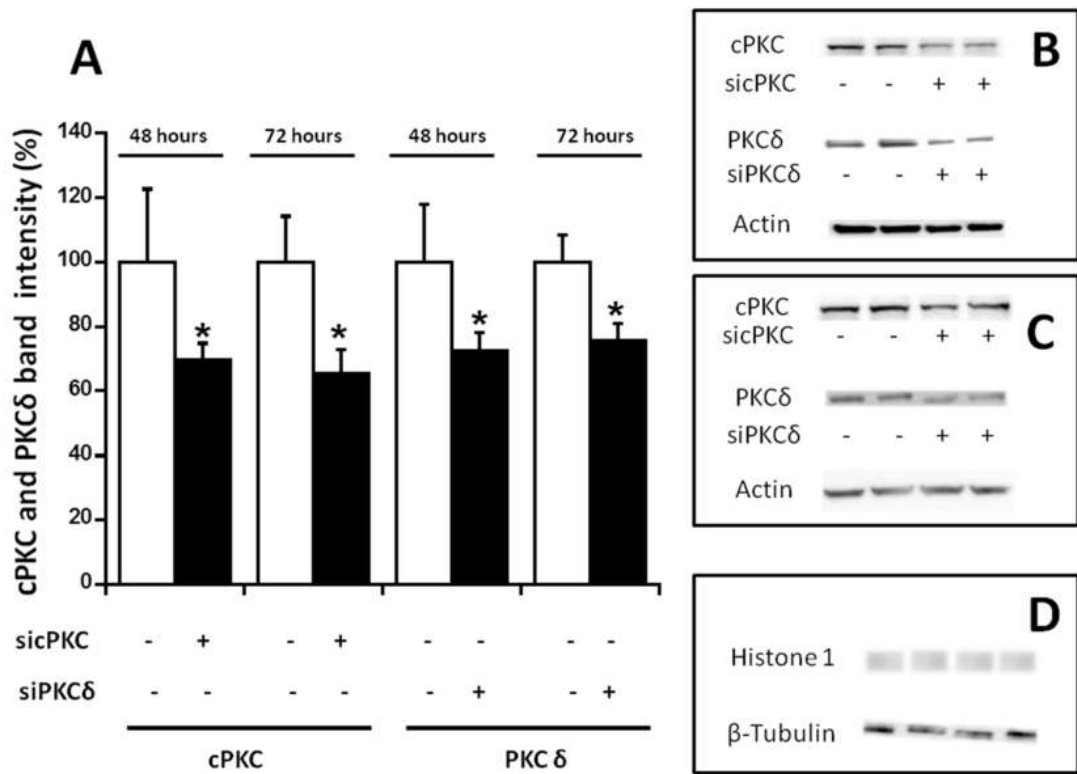


Figura 7

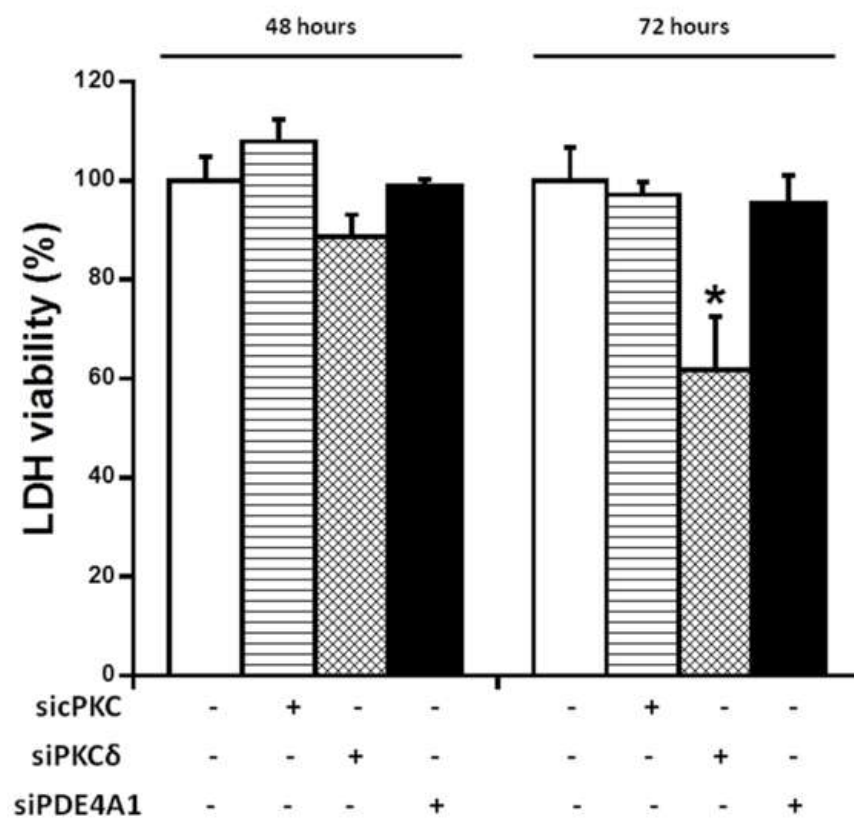


Figura 8

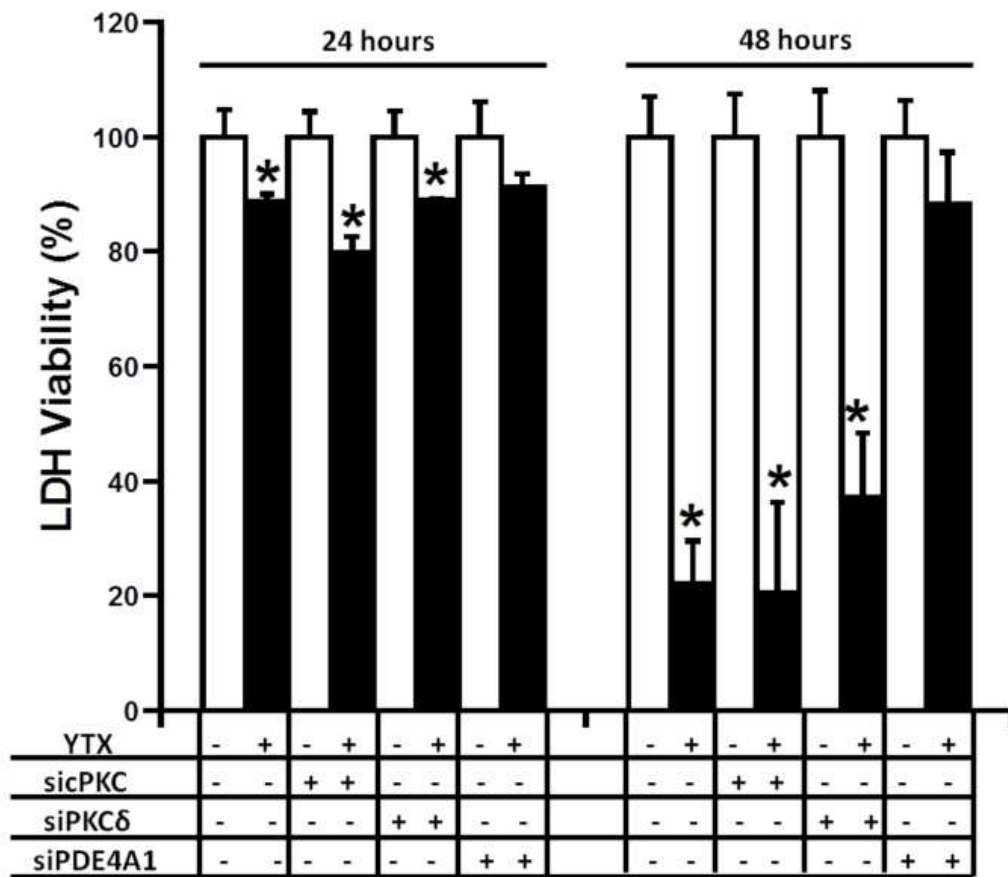


Figura 9

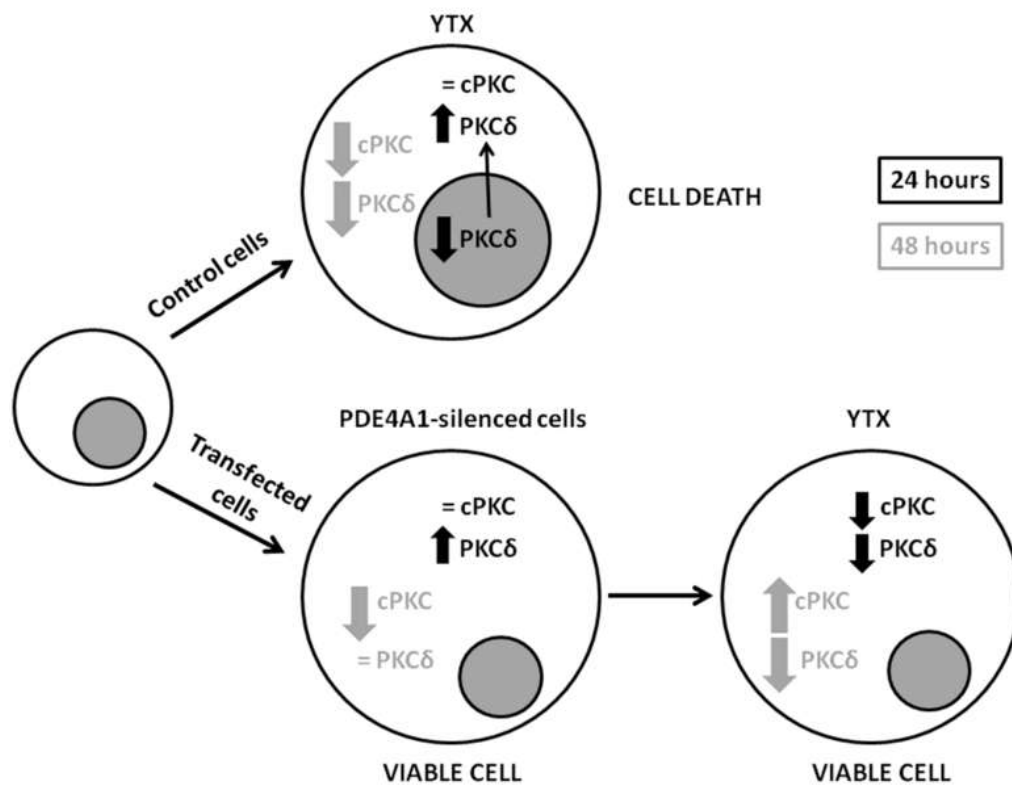


Figura 10

#### **I.4 Estudio comparativo entre la línea celular tumoral K-562 y la línea linfoblastoide no tumoral: la toxicidad de la YTX se debe a diferencias estructurales de la PDE4A**

##### Resumen

Las YTXs son un grupo de toxinas marinas involucradas en diferentes procesos de muerte celular programada según el tipo de célula. Esta toxina es citotóxica para la línea celular K-562, mientras que no lo es para linfocitos humanos. Además esta toxina activa las rutas de muerte en la línea K-562 a través de la PDE4A. Por lo tanto se realizó un estudio comparativo entre la línea tumoral K-562 y la línea linfoblastoide no tumoral. En este sentido, se midieron los niveles citosólicos de diferentes marcadores apoptóticos en ambas células. Así se cuantificó la cantidad de citocromo c o de la forma activa de la caspasa 8 en el citosol, tras 24 horas de incubación con YTX. Además también se estudió el marcador autofágico, la pmTOR en ambas células tras 48 horas de incubación con la YTX. Debido a la importancia de la PDE4A en las rutas que activa esta toxina, también se estudiaron los niveles de esta proteína en el citosol tras 24 y 48 horas de tratamiento. La expresión de todas estas proteínas se midieron mediante la técnica de western blot. Además, se comprobó con citometría de flujo la actividad mitocondrial tras la incubación con YTX durante 24 y 48 horas. Los resultados obtenidos muestran que en las primeras 24 horas, la YTX no activa la apoptosis en la línea linfoblastoide. Sin embargo, sí se observa activación de la autofagia tras 48 horas de tratamiento con la toxina pero sin inducir muerte celular, tan solo provoca una disminución de la proliferación celular.

**Comparative study between the tumor K-562 and non-tumor lymphoblastoid cell lines: YTX toxicity resides in structural differences of PDE4A**

Andrea Fernández-Araujo<sup>a</sup>, Amparo Alfonso<sup>a</sup>, Luis M. Botana<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Dept. Farmacología, Facultad de Veterinaria, 27002 Lugo. Spain

\* Correspondence to:

Prof. Luis M. Botana

Dept. Farmacología, Fac. Veterinaria, 27002 Lugo, Spain

Tfn/Fax: 34 982 822 233. E mail: [Luis.Botana@usc.es](mailto:Luis.Botana@usc.es)



**Abstract**

Yessotoxin (YTX) is a group of marine toxins involved in different processes of programmed cell death depending of cellular type. This toxin is cytotoxic to the K-562 cell line, while this effect was not observed in fresh human lymphocytes. Moreover, in K-562 cells, the YTX activates cell death pathways through the type 4A of phosphodiesterase (PDE4A). Therefore, a comparative study between the tumor cell line K-562 and a non-tumor lymphoblastoid cell line was performed. In this sense, the expression in the cytosol of the apoptotic hallmarks cytochrome c and the active form of caspase 8 were checked after 24 hours of YTX incubation in both cell lines. And also the autophagic hallmark, the mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR), was also studied after 48 hours of YTX treatment in the same cell lines. Also the PDE4A levels in the cytosol were studied after YTX incubation for 24 and 48 hours. The expression of all these proteins was studied through the western blot technique. Moreover, mitochondrial activity was checked by flow cytometry. The results shown no induction of apoptosis in lymphoblastoid line after 24 hours while after 48 hours the autophagy is triggered however it does not induce cell death, only a decrease of proliferation rate was observed.

*Keywords*

yessotoxin, apoptosis, autophagy, K-562, lymphoblastoid line.

## Introduction

Under unfavorable conditions, the cells develop different strategies to survive or die. In this context, autophagy is the main mechanism in which the cells fight for survive and if it is not possible, activates autophagic cell death [1]. Autophagy, also known as type II programmed cell death is activated after nutrients deprivation or other stimulus, such as rapamycin treatment [2, 3]. In both cases, the target is the mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR). This protein inhibits the autophagy through its active phosphorylated form (pmTOR), and under negative conditions, the protein is dephosphorylated and inactivated, as a result the autophagic cascade is triggered [3]. Then, multitude of metabolic pathways are activated to finally develop vacuoles, called autophagosomes. These vesicles will digest different parts of cells, such as damage organelles, that finally are fused with lysosomas, to obtain the basic elements to survive under unfavorable conditions [4]. However, sometimes, the autophagy degenerates in the digestion of the whole cell leading to the autophagic cell death [5]. Other type of programmed cell death and the main one, is the apoptosis, also known as the type I of programmed cell death [2]. Apoptosis can be activated through the intrinsic or mitochondrial apoptotic cell death or through the extrinsic or death receptor (DR) pathway [6]. The first one, mitochondrial apoptosis, is triggered by different stimulus that destabilizes mitochondrial membrane potential. As a result, the mitochondrial transition pore is opened and pro-apoptotic proteins are released from the intermembrane space to the cytosol [7]. The pro-apoptotic proteins such as cytochrome c, smac/DIABLO, apoptotic inductor factor (AIF), and endonuclease G, activate the caspase 9 that activates caspase 3 developing the rest of apoptotic cascade [8]. The extrinsic apoptotic cell death is triggered after the binding of a ligand to the death receptor (DR) that belongs to the tumour necrosis factor receptor family (TNFR), in the plasmatic membrane. Then, the death inducing signaling complex (DISC) is developed in the cytosolic region of the plasma membrane, and brakes procaspases 8 and 10 into the active forms caspases 8 and 10. The caspase 8 also activates the caspase 3 and converges at this point with the intrinsic apoptotic pathway [9].

Yessotoxins (YTX) are sulfated polyether compounds isolated for the first time from the scallops *Patinopecten yessoensis* [10]. However it is synthesized by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* and *Gonyaulax*

*spinifera* [11-13]. YTX are modulators of phosphodiesterases (PDEs), and as a consequence the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) levels are increased or decreased depending on the cell type [14-18]. Moreover, YTX is widely described as a mitochondrial apoptotic inducer [9, 19]. In this sense, the structural protein A kinase anchoring protein 149 (AKAP149) binds type 4A of PDE and protein kinase A (PKA) to the outer mitochondrial membrane [20, 21]. These three components make a complex that is regulated by cAMP levels, since this second messenger activates PKA to phosphorylate other proteins, and the whole complex moves around the cells depending on cAMP gradients [22, 23]. Therefore, this complex was studied after YTX treatment in K-562 cell line, and a close relation between the complex expression and cell death was discovered [14, 24]. In this context, opposite effects were observed in cell viability results and cytosolic AKAP149 levels between K-562 tumor cell line and fresh human lymphocytes. The K-562 cell viability and cytosolic AKAP149 levels were decreased, while no effect was observed in human fresh lymphocytes viability and the cytosolic AKAP149 expression was increased after YTX incubation [14]. Also autophagy cell death, was described in K-562 cell line after the treatment with the toxin [25].

In this context, the aim of this work is to elucidate if the toxic effects of YTX are exclusively of a tumoral cell model, or it depends on a lineage feature related to mitotic machinery. To this objective, a non-tumor cell line, a lymphoblastoid cell line was chosen to make a comparative study, since this line are human B lymphocytes immortalized with the Epstein Barr virus without tumoral features [26-28].

## **Materials and methods**

### *Reagents and solutions*

YTX was obtained from CIFGA Laboratories (Lugo, Spain). Anti- $\beta$ -tubulin I, Bovine serum albumin (BSA),  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Trizma hydrochloride, Triton X-100, glycine, trizma base, SDS (sodium dodecyl sulphate) and Tween<sup>®</sup>20 were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$  and glucose were from Panreac (Barcelona, Spain). Anti-PDE4A was from ABCAM (CA, USA). Anti-Histone 1, anti- $\beta$ -Actin, anti-pmTOR, anti-caspase 8 (active form), anti-cytochrome C, anti-rabbit IgG peroxidase conjugated and Polyvinylidene fluoride (PVDF)

membrane was from Millipore (Temecula, USA). Anti-Mouse IgG horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody was purchased from GE Healthcare (Barcelona, Spain).

Polyacrylamide gels and molecular weight marker Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™ were purchased from BioRad® (Barcelona, Spain). Protease Inhibitor Complete Tablets and Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets were from Roche (Spain).

Free calcium and magnesium PBS used in flow cytometry assays was purchased from Gibco, Life Technologies (UK).

Physiological saline solution composition was (in mM): Na<sup>+</sup> 142.3; K<sup>+</sup> 5.94; Ca<sup>2+</sup> 1; Mg<sup>2+</sup> 1.2; Cl<sup>-</sup> 126.2; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 22.85; HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1.2, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1.2; glucose 1 g/L was added to the medium giving an osmotic pressure of 290±10 mOsm/kg of H<sub>2</sub>O and pH was adjusted to 7.2 with HCl 0.1 N and CO<sub>2</sub>. PBS used to wash the western blotting membranes consisted of NaCl 137 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.14 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 mM; KCl 2.68 mM; pH was adjusted to 7.2 with NaOH.

#### *Cell culture*

K-562 cell line was purchased from the National Cancer Institute (NCI's) and maintained in the Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. All these reagents were from Gibco, Invitrogen (Spain). Cells were growing at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Incubations with 30 nM YTX were carried out under these conditions of temperature, humidity and percentage of CO<sub>2</sub>.

Lymphoblastoid cell line was purchased from the Banco Nacional de ADN Carlos III and maintained in the Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) medium with HEPES and glutamine from Biowest (France) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) and 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. All these reagents were from Gibco, Invitrogen (Spain). Cells were growing at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Incubations with 30 nM YTX were carried out under these conditions of temperature, humidity and percentage of CO<sub>2</sub>.

### *Subcellular fractionation*

$3 \cdot 10^6$  cells per condition were incubated 24 and 48 hours with and without 30 nM YTX and then were centrifuged and washed with saline solution. Cells were resuspended in lysis buffer with the following composition: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1X Complete Protease Inhibitor and 1X Phosphatase Inhibitor Cocktail. The extract was sonicated and centrifuged (9300 g, 10 minutes, 4°C). The supernatant with the cytosolic fraction was transferred to a new tube and stored at -20°C until protein quantification.

### *Western blotting analysis*

Direct Detect Spectrometer from Millipore (Germany) was used to know sample protein concentration and BSA was used as protein standard. The cytosolic fraction was blotted to PVDF membrane by reduced SDS-PAGE. To determine the protein size and also to monitor the progress of electrophoretic runs, Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™ molecular weight marker was used. After blockage with 0.5% BSA the membranes were incubated 10 minutes with anti-cytochrome C, anti-PDE4A, anti-caspase 8 and anti-pmTOR, then were washed three times with PBS and 0.1% Tween® 20 and incubated for 10 minutes with secondary anti-mouse or anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody. After three washes, chemiluminescence was visualized with SuperSignal® West Pico (low intensity) or with SuperSignal® West Femto (high intensity) both from Pierce (ThermoScientific, USA) also Clarity Western ECL substrate (medium intensity) was used from BioRad®. The chemiluminescent signal was detected with the Diversity GeneSnap software and analyzed by the Diversity 4 gel documentation and analysis system. Relative protein expression was calculated in relation to  $\beta$ -actin expression for each experiment in cytosolic fraction. Experiments were carried out at least three times by duplicate. The subcellular fraction purity was tested by measuring control proteins of cytosol fraction: Histone 1 was the negative control, only present in the nuclear fraction. And  $\beta$ -tubulin was the positive control since it is located in the cytosolic fraction.

### *Cell viability*

Cells were centrifuged (250xg, 4 minutes, 4°C) after treatment. The pellets were washed with saline solution and centrifuged (1100xg, 5 minutes, 4°C) again, then

cells were resuspended in saline solution with MTT (250 $\mu$ g/mL) (M2128, Sigma) and incubated and measured as described before [14]. The supernatant was used to measure LDH by using the in vitro Toxicology Assay Kit (TOX7, Sigma) following the commercial protocol. The assays were carried on with a cell number population per condition of  $5 \cdot 10^5$  cells.

#### *Mitochondrial activity*

After the treatment with the toxin, cells were washed with saline solution, centrifuged (1200xg, 5 minutes, 4°C) and incubated in 200 nM MittoTracker<sup>®</sup> Deep Red FM (Invitrogen, USA) for 30 minutes, 37°C in dark, washed again and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes at 4°C. Then, cells were washed for two times with free calcium and magnesium PBS and finally resuspended in 80  $\mu$ L of PBS and analyzed by flow cytometry. Flow cytometry data were analyzed by the IDEAS 4.0 Cell Image Analysis software. The assays were carried on with a cell number population per condition of  $1 \cdot 10^6$  cells.

#### *Statistical analysis*

All the experiments were carried out at least three times by duplicate. Student's *t*-test and ANOVA were used to examine statistical significance, assumed for  $p < 0.05$ . Results were expressed as the means  $\pm$  SEM.

### **Results**

Opposite effects of YTX are reported in tumor K-562 cell line and fresh human lymphocytes [14]. However there are several differences between a tumor cell line and fresh human cells, since the second one does not have the ability to grow by itself. Therefore, it would be interesting to compare the YTX effect between a tumor cell line and a non-tumor cell line. For this purpose it is a good option to compare the K-562 tumor cell line, with a lymphoblastoid cell line. This cellular line can grow by itself and has normal apoptotic machinery, while the tumor cell line has not [28]. In this sense the figure 1 shows the cellular proliferation measured by MTT metabolization, and LDH release (Figure 1A and 1B, respectively) after 24 and 48 hours of incubation with the toxin. K-562 cells decreased 32% the proliferation of cells after 24 hours of YTX exposure. However no effect was observed in lymphoblastoid line under the same conditions, since no differences respect to untreated cells were detected. After 48 hours of treatment, K-562 cell proliferation

was 59% decreased while lymphoblastoid cell line was 27% decreased. However the decrease of cellular proliferation in lymphoblastoid cells after 48 hours lower than that observed for the K-562 cells (figure 1A). On the other hand, after 24 hours of YTX treatment, LDH release was 78% increased in K-562 cell line while lymphoblastoid cell line showed no significant results respect to untreated cells. After 48 hours, YTX increased 52% the LDH release in K-562 cells, while no differences were observed in lymphoblastoid cell line after the incubation with the toxin.

MTT dye is metabolized by the mitochondria, therefore the results obtained after 48 hours, could be due to mitochondrial activity decrease after YTX incubation maintaining the cells number of the sample. In this sense, mitochondrial activity was studied in order to elucidate the effect of YTX at this level. MTT assays, measure the total of the absorbance of the whole sample in the well with  $5 \cdot 10^5$  cells/well. Therefore, figure 2 shows mitochondrial intensity cell by cell, by studying what happen after the YTX exposure, to elucidate if decreased levels of proliferation rate of figure 1 are due to a decrease in the cell number or a decrease in the mitochondrial activity. In this sense, in figure 2 mitochondrial activity is shown in K-562 cell line and in lymphoblastoid line after 24 and 48 hours of incubation. The mitochondrial dye, MitoTracker®Deep Red FM, is metabolized by the mitochondria and the intensity in channel 6 is proportional to mitochondrial activity. Figures 2A and 2B represent mitochondrial activity of K-562 cells and lymphoblastoid cells, respectively after 24 hours of YTX incubation. And figures 2C and 2D show the mitochondrial activity in K-562 and lymphoblastoid cell line, respectively after 48 hours of YTX treatment. Higher values in X axis represent more intensity of MitoTracker®Deep Red FM, and thus more activity of the mitochondria. Figure 2E collects these results and significant 7% increase of mitochondrial activity is observed after 24 hours of YTX incubation in both K-562 cell line and lymphoblastoid cell line. However, after 48 hours of treatment with the toxin, the MitoTracker®Deep Red FM intensity is 6% decreased in K-562 cell line, while it is 9% increased in lymphoblastoid line. Therefore, the decreased levels obtained by MTT assay after 48 hours of YTX treatment in lymphoblastoid line, are due to a decrease in the cell number, since at this time, mitochondrial activity is increased.

Moreover, it is described the key role of PDE4A in YTX mechanism of action [24]. In this sense, this protein was studied in lymphoblastoid cell line and compared to the tumor K-562 cell line after YTX treatment. Figure 3 shows the PDE4A expression in both tumor K-562 cells and non-tumor lymphoblastoid cell line after 24 hours of the exposure to the toxin. While YTX decreased 25% the expression of PDE4A in K-562 cells after 24 hours of treatment, no variations were observed in lymphoblastoid cell line. In the same way, PDE4A expression was measured after 48 hours of YTX incubation. Figure 4 shows the decreased levels of PDE4A in K-562 and lymphoblastoid lines, 34% and 22%, respectively after toxin treatment for 48 hours. At this point, by checking western blot membranes, one difference was observed. The antibody used to target PDE4A recognizes a protein at 98 KDa, however K-562 cells showed the PDE4A with a higher molecular weight, around 130 KDa, while lymphoblastoid cells showed their PDE4A at the established molecular weight, at 98 KDa (Data not shown). Moreover, YTX activates both intrinsic and extrinsic apoptosis of K-562 cell line after 24 hours of incubation [24]. Therefore the activation of these pathways was studied. In this sense, the results exposed until now, show some differences in lymphoblastoid cell line and the tumor cell line in terms of viability and PDE4A expression after YTX incubation. Therefore, different apoptotic hallmarks were studied under these conditions. Figure 5 shows the expression of the mitochondrial apoptotic hallmark, cytochrome c. While in K-562 cell line YTX induces 34% of increment in the cytosolic cytochrome c after 24 hours of incubation, no effects were observed in lymphoblastoid cells. Moreover similar results were obtained after measuring the typical extrinsic apoptotic hallmark, the active form of caspase 8. Figure 6 represents the caspase 8 levels after 24 hours of YTX exposure. Under these conditions, caspase 8 is 75% increased in the tumor cell line, K-562, while no effect is observed in non-tumor lymphoblastoid line. Finally, after 48 hours, YTX induces autophagy cell death in K-562 cell line [25]. Therefore the central protein of this pathway, the mTOR active form (pmTOR) [1], is studied to finish understanding the similarities and differences between both cell types. In this regard, surprisingly, similar results were obtained in K-562 and lymphoblastoid cell line. A decrease of 39% and 40% was observed after 48 hours of YTX treatment in the tumor cell line and in non-tumor cell line, respectively (figure 7).

In summary, YTX effects are different depending on the cellular line, since different results were obtained in the tumor K-562 cell line and non-tumor lymphoblastoid cells. In the first 24 hours YTX activates apoptotic cell death in the tumor cell line, the levels of PDE4A are decreased in the cytosol and mitochondrial activity is increased. And after 48 hours, autophagy cell death is activated in K-562 cells accompanied by a decrement in the expression of cytosolic PDE4A and in mitochondrial activity. On the other hand, YTX shows no effect on lymphoblastoid cell line the first 24 hours of incubation with the toxin, only mitochondrial activity is increased at this time. However after 48 hours of treatment, autophagic hallmarks are detected, and cell proliferation is observed while no LDH release was activated. Moreover PDE4A expression is decreased in the cytosol while mitochondrial activity is still increased (Table 1). The autophagy activation in K-562 leads to cell death, however the same pathway activated in lymphoblastoid cell line, did not induce cell death.

### **Discussion**

YTX activates different cell death types depending on the cellular line [19]. Moreover, opposite effects in terms of cell viability were obtained after the treatment with YTX of the tumor K-562 cell line and fresh human lymphocytes [14]. These observations points to YTX as an interesting compound to target tumor cell lines but not normal cells [29]. However there are several differences between a cellular line and fresh cells from healthy donors, since the last one cannot grow by itself [30]. In this context, the comparative study of YTX effect in a tumor cell line and a non-tumor cell line could give interesting information about the mechanism of action of YTX. The pathways activated in the leukemic K-562 cell line by this toxin are quite studied [14, 24, 25]. And it is described that PDE4A shows a key role in these pathways that leads to the activation of different programmed cell death pathways [24, 25]. Therefore, lymphoblastoid line is a good tool to study the effects of the toxin comparing to well known pathways triggered in K-562 cells.

The first difference observed between the two lines is the cell viability. Cellular proliferation is usually measured by MTT assay that gives a percentage of viable cells capable to reduce the MTT dye by the mitochondria [31-33]. On the other hand, LDH measurement is a simple assay to quantify cell membrane integrity, since after

the lysis of cells, LDH is released into the extracellular medium and the amount of this enzyme increases proportionally to the number of broken cells [34]. In this sense, K-562 cell line shows a fall in cell proliferation accompanied by an increment in LDH release after both 24 and 48 hours. Therefore the number of cells is decreasing by cell death, since apoptosis and autophagy are respectively activated after 24 and 48 hours of YTX incubation [24, 25]. However, lymphoblastoid cell line shows no effect in cell viability in the first 24 hours of treatment, and after 48 hours the cell proliferation is decreased without LDH release. These results suggest no cell death activation in lymphoblastoid line after YTX incubation, but cellular proliferation arresting of lymphoblastoid cell line is activated after long time of toxin exposure. K-562 cell death after 24 hours of YTX incubation observed in this paper was pointed out before [24]. Interesting, caspase 8 activation observed before [24], correlates with the increased levels of its active form observed in this paper after the treatment with YTX for 24 hours. This apoptotic hallmark is typical from extrinsic apoptotic pathway, and this pathway has not been observed in other cell line different of K-562 [19, 24, 35]. Furthermore, the cytosolic levels of cytochrome c released from the mitochondria demonstrate that YTX is also triggering the intrinsic apoptosis [36]. However, none of these hallmarks were observed in lymphoblastoid cell line, showing different YTX effect depending on cellular type [14]. The mechanism of action of YTX is through the PDE4A1 protein modulation and also through the mitochondrial complex AKAP149-PKA-PDE4A movement over the cell, in K-562 cell line [24]. In this context, western blot analysis showed different PDE4A molecular weight for both K-562 cell line and lymphoblastoid cells. Therefore, any difference in the structure of this PDE4A protein could be the key point of the YTX mechanism of action. Molecular structure is a critical parameter for the affinity or interaction between proteins as it was observed in other cases [37-39]. Any particularity on PDE4A of K-562 cell line, points out this protein as a specific and potential target to tumor therapies for this type of leukemia.

Later on, after 48 hours of YTX treatment, lymphoblastoid line shows autophagic activation accompanied by a decrease in PDE4A levels in the cytosol. But these similar features to those observed in K-562 cell line (cytosolic PDE4A and pmTOR decrease) do not imply cell death in lymphoblastoid cell line, as the results show. In this sense different effect of YTX in both K-562 cell line and

lymphoblastoid cells are also observed. At this time, after 48 hours of treatment, autophagy activated in K-562 leads to cell death. However, the autophagy activated in lymphoblastoid line leads to a decrease of the cell proliferation rate, that is no type II programmed cell death. In this context, the cell develops the mechanism to begin the digestion or recycling of different parts of the cell in order to obtain the elements to survive under these critical conditions. Sometimes, the cell cannot survive to this process, and autophagic cell death is activated [40]. But other times, the aim of the autophagy, to survive in extreme conditions, is performed [41]. Different to K-562 cell line, lymphoblastoid cell line autophagy does not activate cell death and this fact induces the decrease in levels of cell proliferation. Since the activation of autophagic survive mechanism produce this effect through the cell growth regulator mTOR protein [3]. Decrement in cell proliferation by autophagic activation was observed in colon cells and in human mammary epithelial cell lines [42, 43]. Rapamycin shows the same effect on cell proliferation through the cell cycle arrest in G1 phase of the mitosis, in endometrial carcinomas [44]. Therefore, there is a connection between autophagy activation and cell proliferation decreases. It is important also, the relationship between the protein components of the AKAP149-PKA-PDE4A complex and cell death, since the decrease of these enzymes in the cytosol leads to cell death, while in fresh human lymphocytes it was described the increment of cytosolic AKAP149 after YTX treatment and no cell death was detected [14].

It is described that the central point where the cell proliferation, apoptosis and autophagy converge, is the mitochondria [45]. In this sense, a close relationship between mitochondrial permeability transition (MPT) and autophagy or apoptosis is established [46]. MPT leads to mitochondrial membrane depolarization that finally induces the opening transition pore to release pro-apoptotic proteins to the cytosol [47]. When the MPT process is activated in some mitochondrias, autophagy is activated, while apoptosis is triggered when a high number of mitochondrias suffer MPT [46]. But the exact way of the influence between MPT and autophagy is unknown [48]. In this paper, mitochondrial activity in K-562 cell line is increased after 24 hours of incubation with the toxin, when the apoptosis is activated. Typically, mitochondrial activity is decreased in apoptotic processes, since this type of cell death, usually shows an increase of reactive oxygen species (ROS) due to the decreased activity of the mitochondria to neutralize oxidative stress [49]. However

YTX activates apoptosis and increased levels of mitochondrial activity were observed, therefore, further studies must be done to elucidate the involvement of YTX in this effect. Moreover, a similar assay, measuring mitochondrial fluorescence by a MitoTracker fluorophore after apoptosis induction of different human lymphoid cell lines, showed decrement of intensities of mitochondrial dye in apoptotic population [50]. Also the loss of mitochondrial mass, measured by the same fluorophore, was obtained in peripheral blood mononuclear cells [51]. Therefore, this special effect of YTX must be carefully studied, since this is not the first time that the increased levels of mitochondrial activity by YTX is pointed out. This effect was concluded after YTX treatment of primary culture rat miocytes, after the observation in MTT assay increment by YTX effect [52]. Also other anti-tumoral compounds treatment of cancer cell lines showed increased false levels of MTT signal [53]. However, after 48 hours, when YTX activates autophagic cell death in K-562 line, mitochondrial activity is decreased. In this context, mitophagy was defined as the mitochondrial autophagy to describe the mitochondrial removal, characteristic of autophagy activation [54]. On the other hand, mitochondrial activity is also increased in lymphoblastoid cell line after 24 hours of treatment with the toxin, with no effects on cell viability, while after autophagy induction at 48 hours of YTX incubation, its activity continuous increased. Therefore, this is another hallmark to guarantee that the autophagy activated after 48 hours in K-562 cell line and in lymphoblastoid cell line, is a different autophagy, since in the first case the cells activate autophagy accompanied by mitophagy and mitochondrial signal decrement, while lymphoblastoid cell line activates autophagy as a survive process that not affect to mitochondrias.

In conclusion, the routes activated by YTX in K-562 cell line, are confirmed in this paper and also mitochondrial activity is pointed as a characteristic feature of YTX apoptotic activation. Moreover lymphoblastoid line shows non cytotoxic effect after YTX treatment, although the cell proliferation decreases due to autophagy activation. However further could be done to check other autophagy hallmarks. All these results are summarized in Table 1. Finally, YTX effect depend on cellular model, but also the same pathways can be activated by the toxin, such as autophagy, but in K-562 cells leads to type II programmed cell death, while lymphoblastoid cell

line leads to autophagic survive. In this sense, the different strategies of the cells to respond to YTX can be interesting in order to design new molecular therapies.

### **Acknowledgements**

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofunded-grants. From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía y Competitividad, AGL2009-13581-C02-01, AGL2012-40185-CO2-01 and Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, GRC2013-016, and through Axencia Galega de Innovación, Spain, ITC-20133020 SINTOX, IN852A 2013/16-3 MYTIGAL. From CDTI under ISIP Programme, Spain, IDI-20130304 APTAFOOD.

From the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA – Research Executive Agency (FP7/2007-2013) under grant agreement Nos. 265409  $\mu$ AQUA, 315285 CIGUATOOLS and 312184 PHARMASEA. Andrea Fernández Araujo is supported by a fellowship from Subprograma de Formación de Personal Investigador (AGL2009-13581-C02-01), Spain.



## References

1. Codogno P, Meijer AJ: **Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death.** *Cell Death and Differentiation* 2005, **12**:1509–1518.
2. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK: **Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis.** *Cell Proliferation* 2012, **45**(6):487-498.
3. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH: **mTOR regulation of autophagy.** *FEBS Letters* 2010, **584**(7):1287-1295.
4. Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Droge W, Ffrench M, Terman A: **Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells.** *Autophagy* 2005, **1**(3):131-140.
5. Tsujimoto Y, Shimizu S: **Another way to die: autophagic programmed cell death.** *Cell Death Differ* 2005, **12**(S2):1528-1534.
6. Elmore S: **Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.** *Toxicologic Pathology* 2007, **35**(4):495-516.
7. Debatin KM, Poncet D, Kroemer G: **Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway.** *Oncogene* 2002, **21**(57):8786-8803.
8. Javadov S, Karmazyn M: **Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as an Endpoint to Initiate Cell Death and as a Putative Target for Cardioprotection.** *Cellular Physiology and Biochemistry* 2007, **20**(1-4):1-22.
9. Korsnes MS, Espenes A: **Yessotoxin as an apoptotic inducer.** *Toxicon* 2011, **57**(7–8):947-958.
10. Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T: **Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning.** *Tetrahedron Letters* 1987, **28**(47):5869-5872.
11. Satake M, MacKenzie L, Yasumoto T: **Identification of Protoceratium reticulatum as the biogenetic origin of yessotoxin.** *Natural Toxins* 1997, **5**(4):164-167.
12. Rhodes L, McNabb P, de Salas M, Briggs L, Beuzenberg V, Gladstone M: **Yessotoxin production by Gonyaulax spinifera.** *Harmful Algae* 2006, **5**(2):148-155.
13. Paz B, Riobó P, Fernández ML, Fraga S, Franco JM: **Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates Protoceratium reticulatum and Lingulodinium polyedrum in culture.** *Toxicon* 2004, **44**(3):251-258.
14. Tobío A, Fernández-Araujo A, Alfonso A, Botana LM: **Role of yessotoxin in calcium and cAMP-crosstalks in primary and K-562 human lymphocytes: The effect is mediated by Anchor kinase a mitochondrial proteins.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2012, **113**(12):3752-3761.

15. Alfonso A, de la Rosa L, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes.** *Biochem Pharmacol* 2003, **65**(2):193-208.
16. Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **A rapid microplate fluorescence method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases.** *Analytical Biochemistry* 2004, **326**(1):93-99.
17. Alfonso C, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Quantification of yessotoxin using the fluorescence polarization technique and study of the adequate extraction procedure.** *Analytical Biochemistry* 2005, **344**(2):266-274.
18. Pazos MJ, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Study of the interaction between different phosphodiesterases and yessotoxin using a resonant mirror biosensor.** *Chemical Research in Toxicology* 2006, **19**(6):794-800.
19. Korsnes MS: **Yessotoxin as a tool to study induction of multiple cell death pathways.** *Toxins* 2012, **4**(7):568-579.
20. Asirvatham AL, Galligan SG, Schillace RV, Davey MP, Vasta V, Beavo JA, Carr DW: **A-kinase anchoring proteins interact with phosphodiesterases in T lymphocyte cell lines.** *J Immunol* 2004, **173**(8):4806-4814.
21. Carlucci A, Lignitto L, Feliciello A: **Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome.** *Trends Cell Biol* 2008, **18**(12):604-613.
22. Baillie GS, Scott JD, Houslay MD: **Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract.** *FEBS Letters* 2005, **579**(15):3264-3270.
23. Sample V, DiPilato LM, Yang JH, Ni Q, Saucerman JJ, Zhang J: **Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP.** *Nat Chem Biol* 2012, **8**(4):375-382.
24. Fernandez-Araujo A, Tobío A, Alfonso A, Botana LM: **Role of AKAP 149-PKA-PDE4A complex in cell survival and cell differentiation processes.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2014, **53**(0):89-101.
25. Fernandez-Araujo A, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM: **Key role of phosphodiesterase 4A1 (PDE4A1) in autophagy regulation.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2014, **Submitted**.
26. Sie L, Loong S, Tan EK: **Utility of lymphoblastoid cell lines.** *J Neurosci Res* 2009, **87**(9):1953-1959.
27. Sugimoto M, Tahara H, Ide T, Furuichi Y: **Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus.** *Cancer Res* 2004, **64**(10):3361-3364.

28. Hussain T, Mulherkar R: **Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair.** *Int J Mol Cell Med* 2012, **1**(2):75-87.
29. Botana LM, Alfonso A, Vieytes MR, Loza MI: **Therapeutic use of yessotoxins as human tumor cell growth inhibitors.** In., vol. EP 1875906 B1; 2011.
30. Baserga R: **The Relationship of the Cell Cycle to Tumor Growth and Control of Cell Division: A Review.** *Cancer Research* 1965, **25**(5 Part 1):581-595.
31. Verma A, Prasad KN, Singh AK, Nyati KK, Gupta RK, Paliwal VK: **Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis.** *Journal of Microbiological Methods* 2010, **81**(2):175-178.
32. Loveland BE, Johns TG, Mackay IR, Vaillant F, Wang ZX, Hertzog PJ: **Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays.** *Biochem Int* 1992, **27**(3):501-510.
33. Mosmann T: **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods* 1983, **65**(1-2):55-63.
34. Lobner D: **Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?** *Journal of Neuroscience Methods* 2000, **96**(2):147-152.
35. Suárez Korsnes M, Espenes A: **Yessotoxin as an apoptotic inducer.** *Toxicon* 2011, **57**(7-8):947-958.
36. Fulda S, Debatin KM: **Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy.** *Oncogene* 2006, **25**(34):4798-4811.
37. Yatime L, Laursen M, Morth JP, Esmann M, Nissen P, Fedosova NU: **Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.** *Journal of Structural Biology* 2011, **174**(2):296-306.
38. Tubaro A, del Favero G, Pelin M, Bignami G, Poli M: **Palytoxin and Analogues: Biological Effects and Detection.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 741-772.
39. Funder JW, Feldman D, Highland E, Edelman IS: **Molecular modifications of anti-aldosterone compounds: Effects on affinity of spiro lactones for renal aldosterone receptors.** *Biochemical Pharmacology* 1974, **23**(10):1493-1501.
40. Fulda S: **Autophagy and cell death.** *Autophagy* 2012, **8**(8):1250-1251.
41. Hu YL, DeLay M, Jahangiri A, Molinaro AM, Rose SD, Carbonell WS, Aghi MK: **Hypoxia-Induced Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Adaptation to Antiangiogenic Treatment in Glioblastoma.** *Cancer Research* 2012, **72**(7):1773-1783.

42. Wu YC, Wang XJ, Yu L, Chan FKL, Cheng ASL, Yu J, Sung JJY, Wu WKK, Cho CH: **Hydrogen Sulfide Lowers Proliferation and Induces Protective Autophagy in Colon Epithelial Cells.** *PLoS One* 2012, **7**(5):e37572.
43. Chen N, Eritja N, Lock R, Debnath J: **Autophagy restricts proliferation driven by oncogenic phosphatidylinositol 3-kinase in three-dimensional culture.** *Oncogene* 2013, **32**(20):2543-2554.
44. Bae-Jump VL, Zhou C, Boggess JF, Whang YE, Barroilhet L, Gehrig PA: **Rapamycin inhibits cell proliferation in type I and type II endometrial carcinomas: A search for biomarkers of sensitivity to treatment.** *Gynecologic Oncology* 2010, **119**(3):579-585.
45. Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Zamin LL, Lenz G: **Autophagy Interplay with Apoptosis and Cell Cycle Regulation in the Growth Inhibiting Effect of Resveratrol in Glioma Cells.** *PLoS One* 2011, **6**(6):e20849.
46. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA *et al*: **The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1998, **1366**(1-2):177-196.
47. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P: **Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease.** *Circ Res* 2003, **93**(4):292-301.
48. Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ: **The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes.** *The FASEB Journal* 2001.
49. Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J: **Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update.** *Arch Toxicol* 2012, **86**(11):1649-1665.
50. Poot M, Gibson LL, Singer VL: **Detection of Apoptosis in Live Cells by MitoTrackery Red CMXRos and SYTO Dye Flow Cytometry.** *Cytometry* 1997, **27**:358-364.
51. Lugli E, Troiano L, Ferraresi R, Roat E, Prada N, Nasi M, Pinti M, Cooper EL, Cossarizza A: **Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis.** *Cytometry Part A* 2005, **68A**(1):28-35.
52. Dell'Ovo V, Bandi E, Coslovich T, Florio C, Sciancalepore M, Decorti G, Sosa S, Lorenzon P, Yasumoto T, Tubaro A: **In Vitro Effects of Yessotoxin on a Primary Culture of Rat Cardiomyocytes.** *Toxicological Sciences* 2008, **106**(2):392-399.
53. Ulukaya E, Colakogullari M, Wood EJ: **Interference by Anti-Cancer Chemotherapeutic Agents in the MTT-Tumor Chemosensitivity Assay.** *Chemotherapy* 2004, **50**(1):43-50.
54. Youle RJ, Narendra DP: **Mechanisms of mitophagy.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**(1):9-14.

## Tables


Features	K-562 tumor cell line		Lymphoblastoid cell line	
	24 hours	48 hours	24 hours	48 hours
MTT viability	↓	↓	≡	↓
LDH release	↑	↑	≡	≡
PDE4A expression	↓	↓	≡	↓
Mitochondrial activity	↑	↓	↑	↑
Cell Death	YES	YES	NO	NO
Apoptotic hallmarks	YES	NO	NO	NO
Autophagic hallmarks	NO	YES	NO	YES
 YTX ACTION	Apoptosis cell death	Autophagy cell death	No action	Cell proliferation arrest by autophagy cell survive

Table 1: Summary of the viability, apoptotic and autophagic features of K-562 and lymphoblastoid cell line after YTX incubation studied in this paper.

### Figure legends

**Figure 1: Effect of YTX on cellular proliferation and LDH release in K-562 and lymphoblastoid cell lines.** Cells were incubated with 30 nM YTX for 24 and 48 hours (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A):** Percentage of cellular proliferation measured by MTT assay in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 and 48 hours of YTX incubation. **(B):** Percentage of LDH release of K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 and 48 hours of YTX incubation. Mean ± SEM of three experiments. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells in each case. (#) Significant differences between lymphoblastoid cell line and K-562 cell line under the same condition.

**Figure 2: Effect of YTX on mitochondrial activity of K-562 and lymphoblastoid cell lines.** Representative cellular images and histograms of the mitochondrial activity intensity in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours (**A and B**, respectively) and after 48 hours (**C and D**, respectively) of YTX incubation (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Brightfield images are represented in channel 05 and MitoTracker@Deep Reed FM intensity images are shown in channel 06. **(E):** Percentage of mitochondrial activity of K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 and 48 hours of YTX treatment. Data referred to untreated cells. Mean ± SEM of three experiments (5000 cells were analyzed in each experiment). (\*) Significant differences between YTX-treated and untreated cells.

**Figure 3: Effect of YTX on cytosolic PDE4A expression in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours of incubation.** Cells were incubated for 24 hours with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A):** Percentage of cytosolic PDE4A levels in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours of YTX incubation. Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic PDE4A values were calculated respect to β-actin band intensity. 3.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 µg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells. **(B) and (C):** Representative experiments of western blot band intensity of cytosolic PDE4A in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours of treatment, respectively. **(D):** Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 4: Effect of YTX on cytosolic PDE4A expression in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 48 hours of incubation.** Cells were incubated for 48 hours with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A):** Percentage of cytosolic PDE4A levels in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 48 hours of YTX incubation. Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic PDE4A values were calculated respect to β-actin band intensity. 3.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 µg of total protein per condition was

charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells. **(B) and (C):** Representative experiments of western blot band intensity of cytosolic PDE4A in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours of treatment, respectively. **(D):** Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 5: Effect of YTX on cytosolic cytochrome c expression in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours of incubation.** Cells were incubated for 24 hours with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A):** Percentage of cytosolic cytochrome c levels in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours of YTX incubation. Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic cytochrome c values were calculated respect to β-actin band intensity. 3.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 μg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells. **(B) and (C):** Representative experiments of western blot band intensity of cytosolic cytochrome c in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours of treatment, respectively. **(D):** Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 6: Effect of YTX on cytosolic caspase 8 expression in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours of incubation.** Cells were incubated for 24 hours with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A):** Percentage of cytosolic caspase 8 levels in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours of YTX incubation. Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic caspase 8 values were calculated respect to β-actin band intensity. 3.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 μg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells. **(B) and (C):** Representative experiments of western blot band intensity of cytosolic caspase 8 in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 24 hours of treatment, respectively. **(D):** Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.

**Figure 7: Effect of YTX on cytosolic pmTOR expression in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 48 hours of incubation.** Cells were incubated for 48 hours with 30 nM YTX (37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). **(A):** Percentage of cytosolic pmTOR levels in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 48 hours of YTX incubation. Mean ± SEM of three experiments. Cytosolic pmTOR values were calculated respect to β-actin band intensity. 3.10<sup>6</sup> cells per condition were lysed and 20 μg of total protein per condition was charged in the electrophoresis gel. (\*) Significant differences between untreated and YTX-treated cells. **(B) and (C):** Representative experiments of western blot band intensity of cytosolic pmTOR in K-562 and lymphoblastoid cell lines after 48 hours of treatment,

respectively. **(D)**: Representative proteins as positive and negative controls of cytosolic fraction purity.



## Figures

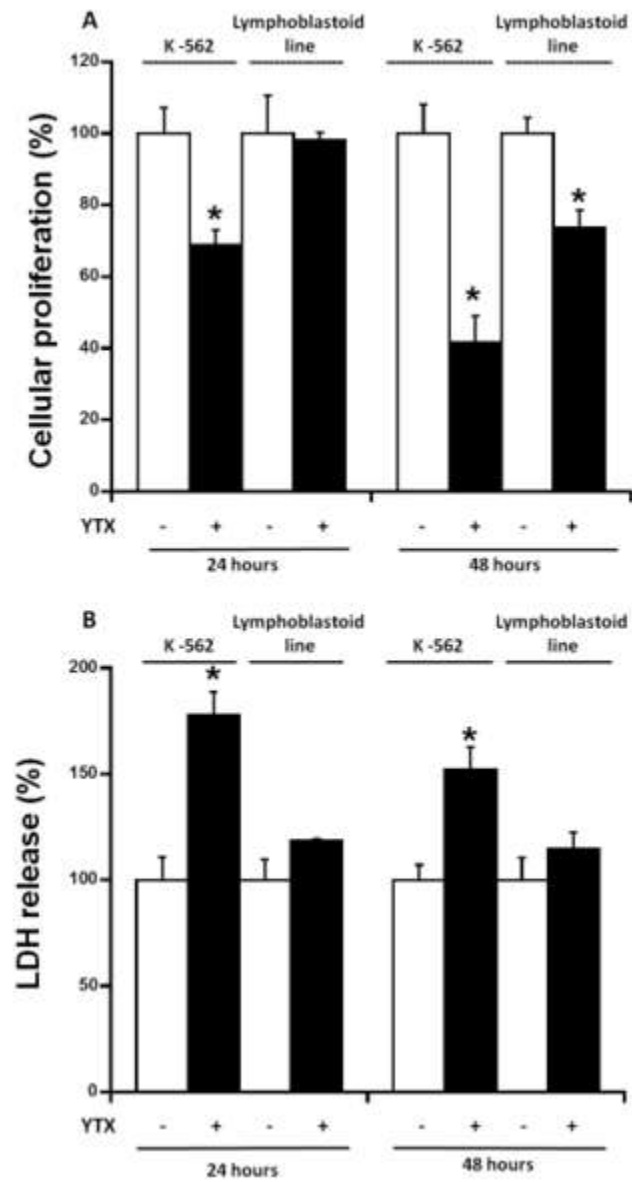


Figure 1

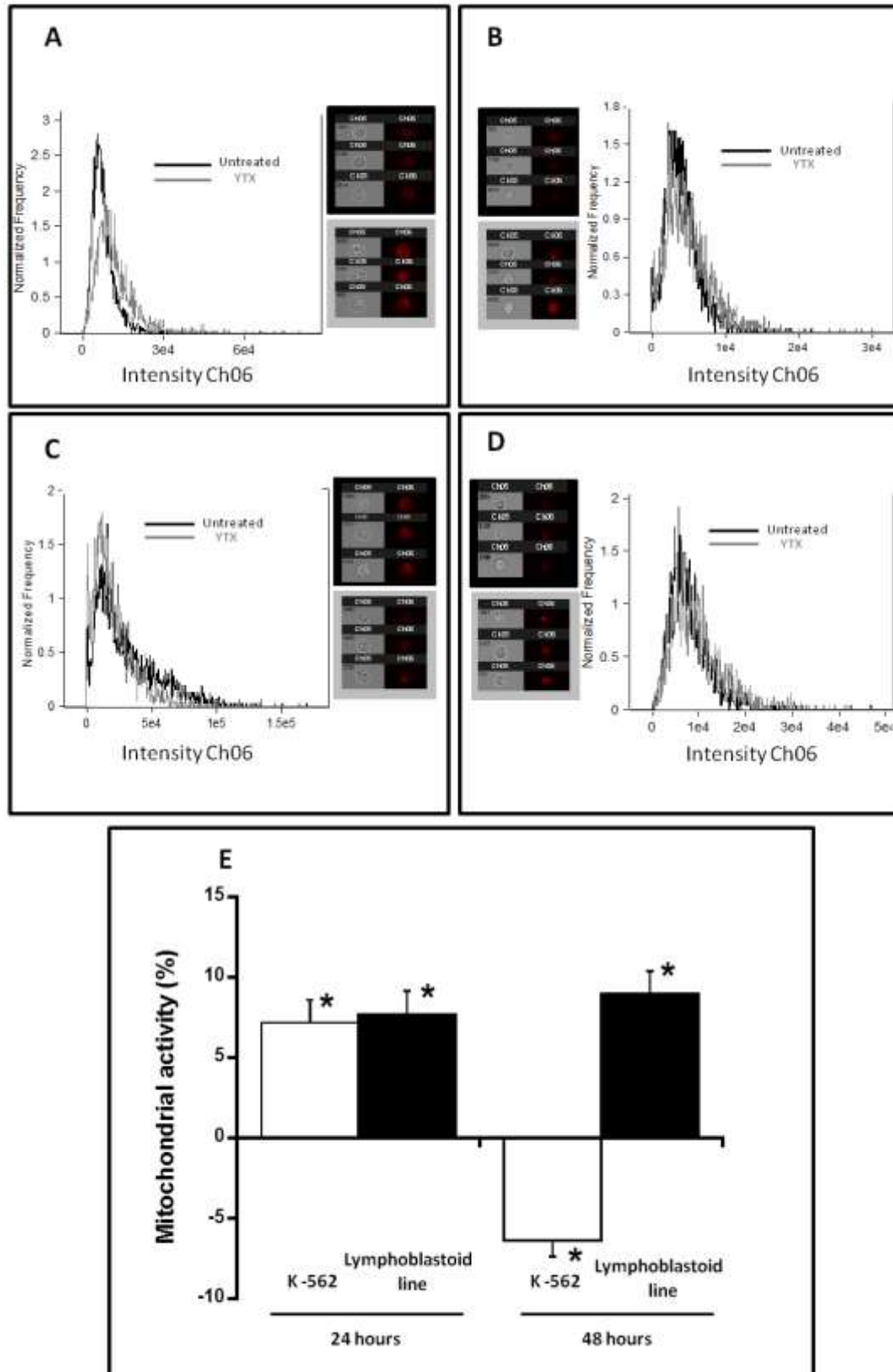


Figure 2

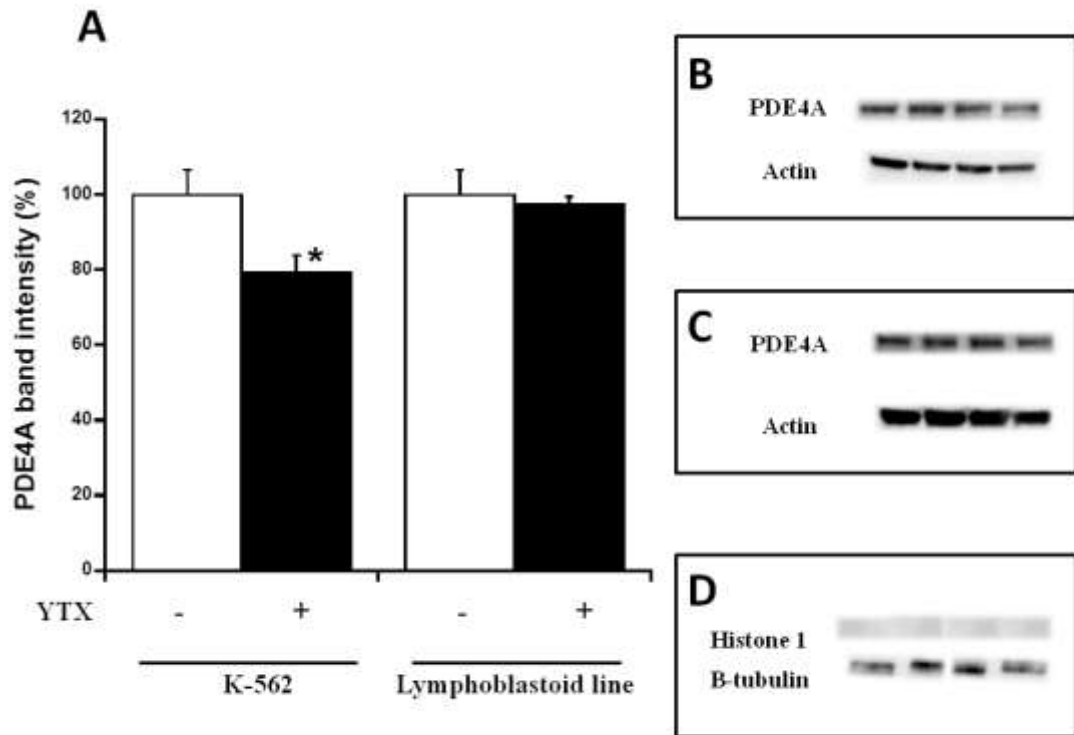


Figure 3

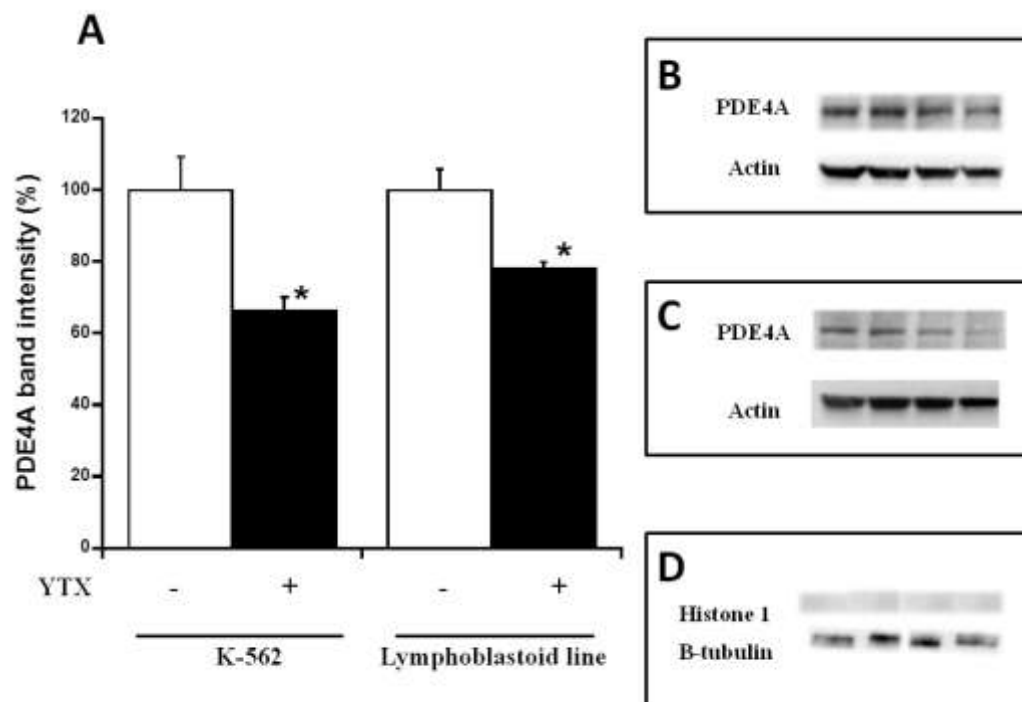


Figure 4

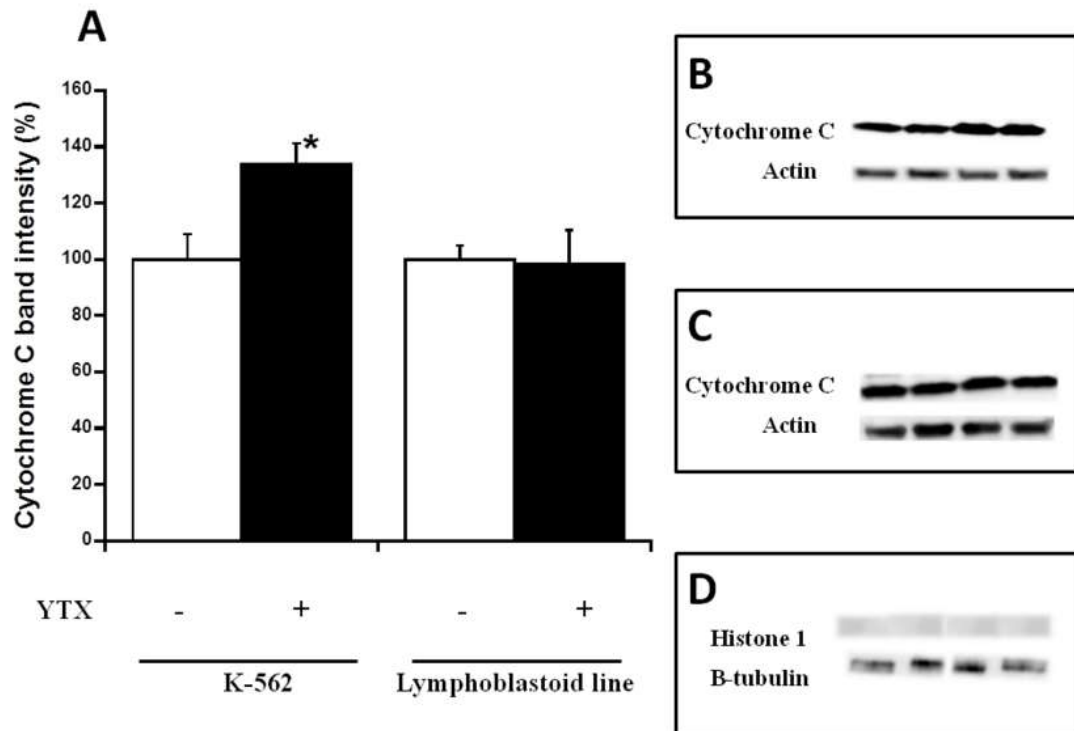


Figure 5

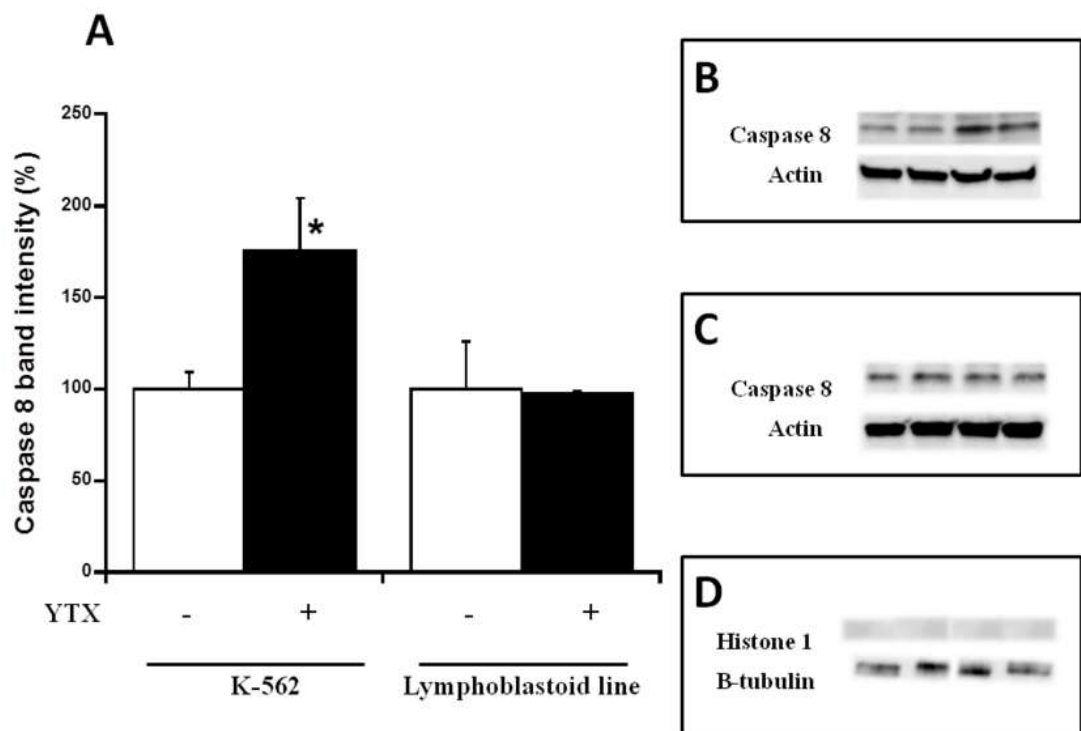


Figure 6

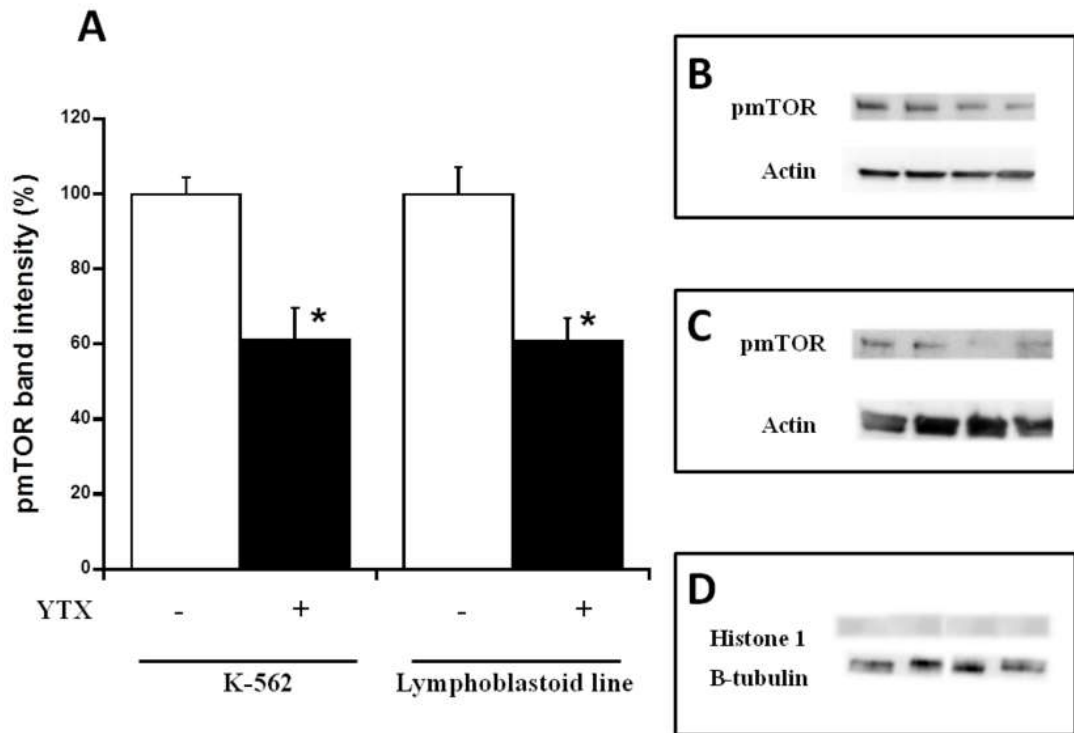


Figure 7



### **3.3 SECCIÓN II: Desarrollo de métodos funcionales de detección de las PLTXs, basados en la unión toxina-diana, y estudio de los parámetros óptimos de crecimiento y producción de toxina en cepas del género *Ostreopsis* sp.**

Los organismos del género *Ostreopsis* sp. se distribuyen ampliamente por diferentes mares y océanos [50, 219, 239], incluidas las costas españolas. En este sentido se han descrito varias HABs en el mar Mediterráneo [210, 216, 246, 350]. Los parámetros favorables para su expansión son variados e incluso contradictorios. En el mar Adriático se ha descrito que las floraciones de *Ostreopsis* sp. son favorecidas por aguas tranquilas [351], mientras que en el mar Mediterráneo aguas más dinámicas favorecen su eclosión [248]. El efecto de la temperatura del agua, la cantidad de nutrientes, la disponibilidad de luz, entre otros, también son parámetros que influyen en el crecimiento de estos organismos, pero se desconoce exactamente de qué manera [248, 351, 352]. Por otro lado, la PLTX muestra una toxicidad elevada, con una LD<sub>50</sub> de 0.3 µg/Kg vía ip en ratón [353]. El análogo más potente de la PLTX, la ostreocina D, tiene una LD<sub>50</sub> de 0.75 µg/Kg [209]. Sin embargo, este grupo de toxinas no está regulado a nivel europeo y el único método de detección validado para las PLTXs es el MBA [229].

La diana de la PLTX es la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa [230]. La capacidad de unión entre la toxina y su diana se utilizó para desarrollar dos métodos de detección funcionales. Uno de los métodos se basa en la inmovilización de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa sobre una superficie de matriz de dextrano CM5. La unión de la bomba inmovilizada y la PLTX se cuantifica con un biosensor de afinidad Biacore X SPR. En el otro método de detección, la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa se marca con fluoresceína, y se cuantifica la unión entre la toxina y la bomba fluorescente midiendo la polarización de la fluorescencia (FP) emitida. La FP varía en función del tamaño de la molécula fluorescente, es decir, según esté o no unida a la PLTX. Finalmente, se estudiaron las condiciones óptimas de crecimiento y producción de toxinas para diferentes cepas del género *Ostreopsis* sp. Se determinó un parámetro nuevo para cuantificar la cantidad de biomasa que representa el crecimiento del cultivo,

pues el contaje de células en esta especie no es un parámetro fiable, ya que obtener una muestra homogénea es muy complicado debido a que estas células crecen en agregados difíciles de disgregar. La cantidad de toxina producida por las cepas de *Ostreopsis* sp. se cuantificó aplicando el método de detección de la FP de compuestos “tipo-PLTX” descrito en esta tesis. También se han cuantificado estas toxinas en muestras de mejillones contaminados de forma natural. Y además se pusieron a punto las condiciones de extracción de las PLTXs en cada caso según el tipo de matriz.

A esta sección corresponden las siguientes publicaciones:

- II.1 Surface plasmon resonance biosensor method for palytoxin detection based on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase affinity.
- II.2 Palytoxin detection and quantification using the fluorescence polarization technique.
- II.3 Warm seawater microalgae: growth and toxic profile of *Ostreopsis* spp. from european coasts.



## II.1 Método de detección de palitoxina basado la afinidad por la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa con un biosensor de superficie resonante de plasmón (SPR)

### Resumen

La palitoxina (PLTX), producida por los dinoflagelados del género *Ostreopsis* fue descubierta, aislada y purificada por primera vez, del coral del género *Palythoa*. La detección de esta toxina en marisco contaminado es esencial para proteger la salud humana. La PLTX posee una gran afinidad por la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa de mamíferos, y tras la unión entre ambos, la bomba se transforma en un canal abierto que estimula la entrada de sodio al interior celular y la salida de potasio. En este trabajo se pone a punto un método de detección basado en la unión entre la PLTX y la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa. El método se desarrolla usando una SPR para monitorizar las reacciones biomoleculares. Esta técnica no requiere el marcaje de ninguno de los componentes. La interacción de la PLTX sobre la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa inmovilizada se cuantifica inyectando diferentes concentraciones de la toxina en el biosensor y comprobando la constante de ratio de unión ( $K_{obs}$ ). Representando  $K_{obs}$  respecto a la concentración de PLTX, se calcula la constante de disociación de equilibrio cinético ( $K_D$ ) para la asociación entre PLTX-bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa. El valor obtenido es  $K_D = 6.38 \times 10^{-7} \pm 6.67 \times 10^{-8}$  M PLTX. Con esta técnica se puede detectar la concentración de la toxina en diferentes muestras. Este método representa una herramienta útil y sencilla para detectar la presencia de compuestos “tipo-PLTX” en productos del mar, usando el mecanismo de acción de estas toxinas y reduciendo así el uso de otras técnicas más caras o de métodos basados en animales.

**Surface plasmon resonance biosensor method for palytoxin detection based on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase:**

<http://www.mdpi.com/2072-6651/6/1/96/htm>



## II.2 Detección y cuantificación de la palitoxina usando la técnica de la polarización de la fluorescencia

### Resumen

La palitoxina (PLTX) es un producto natural marino no peptídico altamente tóxico, con una estructura química compleja. Su mecanismo de acción es a través de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. La FP es una técnica que puede ser utilizada para medir interacciones moleculares. Se basa en que una molécula fluorescente se excita con luz polarizada en un plano y se cuantifica el grado de polarización de la luz emitida cuando la molécula varía de tamaño. En este estudio, la FP fue usada para desarrollar un método de detección basado en la interacción entre el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y la PLTX. La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa se marcó con un reactivo de carboxi-fluoresceín succinimidil-éster, y la FP del conjugado proteína-marcador se midió modificando la cantidad de PLTX en el medio. El protocolo del ensayo se desarrolló primero usando la ouabaina como molécula control de unión. Como resultado se obtuvo una recta que correlaciona las unidades de FP con la concentración de toxina. Con esta recta se pueden cuantificar los equivalentes de PLTX de una muestra natural. También se desarrolló un protocolo selectivo de limpieza para muestras de mejillón y de cultivos de dinoflagelados para eliminar el efecto matriz. El límite de cuantificación (LOQ) para este método es de 10 nM y el límite de detección (LOD) es de 2 nM. Este método nuevo de detección de la PLTX es fácil, rápido y más fiable que otros métodos descritos hasta el momento.

**Palytoxin detection and quantification using the fluorescence polarization technique:**

[http://ac.els-cdn.com/S0003269712001042/1-s2.0-S0003269712001042-main.pdf?\\_tid=dd57d56e-4f9c-11e4-bbbc-00000aab0f02&acdnat=1412849767\\_fec9ba8bf647bd931cf3c8959ac39a15](http://ac.els-cdn.com/S0003269712001042/1-s2.0-S0003269712001042-main.pdf?_tid=dd57d56e-4f9c-11e4-bbbc-00000aab0f02&acdnat=1412849767_fec9ba8bf647bd931cf3c8959ac39a15)



### II.3 Microalgas de aguas cálidas: perfil de crecimiento y toxicidad de *Ostreopsis* sp. de las costas europeas

#### Resumen

La palitoxina (PLTX) es una toxina marina compleja sintetizada por el coral *Palythoa toxica* y por varias especies de dinoflagelados *Ostreopsis* sp. La toxina se une a la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa de la membrana celular. Esta interacción cambia la conformación de la proteína y la convierte en un canal inespecífico. Utilizando la técnica de la FP para cuantificar la concentración de PLTX, se midió la producción de compuestos “tipo-PLTX” en numerosos cultivos de varias cepas de *Ostreopsis ovata* y *Ostreopsis siamensis*. Los cultivos crecieron en condiciones diferentes para estudiar los parámetros óptimos de crecimiento y producción de toxina. El conteo del número de células al final de la fase exponencial es muy complejo debido a que estos microorganismos crecen en agregados densos, difíciles de disgregar. Por ello, se usó el peso del pellet obtenido tras filtración, evitando la pérdida de toxina. Éste es el parámetro más fiable para calcular el crecimiento de los cultivos. Todos los datos de la concentración de toxina obtenidos, fueron referidos a este parámetro. Además la toxicidad de los diferentes cultivos se midió por bioensayo en ratón. En estas condiciones, se observó que los parámetros óptimos de crecimiento para las cepas estudiadas fueron 24°C, 37‰ de salinidad y un fotoperiodo de luz-oscuridad de 16:8. Además, en estas condiciones de crecimiento, las cepas estudiadas también producen mayor cantidad de compuestos “tipo-PLTX” con diferentes perfiles tóxicos.

**Warm seawater microalgae: Growth and toxic profile of *Ostreopsis* spp. from European coasts:**

<http://esciencecentral.org/journals/warm-seawater-microalgae-growth-and-toxic-profile-of-ostreopsis-spp-from-european-coasts-2332-2632-1-104.pdf>





## 4. Discusión

El conocimiento en detalle del mecanismo de acción de las toxinas marinas, permite comprender su funcionamiento y a qué se debe su toxicidad, así como descubrir rutas celulares nuevas envueltas en procesos básicos para la célula. En este contexto se estudian los efectos de la YTX, a pesar de ser un compuesto de baja toxicidad, pues el límite permitido en Europa es de 3,75 mg eq YTX/Kg [160]. Sin embargo, esta toxina despierta interés por sus efectos en procesos alérgicos, como inhibidor tumoral y por su actividad sobre enfermedades neurodegenerativas [354-356]. Se sabe que la YTX activa diferentes tipos de muerte celular programada, principalmente apoptosis, dependiendo de la línea celular [158, 323, 326, 327, 330]. Los daños observados tras la incubación con la YTX, se describen a nivel de mitocondria, por lo que la vía apoptótica que se activa tras la incubación con la toxina, es la vía intrínseca [150, 288, 289]. Además, esta toxina modula los segundos mensajeros,  $Ca^{2+}$  y AMPc, y en el caso de este último se observan efectos opuestos entre células tumorales de la línea K-652 y linfocitos humanos [153, 283, 284, 287]. Las PDEs hidrolizan el AMPc en AMP, y la YTX tiene gran afinidad por algunos isotipos de esta familia de enzimas, por lo tanto se establecen las PDEs como la diana de la YTX [152, 154, 155, 357]. En este contexto, surgió una nueva vía de estudio sobre las rutas que se activan tras la incubación con la toxina, pues la conexión entre las mitocondrias y la diana molecular de la YTX, las PDEs, es un punto clave en su mecanismo de acción. Así se describe la proteína estructural AKAP149 que une tanto la PDE4A como la PKA a la membrana externa de la mitocondria [293, 297], y se estudia su expresión tras la incubación con YTX [287]. Los niveles citosólicos de la AKAP149 guardan relación con la toxicidad inducida por la toxina, pues la disminución de su expresión coincide con una caída de la viabilidad en la línea celular K-562, mientras que los linfocitos humanos no varían su viabilidad tras la incubación con YTX y los niveles de AKAP149 se ven incrementados [287]. En este sentido, el estudio de los diferentes componentes del complejo AKAP149-PKA-PDE4A demuestra que su translocación primero a la membrana plasmática y luego al núcleo, coincide respectivamente con la activación de la apoptosis en las primeras 24 horas y autofagocitosis a las 48 horas, tras la incubación con YTX. En la membrana mitocondrial, la PKA del complejo se activa tras la

unión de dos moléculas de AMPc a las subunidades reguladoras de la molécula liberando las subunidades catalíticas que quedan activadas para fosforilar otras proteínas [294]. En los alrededores de la mitocondria, la PKA cataliza la fosforilación de la proteína pro-apoptótica BAD, de tal modo que queda inactivada y no se puede unir a la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Cuando el complejo se va de la mitocondria, la BAD permanece activa y secuestra a la Bcl-2, y como consecuencia deja abierto el poro mitocondrial desencadenando toda la ruta apoptótica [293, 358]. En la línea K-562 se observa una disminución de la expresión de la proteína Bcl-2, así como un aumento de la forma activa de la caspasa 3 y del citocromo c en el citosol tras 24 horas de incubación con la YTX. Además, también se observa la activación de la apoptosis extrínseca, a través de la activación del DR, ya que hay un aumento de la actividad caspasa 8 así como un incremento de expresión de la forma activa [301]. Esta vía apoptótica no había sido descrita en ninguna línea celular anteriormente, sin embargo en la línea K-562 la activación de la caspasa 8 por el DR puede ocurrir sin la unión de un ligando. La YTX incrementa los niveles de LC3B en el citosol en las primeras 24 horas. Esta proteína aparece cuando se activa la autofagia, pero también está descrita en procesos apoptóticos, en los que puede ser fosforilada por la PKA, que a 24 horas aumenta en el citosol tras el tratamiento con YTX. En este estado fosforilado, la LC3B no desarrolla autofagia, mientras que puede unirse a la cara interna del receptor Fas a través de la Caveolina-1 activando a la caspasa 8 y como consecuencia, la apoptosis extrínseca [359]. Además también ha sido descrito estrés ribotóxico por la YTX, que se relaciona tanto con la apoptosis extrínseca como intrínseca [360]. En cuanto a la presencia del complejo en la membrana plasmática, puede estar interviniendo en procesos de endocitosis, pues se sabe que la PKA inhibe este mecanismo [361]. En este contexto, se observa que el receptor transferrina (TfR), CD71, encargado de introducir el ión hierro al interior celular, y muy abundante en células con elevada tasa de proliferación o tumorales [362], aumenta su expresión en la membrana plasmática tras la incubación con YTX. El aumento de los niveles del CD71 en la membrana plasmática está íntimamente ligado al déficit en su endocitosis que puede llevar a la activación de la apoptosis [363, 364]. Finalmente, tras 24 horas de

incubación con la toxina, no se observa variación de los niveles de la cPKC, mientras que se activa el movimiento de la PKC $\delta$  del núcleo al citosol. Sin embargo, la modulación de estas enzimas por la YTX, no intervienen en la ruta apoptótica que activa. Se puede afirmar, que la activación de la apoptosis tras la incubación con la YTX ocurre tras el movimiento del complejo AKAP149-PKA-PDE4A desde la mitocondria, ya que la silenciamiento de la AKAP149 o la PDE4A1 inhibe la muerte celular de la línea K-562. Además, al silenciar la PDE4A1 se evita que el complejo migre tras el tratamiento con YTX, y se demuestra que la modulación de las cPKC y PKC $\delta$  es también dependiente de la PDE4A1.

Al prolongar la incubación con la toxina durante 48 horas, el complejo aumenta sus niveles en el núcleo y no se observan marcadores apoptóticos. En este contexto, está ampliamente descrita la ruta de activación de la proteína CREB. La PKA se activa en la zona del núcleo, las subunidades catalíticas son liberadas y penetran por difusión a través de la envuelta nuclear para fosforilar la CREB, que en la línea K-562 se convierte en un factor que traduce nuevos genes de diferenciación que transforman las células K-562 en eritrocitos maduros [348]. Los niveles de CREB fosforilada son incrementados por la YTX tras 48 horas. Por ello se apunta a la diferenciación a células no tumorales sin capacidad de replicarse, para explicar la disminución de la viabilidad de las células K-562 tras 48 horas de incubación con YTX sin activarse la apoptosis. Así se observa que a este tiempo, el CD71, un típico marcador de diferenciación a eritrocitos [365], continúa aumentando en la membrana plasmática. Este proceso, puede guardar relación con la apoptosis como ocurre a las 24 horas, sin embargo la inhibición prolongada de la entrada de hierro en la célula, produce un déficit de este ión, que es importante para el metabolismo de las células K-562 [366]. En este contexto se ha descrito que un quelante del hierro disminuye la mTOR activa en la línea K-562 [367]. Al estudiar la autofagia se observa que la forma activa de la mTOR, la mTOR fosforilada, pmTOR, que inhibe la autofagia, disminuye sus niveles, y la proteína LC3B que forma parte de los autofagosomas, incrementa su expresión en la línea K-562 tras la incubación con YTX durante 48 horas. Ambos son marcadores autofágicos por su papel

central en este proceso [306]. Además, recientemente se ha descrito que la YTX activa la autofagia en células de glioma humano, y ya en otros estudios se apuntaba esta posibilidad [330, 368]. En las K-562 la autofagia degenera en la autofagocitosis o tipo II de muerte celular programada, pues la viabilidad celular se reduce significativamente. Este tipo de muerte es inhibido por la caspasa 8 [369], que recupera la actividad normal a las 48 horas, mientras que las 24 primeras horas, cuando la apoptosis está activa, la YTX aumenta la expresión y actividad de dicha caspasa en la línea celular K-562. La activación de la autofagocitosis debido a la incubación con la YTX, también es dependiente de la PDE4A1, pues la expresión de pmTOR y LC3B en el citosol, recuperan sus niveles normales cuando se silencia la PDE4A1 en la línea K-562. Tras 48 horas de tratamiento con la toxina, tanto la cPKC como la PKC $\delta$  disminuyen sus niveles, sin embargo, al igual que en las primeras 24 horas, estas proteínas no son determinantes en la ruta de autofagocitosis activada por la YTX. Y en este caso, la cPKC depende de la PDE4A1 pero de forma independiente a la YTX, pues silenciando la PDE4A1, caen los niveles de la cPKC de igual manera que cuando los niveles de PDE4A en el citosol disminuyen por acción de la YTX. Y la PKC $\delta$  no depende de la PDE4A1, ni interviene en la ruta de la YTX, sin embargo mostró ser una enzima fundamental para la línea celular K-562 que disminuye su viabilidad cuando la PKC $\delta$  es silenciada.

Lo más sorprendente, es que estas rutas de muerte, parecen ser específicas de la línea celular K-562. Si se compara la línea K-562, que representa un modelo tumoral, con algunos resultados obtenidos para linfocitos humanos, que son un modelo no tumoral sin capacidad de dividirse, se observa una toxicidad por parte de la YTX específica del modelo tumoral K-562 [287]. Los resultados obtenidos en uno de los artículos de esta tesis, muestran que la línea celular K-562 tiene alguna particularidad que la diferencia también de la línea linfoblastoide, que representa un modelo no tumoral con capacidad de dividirse [370-372]. A diferencia de las células K-562, la línea linfoblastoide no muestra efecto durante las primeras 24 horas de incubación con la YTX. Sin embargo sí manifiesta activación de la autofagia, cuando el tratamiento se prolonga hasta las 48 horas pero no

autofagocitosis. En este contexto queda pendiente determinar cuál es el punto fundamental que permite que la YTX active las rutas de muerte en la línea K-562, pero no en otros modelos celulares. Una hipótesis, apunta a la isoforma PDE4A que se observa en las membranas de western blot a diferente altura en la línea K-562 y en la línea linfoblastoide. Esta diferencia de peso puede ser debida a una variación estructural que confiere propiedades funcionales a la molécula, como se observa en otros casos tras procesos de fosforilación por ejemplo [236, 373]. Otra posibilidad es que las rutas de apoptosis y autofagia están alteradas en las células tumorales, y la modificación de las mismas, desencadena estos procesos mientras que en células no tumorales, estas rutas son reguladas de otra forma [374, 375].

El estudio en profundidad del mecanismo de acción de las toxinas marinas, puede dar lugar al desarrollo de métodos de detección específicos y selectivos para el compuesto en cuestión. Así, al contrario que la YTX, la PLTX es una molécula altamente tóxica que carece de regulación en Europa y cuyo mecanismo de acción está bien descrito. Las autoridades de seguridad alimentaria en Europa, EFSA, han establecido una ARfD para la PLTX y la ostreocina-D de 0.2 µg/Kg de peso corporal [229]. El problema de esta toxina, es que los dinoflagelados del género *Ostreopsis* sp. que la producen, son especies emergentes que están incrementando su incidencia en regiones más frías por todo el planeta, y no hay sistemas de monitoreo eficientes ni métodos específicos de detección validados a nivel europeo [50, 51, 229]. Se han descrito diferentes métodos, como HPLC, para detectar compuestos “tipo-PLTX” que requieren muchos pasos de limpieza de la muestra para retirar el efecto matriz, por lo que cuantificar muestras naturales es complejo y además requiere que haya disponibilidad de estándar de toxina [376]. Otros métodos funcionales como los ensayos hemolíticos, o citotoxicidad, junto con métodos de inmunodetección, no son aceptados para su uso reglamentario en la detección de estas toxinas por su inespecificidad o reacciones cruzadas [229]. El MBA ha sido usado para la detección de PLTXs, pero además de producir falsos positivos, existe un conflicto ético sobre el uso de animales con estos fines, por lo que se intenta reducir al máximo esta práctica [229]. La diana de la PLTX está bien

definida, y en la presente tesis se optimizaron dos métodos de detección basados en la unión PLTX-bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. En uno de los casos, la toxina se une a su diana sobre una superficie de matriz de dextrano CM5. La bomba se inmoviliza sobre la matriz generando grupos disulfuro reactivos con muchas moléculas. Al añadir la bomba, hay un intercambio del grupo disulfuro de la superficie de dextrano y los grupos tiol de la proteína. Al realizar la inmovilización con grupos amina, la PLTX no se unía, sin embargo con este tipo de unión de la bomba a la matriz, la unión entre PLTX-bomba es muy eficiente. El intercambio entre grupos tiol y disulfuro es muy común en las uniones covalentes de las proteínas [377]. Así mediante el análisis de los datos de la unión entre la toxina y la diana, se obtiene la constante de unión,  $K_{obs}$ , que se representa frente a la concentración de toxina para establecer una recta. Tras la puesta a punto del método se cuantificaron muestras naturales contaminadas, de forma eficiente, con protocolos de limpieza sencillos, además de extraer la toxina de cultivos que la producen y comparándolos con cultivos que no producen compuestos “tipo-PLTX”. El hecho de no tener que realizar ningún tipo de marcaje fluorescente a las moléculas simplifica el método.

El otro método puesto a punto, también requiere de la unión entre la PLTX y su diana, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. En este caso es necesario marcar la bomba con fluoresceína que se excitará con FP y emitirá una cantidad de FP dependiendo del volumen de la molécula. En este caso también se puede desarrollar una recta que enfrente unidades de FP vs concentración de PLTX, de donde calcularemos la concentración de muestras mediante la cantidad de la FP que emita. Mientras que para la detección con el biosensor de afinidad, la LOD es de 3,73 pg y la LOQ es de 11.2 pg, para la técnica de la FP es de 2 nM y 10 nM, respectivamente.

Ambos métodos son específicos, rápidos, sensibles y sencillos, con una elevada capacidad de reproducibilidad y bajo efecto matriz. Al cuantificar las mismas muestras por los dos métodos se obtienen concentraciones de PLTX muy semejantes, lo que da fiabilidad a los resultados.

Finalmente, como ya se comentó, las especies productoras de compuestos “tipo-PLTX” están incrementando su incidencia por diferentes zonas del planeta. En las costas europeas han ocurrido diferentes episodios de HABs con especies del género *Ostreopsis* sp. [239, 378], y en concreto en el mar Mediterráneo se recogen diversos registros de este hecho [247, 379, 380]. Sin embargo, el sistema de monitoreo de estas especies, no es el adecuado, puesto que para determinar la concentración o cantidad de microorganismos, se realiza el conteo de células de muestras de la columna de agua [381, 382]. Este sistema de conteo no es representativo de la concentración real que hay, ya que estas células crecen adheridas a superficies y formando agregados mucilaginosos muy difíciles de disgregar [58, 59]. En algunos casos, se usa HCl para contribuir a la homogénea disgregación de las células [55, 383]. Esta técnica es eficiente, ya que el conteo realizado de las cepas A y B de *O. ovata* y *O. siamensis* tras el tratamiento con HCl, guarda relación con la cantidad de masa de pellet usada para medir el crecimiento del cultivo. No obstante, el ácido puede generar daños a las células, que puede ocasionar problemas en caso de necesitar mantener la integridad celular. En este sentido, el peso del pellet tras procesos de filtración es un buen sistema que recoge la totalidad de la masa biológica, a pesar de que queden restos de sustancias mucilaginosa, ya que serán proporcionales a la cantidad de biomasa que haya. En cuanto a las condiciones de cultivo, las tres cepas estudiadas prefieren temperaturas más altas, 24°C, lo que guarda relación con su origen tropical, y coincide además con los registros de mareas rojas en los que mayormente la temperatura del agua superaba los 25°C [384]. La salinidad a la que las cepas estudiadas de *Ostreopsis* sp. registran mayor crecimiento y mayor producción de compuestos “tipo-PLTX” es a 37‰, mejor que a 42‰. En este sentido salinidades del 37-38‰ e incluso bajando al 33‰, son beneficiosas para estos organismos [248, 385]. Además cabe destacar que la toxicidad *in vivo* de los cultivos junto con los resultados de crecimiento y producción de toxina, demuestra que las cepas de *O. ovata* son más tóxicas, producen mayor toxina y crecen más, que los cultivo de *O. siamensis*. Los compuestos que producen las especies estudiadas, son entre 40 y 200 veces menos potentes que el estándar de PLTX utilizado en el MBA. Sin embargo, en la

literatura, se establece la ostreocina-D, producida por *O. siamensis* como el análogo de la PLTX más potente, y las ovatoxinas producidas por *O. ovata* son menos tóxicas [218, 223]. En este sentido, las cepas a partir de las cuales se desarrollaron los cultivos en el laboratorio son diferentes a las de origen tropical, pudiendo sufrir cambios adaptativos a lo largo de los años o ser un cambio inherente a la cepa.





## 5. Conclusiones

1. La YTX modula los niveles del complejo mitocondrial AKAP149-PKA-PDE4A a través de la PDE4A1.
2. La localización del complejo AKAP149-PKA-PDE4A determina qué tipo de muerte celular activa la YTX: primero aumenta los niveles del complejo en la membrana plasmática e induce apoptosis y más tarde los niveles en el núcleo y se activa la autofagocitosis.
3. La YTX regula las PKCs de un modo no esencial para la muerte celular que desencadena.
4. Los efectos de la YTX sobre las rutas de muerte celular, son independientes de la capacidad mitótica: es tóxica en la línea tumoral K-562, pero no en la línea linfoblastoide.
5. La cuantificación de la unión entre las PLTXs y la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa con polarización de fluorescencia es un método sensible, sencillo, y rápido para detectar la presencia de estas toxinas en muestras contaminadas.
6. La cuantificación de la unión entre la PLTX y la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa con un biosensor SPR, es un método selectivo y rápido para detectar la presencia de estas toxinas en muestras contaminadas.
7. Las condiciones óptimas de crecimiento y producción de PLTX para las cepas de *Ostreopsis ovata* y *O. siamensis* son 24°C, 37 ‰ de salinidad y ciclos de luz:oscuridad de 16:8.
8. El peso del residuo tras filtrar los cultivos del género *Ostreopsis* sp. es el parámetro más fiable para medir su crecimiento.



## 6. Bibliografía

1. Bramwell B: **Mass tourism, diversification and sustainability in southern Europe's coastal regions**. In: *Coastal mass tourism: Diversification and sustainable development in southern Europe*. Edited by Bramwell B. Clevedon: Multilingual matters Ltd.; 2004: 1-31.
2. Morrissey K, O'Donoghue C: **The Irish marine economy and regional development**. *Marine Policy* 2012, **36**(2):358-364.
3. Smaal AC: **European mussel cultivation along the Atlantic coast: production status, problems and perspectives**. *Hydrobiologia* 2002, **484**(1-3):89-98.
4. Figueiras FG, Labarta U, Fernández Reiriz MJ: **Coastal upwelling, primary production and mussel growth in the Rías Baixas of Galicia**. *Hydrobiologia* 2002, **484**(1-3):121-131.
5. Fraga F: **Oceanografía física: El afloramiento marino**. In: *Estudio y explotación del mar en Galicia*. Edited by Compostela UdSd, First edn: Secretariado de publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela; 1979: 73-99.
6. Fraga F: **Upwelling off the Galician Coast, Northwest Spain**. In: *Coastal Upwelling*. American Geophysical Union; 1981: 176-182.
7. Rodríguez Rodríguez G, Villasante S, do Carme García-Negro M: **Are red tides affecting economically the commercialization of the Galician (NW Spain) mussel farming?** *Marine Policy* 2011, **35**(2):252-257.
8. Glibert PM, Anderson DM, Gentien P, Granéli E, Sellner KG: **The global, complex phenomena of harmful algal blooms**. *Oceanography* 2005, **18**(2):136-147.
9. Davidson K, Tett P, Gowen R: **Harmful Algal Blooms**. In: *Marine Pollution and Human Health*. The Royal Society of Chemistry; 2011: 95-127.
10. Garcia C, Mardones P, Sfeir A, Lagos N: **Simultaneous presence of paralytic and diarrhetic shellfish poisoning toxins in *Mytilus chilensis* samples collected in the Chiloe Island, Austral Chilean fjords**. *Biol Res* 2004, **37**(4 Suppl A):721-731.
11. Li A, Ma J, Cao J, McCarron P: **Toxins in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) associated with diarrhetic shellfish poisoning episodes in China**. *Toxicon* 2012, **60**(3):420-425.
12. Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, Furey A, McMahon T, Silke J, Yasumoto T: **Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis***. *Journal of the American Chemical Society* 1998, **120**:9967-9968.
13. Holmes MJ, Brust A, Lewis RJ: **Dinoflagellate Toxins: An Overview**. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 3-38.

14. Pitcher GC, Franco JM, Doucette GJ, Powell CL, Mouton A: **Paralytic shellfish poisoning in the abalone *Haliotis midae* on the west coast of South Africa.** *Journal of Shellfish Research* 2001, **20 (2)**:895-904.
15. Seki T, Satake M, Mackenzie L, Kaspar HF, Yasumoto T: **Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp.** *Tetrahedron Letters* 1995, **36(39)**:7093-7096.
16. Oikawa H, Fujita T, Satomi M, Suzuki T, Kotani Y, Yano Y: **Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in the edible shore crab *Telmessus acutidens*.** *Toxicon* 2002, **40(11)**:1593-1599.
17. Ferreira M, Lago J, Vieites JM, Cabado AC: **World production of bivalve mollusks and socioeconomic facts related to the impact of marine biotoxins.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 291-312.
18. Wright JLC, Cembella AD: **Ecophysiology and biosynthesis of polyether marine biotoxins.** In: *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Edited by Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM. Heidelberg: Springer-Verlag; 1998: 427-452.
19. Falkowski PG, Barber RT, Smetacek VV: **Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production.** *Science* 1998, **281(5374)**:200-207.
20. Ramaraj R, Tsai dDW, Chen PH: **Freshwater microalgae niche of air carbon dioxide mitigation.** *Ecological Engineering* 2014, **68(0)**:47-52.
21. Ritschard RL: **Marine algae as a CO<sub>2</sub> sink.** *Water Air Soil Pollut* 1992, **64(1-2)**:289-303.
22. Zamyadi A: **Emerging Toxic Cyanobacterial Issues in Freshwater Sources: Influence of Climate Change.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 105-120.
23. Cardozo KH, Guaratini T, Barros MP, Falcao VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P *et al*: **Metabolites from algae with economical impact.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007, **146(1-2)**:60-78.
24. Brand LE: **Toxic harmful algal blooms: natural and anthropogenic causes.** In: *New trends in marine and freshwater toxins: food and safety concerns*. Edited by Cabado AG, Vieites JM. New York: Nova Science Publishers; 2012: 19-51.
25. Margalef R: **Life forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment.** *Oceanologica acta* 1978, **1**:493-509.
26. Cullen JJ, MacIntyre JG: **Behavior, physiology and the niche of depth-regulating phytoplankton.** In: *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Edited by Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM, vol. G 41. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1998: 559-580.

27. Anderson DM, Glibert PM, Burkholder JM: **Harmful Algal Blooms and Eutrophication: Nutrient Sources, Composition, and Consequences.** *Estuaries* 2002, **25**:704–726.
28. Glibert PM, Icarus Allen J, Artioli Y, Beusen A, Bouwman L, Harle J, Holmes R, Holt J: **Vulnerability of coastal ecosystems to changes in harmful algal bloom distribution in response to climate change: projections based on model analysis.** *Glob Chang Biol* 2014.
29. Otero P, Perez S, Alfonso A, Vale C, Rodriguez P, Gouveia NN, Gouveia N, Delgado J, Vale P, Hiram M *et al*: **First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe).** *Anal Chem* 2010, **82**(14):6032-6039.
30. Heisler J, Glibert PM, Burkholder JM, Anderson DM, Cochlan W, Dennison WC, Dortch Q, Gobler CJ, Heil CA, Humphries E *et al*: **Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus.** *Harmful Algae* 2008, **8**(1):3-13.
31. Tillmann U, Elbrächter M, Krock B, John U, Cembella A: **Azadinium spinosum gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins.** *European Journal of Phycology* 2009, **44**(1):63-79.
32. Tillmann U, Salas R, Jauffrais T, Hess P, Silke J: **AZA: The producing organisms—Biology and trophic transfer.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 773-798.
33. Díaz P, Molinet C, Cáceres MA, Valle-Levinson A: **Seasonal and intratidal distribution of Dinophysis spp. in a Chilean fjord.** *Harmful Algae* 2011, **10**(2):155-164.
34. Draisci R, Lucentini L, Giannetti L, Boria P, Poletti R: **First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (Dinophysis fortii) related to seafood poisoning in Europe.** *Toxicon* 1996, **34**(8):923-935.
35. Reyes JG, Sánchez-Cárdenas C, Acevedo-Castillo W, Leyton P, López-González I, Felix R, Gandini MA, Treviño MB, Treviño CL: **Maitotoxin: An enigmatic toxic molecule with useful applications in the biomedical sciences.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 677-694.
36. Vetter I, Zimmermann K, Lewis RJ: **Ciguatera Toxins: Pharmacology, Toxicology, and Detection.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 925-950.
37. Xu Y, Richlen ML, Morton SL, Mak YL, Chan LL, Tekiau A, Anderson DM: **Distribution, abundance and diversity of Gambierdiscus spp. from a ciguatera-endemic area in Marakei, Republic of Kiribati.** *Harmful Algae* 2014, **34**(0):56-68.
38. Aasen JAB, Hardstaff W, Aune T, Quilliam MA: **Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006, **20**(10):1531-1537.

39. Cembella AD, Lewis NI, Quilliam MA: **Spirolide composition of micro-extracted pooled cells isolated from natural plankton assemblages and from cultures of the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii***. *Natural Toxins* 1999, **75**:197-206.
40. Lu CK, Lee GH, Huang R, Chou HN: **Spiro-prorocentrimine, a novel macrocyclic lactone from a benthic *Prorocentrum* sp. of Taiwan**. *Tetrahedron Letters* 2001, **42**(9):1713-1716.
41. Molgó J, Aráoz R, Benoit E, Iorga IB: **Cyclic imine toxins: Chemistry, origin, metabolism, pharmacology, toxicology, and detection**. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 951-990.
42. Schantz EJ: **Historical Perspective on Paralytic Shellfish Poison**. In: *Seafood Toxins*. vol. 262: American Chemical Society; 1984: 99-111.
43. Taylor FJR, Fukuyo Y, Larsen J, Hallegraeff GM: **Taxonomy of harmful dinoflagellates**. In: *Manual on harmful marine microalgae*. Edited by Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD. Paris: UNESCO; 2004: 389-432.
44. Anderson DM, Alpermann TJ, Cembella AD, Collos Y, Masseret E, Montresor M: **The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health**. *Harmful Algae* 2012, **14**(0):10-35.
45. Anderson DM: **Distribution of HABs throughout the World**. In.; 2007.
46. Ajani P, Murray S, Hallegraeff GM, Lundholm N, Gillings M, Brett S, Armand L: **The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New South Wales, Australia: morphotaxonomy, molecular phylogeny, toxicity, and distribution**. *Journal of Phycology* 2013, **49**(4):765-785.
47. Bates SS, Bird CJ, Freitas ASWd, Foxall R, Gilgan M, Hanic LA, Johnson GR, McCulloch AW, Odense P, Pocklington R *et al*: **Pennate Diatom *Nitzschia pungens* as the Primary Source of Domoic Acid, a Toxin in Shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada**. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 1989, **46**(7):1203-1215.
48. Kotaki Y, Koike K, Sato S, Ogata T, Fukuyo Y, Kodama M: **Confirmation of domoic acid production of *Pseudo-nitzschia multiseriis* isolated from Ofunato Bay, Japan**. *Toxicon* 1999, **37**(4):677-682.
49. Kotaki Y, Koike K, Yoshida M, Van Thuoc C, Huyen NTM, Hoi NC, Fukuyo Y, Kodama M: **Domoic acid production in *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae) isolated from a shrimp-culture pond in do son, Vietnam**. *Journal of Phycology* 2000, **36**(6):1057-1060.
50. Shears NT, Ross PM: **Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide**. *Harmful Algae* 2009, **8**(6):916-925.

51. Rhodes L: **World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt.** *Toxicon* 2011, **57**(3):400-407.
52. Tawong W, Nishimura T, Sakanari H, Sato S, Yamaguchi H, Adachi M: **Distribution and molecular phylogeny of the dinoflagellate genus *Ostreopsis* in Thailand.** *Harmful Algae* 2014, **37**(0):160-171.
53. Totti C, Accoroni S, Cerino F, Cucchiari E, Romagnoli T: ***Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata.** *Harmful Algae* 2010, **9**(2):233-239.
54. Cohu S, Thibaut T, Mangialajo L, Labat JP, Passafiume O, Blanfuné A, Simon N, Cottalorda JM, Lemée R: **Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean).** *Marine Pollution Bulletin* 2011, **62**(12):2681-2691.
55. Guerrini F, Pezzolesi L, Feller A, Riccardi M, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Tartaglione L, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M *et al*: **Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas.** *Toxicon* 2010, **55**(2-3):211-220.
56. Vale C, Ares IR: **Biochemistry of palytoxins and ostreocins.** In: *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry*. Edited by Botana LM, First edn. Iowa: Blackwell; 2007.
57. Battocchi C, Totti C, Vila M, Masó M, Capellacci S, Accoroni S, Reñé A, Scardi M, Penna A: **Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy.** *Marine Pollution Bulletin* 2010, **60**(7):1074-1084.
58. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Benedettini G, Onorari M, Serena F, Battocchi C *et al*: **First Finding of *Ostreopsis* cf. *ovata* Toxins in Marine Aerosols.** *Environmental Science & Technology* 2014, **48**(6):3532-3540.
59. Honsell G, Bonifacio A, De Bortoli M, Penna A, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Sosa S, Yasumoto T *et al*: **New Insights on Cytological and Metabolic Features of *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo (Dinophyceae): A Multidisciplinary Approach.** *PLoS ONE* 2013, **8**(2):e57291.
60. Baden KG, Trainer VL: **Mode of action of toxins of seafood poisoning.** In: *Algal toxins in seafood and drinking water*. Edited by Falconer IA. London: Academic Press; 1993: 49-74.
61. Gestal JJ: **Epidemiology of Marine Toxins.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 123-196.
62. FAO: **Marine biotoxins.** 2004, **80**.

63. Van Dolah F: **Diversity of marine and freshwater algal toxins**. In: *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology and detection*. Edited by Botana LM. New York: Marcel Dekker; 2000: 19–43.
64. Hess P: **Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, **397**(5):1683-1694.
65. Ramsdell JS: **The molecular and integrative basis to domoic acid toxicity**. In: *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry*. Edited by Botana LM, First edn. Iowa: Blackwell; 2007.
66. Hampson DR, Manalo JL: **The activation of glutamate receptors by kainic acid and domoic acid**. *Natural Toxins* 1998, **6**(3-4):153-158.
67. Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G: **Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system**. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2012, **100**(4):656-664.
68. Choi DW: **Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system**. *Neuron* 1988, **1**(8):623-634.
69. Berman FW, LePage KT, Murray TF: **Domoic acid neurotoxicity in cultured cerebellar granule neurons is controlled preferentially by the NMDA receptor Ca<sup>2+</sup> influx pathway**. *Brain Research* 2002, **924**(1):20-29.
70. Pulido OM: **Domoic acid toxicologic pathology: a review**. *Mar Drugs* 2008, **6**(2):180-219.
71. Zaman L, Arakawa O, Shimosu A, Onoue Y, Nishio S, Shida Y, Noguchi T: **Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata***. *Toxicon* 1997, **35**(2):205-212.
72. Meda M, Kodama T, Tanaka T, Yoshizumi H, Takemoto T, Nomoto K, Fujita T: **Structures of isodomoic acids A, B and C, novel insecticidal amino acids from the red alga *Chondria armata***. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1986, **34**:4892-4895.
73. Vale C: **Domoic Acid: Chemistry and Pharmacology**. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 875-894.
74. Perl TM, Bedard L, Kosatsky T, Hockin JC, Todd EC, Remis RS: **An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid**. *N Engl J Med* 1990, **322**(25):1775-1780.
75. Quilliam MA, Wright JL: **The amnesic shellfish poisoning mystery**. *Anal Chem* 1989, **61**(18):1053A-1106A.
76. Wright JLC, Boyd RK, Freitas ASWd, Falk M, Foxall RA, Jamieson WD, Laycock MV, McCulloch AW, McInnes AG, Odense P *et al*: **Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island**. *Canadian Journal of Chemistry* 1989, **67**(3):481-490.

77. Jeffery B, Barlow T, Moizer K, Paul S, Boyle C: **Amnesic shellfish poison**. *Food Chem Toxicol* 2004, **42**(4):545-557.
78. Teitelbaum JS, Zatorre RJ, Carpenter S, Gendron D, Evans AC, Gjedde A, Cashman NR: **Neurologic Sequelae of Domoic Acid Intoxication Due to the Ingestion of Contaminated Mussels**. *New England Journal of Medicine* 1990, **322**(25):1781-1787.
79. EFSA, Authority EFS: **Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain**. *The EFSA Journal* 2009, **1181**:1-61.
80. Otero P, Rodriguez P: **Marker Compounds, Relative Response Factors, and Toxic Equivalent Factors**. In: *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 57-76.
81. Vale P: **Saxitoxin and Analogs: Ecobiology, Origin, Chemistry, and Detection**. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 991-1012.
82. Schantz EJ, Ghazarossian VE, Schnoes HK, Strong FM, Springer JP, Pezzanite JO, Clardy J: **Structure of saxitoxin**. *Journal of the American Chemical Society* 1975, **97**(5):1238-1239.
83. Hallegraeff GM, Blackburn SI, Doblin MA, Bolch CJS: **Global toxicology, ecophysiology and population relationships of the chainforming PST dinoflagellate *Gymnodinium catenatum***. *Harmful Algae* 2012, **14**(0):130-143.
84. Lilly EL, Halanych KM, Anderson DM: **Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae)**. *Journal of Phycology* 2007, **43**:1329–1338.
85. Usup G, Ahmad A, Matsuoka K, Lim PT, Leaw CP: **Biology, ecology and bloom dynamics of the toxic marine dinoflagellate *Pyrodinium bahamense***. *Harmful Algae* 2012, **14**(0):301-312.
86. Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, Moffitt MC, Neilan BA: **Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs**. *Marine Drugs* 2010, **8**(7):2185-2211.
87. Kodama M, Sato S: **Metabolism of Paralytic Shellfish Toxins incorporated into bivalves**. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM, Second edn. Boca Raton: CRC Press; 2008: 229-253.
88. Sagou R, Amanhir R, Taleb H, Vale P, Blaghen M, Loutfi M: **Comparative study on differential accumulation of PSP toxins between cockle (*Acanthocardia tuberculatum*) and sweet clam (*Callista chione*)**. *Toxicon* 2005, **46**(6):612-618.
89. Vale P: **Metabolites of saxitoxin analogues in bivalves contaminated by *Gymnodinium catenatum***. *Toxicon* 2010, **55**(1):162-165.

90. Bravo I, Reyero MI, Cacho E, Franco JM: **Paralytic shellfish poisoning in *Haliotis tuberculata* from the Galician coast: geographical distribution, toxicity by lengths and parts of the mollusc.** *Aquatic Toxicology* 1999, **46**(2):79-85.
91. Oikawa H, Fujita T, Saito K, Watabe S, Satomi M, Yano Y: **Comparison of paralytic shellfish poisoning toxin between carnivorous crabs (*Telmessus acutidens* and *Charybdis japonica*) and their prey mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in an inshore food chain.** *Toxicon* 2004, **43**(6):713-719.
92. Faber S: **Saxitoxin and the induction of paralytic shellfish poisoning.** *Journal of Young Investigators* 2012, **23**(1):1-7.
93. EFSA, Authority EFS: **Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain** *The EFSA Journal* 2009, **1019**:1-76.
94. Botana LM, Vilariño N, Alfonso A, Vale C, Louzao MC, Elliott CT, Campbell K, Botana AM: **The problem of toxicity equivalent factors in developing alternative methods to animal bioassays for marine-toxin detection.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2010, **29**(11):1316-1325.
95. Economou V, Papadopoulou C, Brett M, Kansouzidou A, Charalabopoulos K, Filioussis G, Seferiadis K: **Diarrhetic shellfish poisoning due to toxic mussel consumption: The first recorded outbreak in Greece.** *Food Additives and Contaminants* 2007, **24**(3):297–305.
96. Lee JS, Igarashi T, Fraga S, Dahl E, Hovgaard P, Yasumoto T: **Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species.** *J Appl Phycol* 1989, **1**(2):147-152.
97. Quilliam MA: **Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection.** *J AOAC Int* 1995, **78**(2):555-570.
98. Cruz PG, Fernandez JJ, Norte M, Daranas AH: **Belizeanic acid: a potent protein phosphatase 1 inhibitor belonging to the okadaic acid class, with an unusual skeleton.** *Chemistry* 2008, **14**(23):6948-6956.
99. Fernandez-Sanchez MT, Cabrera-Garcia D, Ferrero-Gutierrez A, Perez-Gomez A, Cruz PG, Daranas AH, Fernandez JJ, Norte M, Novelli A: **Comparative toxicological study of the novel protein phosphatase inhibitor 19-Epi-okadaic acid in primary cultures of rat cerebellar cells.** *Toxicol Sci* 2013, **132**(2):409-418.
100. Bialojan C, Takai A: **Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics.** *Biochem J* 1988, **256**(1):283-290.
101. Tubaro A, Sosa S, Bornancin A, Hungerford J: **Pharmacology and toxicology of diarrhetic shellfish toxins.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM, Second edn. Boca Raton: CRC Press; 2008: 229-253.

102. Takai A, Murata M, Torigoe K, Isobe M, Mieskes G, Yasumoto T: **Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship.** *Biochem J* 1992, **284 ( Pt 2)**:539-544.
103. Huhn J, Jeffrey PD, Larsen K, Rundberget T, Rise F, Cox NR, Arcus V, Shi Y, Miles CO: **A structural basis for the reduced toxicity of dinophysistoxin-2.** *Chem Res Toxicol* 2009, **22(11)**:1782-1786.
104. Vale P: **Chemistry of diarrhetic shellfish poisoning toxins.** In: *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry.* Edited by Botana LM, First edn. Iowa: Blackwell; 2007.
105. García C, Truan D, Lagos M, Santelices JP, Díaz JC, Lagos N: **Metabolic transformation of dinophysistoxin-3 into dinophysistoxin-1 causes human intoxication by consumption of O-acyl-derivatives dinophysistoxins contaminated shellfish.** *J Toxicol Sci* 2005, **30(4)**:287-296.
106. Toyofuku H: **Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report).** *Mar Pollut Bull* 2006, **52(12)**:1735-1745.
107. Suganuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, Ojika M, Wakamatsu K, Yamada K, Sugimura T: **Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85(6)**:1768-1771.
108. Fujiki H, Suganuma M: **Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters.** *J Cancer Res Clin Oncol* 1999, **125(3-4)**:150-155.
109. EFSA, Authority EFS: **Marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain** *The EFSA Journal* 2008, **589**:1-62
110. Anonymous: **Commission regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs.** *Official Journal* 2011, **L6**:3–6.
111. Campàs M, Marty JL: **Enzyme sensor for the electrochemical detection of the marine toxin okadaic acid.** *Analytica Chimica Acta* 2007, **605(1)**:87-93.
112. Vieytes MR, Fontal OI, Leira F, de Sousa JMVB, Botana LM: **A Fluorescent Microplate Assay for Diarrhetic Shellfish Toxins.** *Analytical Biochemistry* 1997, **248(2)**:258-264.
113. Holland PT: **Analysis of marine toxins-Techniques, method validation, calibration standards and screening methods.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM, Second edn. Boca Raton: CRC Press; 2008: 21-49.

114. McNabb P: **Chemistry, metabolism, and chemical analysis of okadaic acid group toxins**. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM, Second edn. Boca Raton: CRC Press; 2008: 209-228.
115. Twiner MJ, Rehmann N, Hess P, Doucette GJ: **Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts**. *Mar Drugs* 2008, **6**(2):39-72.
116. Krock B, Tillmann U, John U, Cembella AD: **Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea**. *Harmful Algae* 2009, **8**(2):254-263.
117. Hess P, McCarron P, Krock B, Kilcoyne J, Miles CO: **Azaspiracids: Chemistry, Biosynthesis, Metabolism, and Detection**. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 799-822.
118. Twiner MJ, Hess P, Doucette GJ: **Azaspiracids: Toxicology, Pharmacology, and Risk Assessment**. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 824-856.
119. Twiner MJ, Ryan JC, Morey JS, Smith KJ, Hammad SM, Van Dolah FM, Hess P, McMahan T, Satake M, Yasumoto T *et al*: **Transcriptional profiling and inhibition of cholesterol biosynthesis in human T lymphocyte cells by the marine toxin azaspiracid**. *Genomics* 2008, **91**(3):289-300.
120. Ronzitti G, Hess P, Rehmann N, Rossini GP: **Azaspiracid-1 Alters the E-cadherin Pool in Epithelial Cells**. *Toxicological sciences* 2007, **95**(2):427-435.
121. Alfonso A, Román Y, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T, Botana LM: **Azaspiracid-4 inhibits Ca<sup>2+</sup> entry by stored operated channels in human T lymphocytes**. *Biochemical Pharmacology* 2005, **69**(11):1627-1636.
122. Alfonso A, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Nicolaou KC, Frederick MO, Botana LM: **Azaspiracids modulate intracellular pH levels in human lymphocytes**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, **346**(3):1091-1099.
123. Román Y, Alfonso A, Louzao MC, de la Rosa LA, Leira F, Vieites JM, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T *et al*: **Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets**. *Cellular Signalling* 2002, **14**(8):703-716.
124. Román Y, Alfonso A, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T, Botana LM: **Effects of Azaspiracids 2 and 3 on Intracellular cAMP, [Ca<sup>2+</sup>], and pH**. *Chemical Research in Toxicology* 2004, **17**(10):1338-1349.
125. Vale C, Nicolaou KC, Frederick MO, Gómez-Limia B, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM: **Effects of Azaspiracid-1, A Potent Cytotoxic Agent, on Primary Neuronal Cultures. A Structure-Activity Relationship Study**. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006, **50**(2):356-363.

126. Cao Z, LePage KT, Frederick MO, Nicolaou KC, Murray TF: **Involvement of caspase activation in azaspiracid-induced neurotoxicity in neocortical neurons.** *Toxicol Sci* 2010, **114**(2):323-334.
127. Twiner MJ, Doucette GJ, Rasky A, Huang XP, Roth BL, Sanguinetti MC: **Marine Algal Toxin Azaspiracid Is an Open-State Blocker of hERG Potassium Channels.** *Chemical Research in Toxicology* 2012, **25**(9):1975-1984.
128. McMahon T, Silke J: **Winter toxicity of unknown aetiology in mussels.** *Harmful Algae News* 1996, **14**: 2.
129. EFSA, Authority EFS: **Marine biotoxins in shellfish – Azaspiracid group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain** *The EFSA Journal* 2008, **723**:1-52.
130. Poli MA, Musser SM, Dickey RW, Eilers PP, Hall S: **Neurotoxic shellfish poisoning and brevetoxin metabolites: a case study from Florida.** *Toxicon* 2000, **38**(7):981-993.
131. Kirkpatrick B, Fleming LE, Squicciarini D, Backer LC, Clark R, Abraham W, Benson J, Cheng YS, Johnson D, Pierce R *et al*: **Literature Review of Florida Red Tide: Implications for Human Health Effects.** *Harmful Algae* 2004, **3**(2):99-115.
132. Brand LE, Campbell L, Bresnan E: **Karenia: The biology and ecology of a toxic genus.** *Harmful Algae* 2012, **14**(0):156-178.
133. Watkins SM, Reich A, Fleming LE, Hammond R: **Neurotoxic shellfish poisoning.** *Mar Drugs* 2008, **6**(3):431-455.
134. Morris PD, Campbell DS, Taylor TJ, Freeman JI: **Clinical and epidemiological features of neurotoxic shellfish poisoning in North Carolina.** *Am J Public Health* 1991, **81**(4):471-474.
135. Ramsdell JS: **The molecular and integrative bases to brevetoxin toxicity.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2008: 519-550.
136. Furey A, García J, O'Callaghan K, Lehane M, Fernandez-Amandi M, James KJ: **Brevetoxins: Structure, toxicology and origin.** In: *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry.* Edited by Botana LM, First edn. Iowa: Blackwell; 2007.
137. Lin YY, Risk M, Ray SM, Van Engen D, Clardy J, Golik J, James JC, Nakanishi K: **Isolation and structure of brevetoxin B from the "red tide" dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*).** *Journal of the American Chemical Society* 1981, **103**(22):6773-6775.
138. Dechraoui MY, Naar J, Pauillac S, Legrand AM: **Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels.** *Toxicon* 1999, **37**(1):125-143.

139. Bourdelais AJ, Tomas CR, Naar J, Kubanek J, Baden DG: **New fish-killing alga in coastal Delaware produces neurotoxins.** *Environ Health Perspect* 2002, **110**(5):465-470.
140. Tibbetts J: **Toxic tides.** *Environ Health Perspect* 1998, **106**(7):A326-331.
141. Abraham WM, Baden DG: **Aerosolized Florida Red Tide Toxins and Human Health Effects.** *Oceanography (Wash D C)* 2006, **19**(2):107-109.
142. EFSA, Authority EFS: **Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group.** EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *The EFSA Journal* 2010, **8**(7):1677.
143. Poli MA: **Detection of brevetoxins in the twenty-first century.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM, Second edn. Boca Raton: CRC Press; 2008: 551-558.
144. Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T: **Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning.** *Tetrahedron Letters* 1987, **28**(47):5869-5872.
145. Gleibs S, Mebs D: **Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals.** *Toxicon* 1999, **37**(11):1521-1527.
146. Yasumoto T, Yasumura D, Ohizumi Y, Takahashi M, Alcalá AC, Alcalá LC: **Palytoxin in Two Species of Xanthid Crab from the Philippines.** *Agricultural and Biological Chemistry* 1986, **50**(1):163-167.
147. Fukui M, Murata M, Inoue A, Gawel M, Yasumoto T: **Occurrence of palytoxin in the trigger fish *Melichthys vidua*.** *Toxicon* 1987, **25**(10):1121-1124.
148. Paz B, Daranas AH, Norte M, Riobo P, Franco JM, Fernandez JJ: **Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview.** *Mar Drugs* 2008, **6**(2):73-102.
149. EFSA, Authority EFS: **Marine biotoxins in shellfish – Yessotoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain** *The EFSA Journal* 2008, **907**:1-62.
150. Tubaro A, Dell'Ovo V, Sosa S, Florio C: **Yessotoxins: A toxicological overview.** *Toxicon* 2010, **56**(2):163-172.
151. Suzuki T: **Lipophilic toxins, pectenotoxins, and yessotoxins: Chemistry, metabolism, and detection.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 627-656.
152. Bender AT, Beavo JA: **Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Regulation to Clinical Use.** *Pharmacological Reviews* 2006, **58**(3):488-520.
153. Alfonso A, de la Rosa L, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes.** *Biochem Pharmacol* 2003, **65**(2):193-208.

154. Pazos MJ, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Study of the interaction between different phosphodiesterases and yessotoxin using a resonant mirror biosensor.** *Chemical Research in Toxicology* 2006, **19**(6):794-800.
155. Pazos MJ, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Vieites JM, Botana LM: **Resonant mirror biosensor detection method based on yessotoxin–phosphodiesterase interactions.** *Analytical Biochemistry* 2004, **335**(1):112-118.
156. Alfonso C, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Quantification of yessotoxin using the fluorescence polarization technique and study of the adequate extraction procedure.** *Analytical Biochemistry* 2005, **344**(2):266-274.
157. Tubaro A, Sosa S, Carbonatto M, Altinier G, Vita F, Melato M, Satake M, Yasumoto T: **Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice.** *Toxicon* 2003, **41**(7):783-792.
158. Korsnes MS, Espenes A: **Yessotoxin as an apoptotic inducer.** *Toxicon* 2011, **57**(7–8):947-958.
159. Alfonso A, Tobío A, Louzao MC: **Yessotoxins and Pectenotoxins.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 657-676.
160. Anonymous: **Commission regulation (EU) No 786/2013 of 16 August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs.** *Official Journal of the European Union* 2013.
161. Pierotti S, Malaguti C, Milandri A, Poletti R, Rossini GP: **Functional assay to measure yessotoxins in contaminated mussel samples.** *Analytical Biochemistry* 2003, **312**(2):208-216.
162. Fonfría ES, Vilariño N, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Feasibility of using a surface plasmon resonance-based biosensor to detect and quantify yessotoxin.** *Analytica Chimica Acta* 2008, **617**(1–2):167-170.
163. Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M: **Diarrhetic shellfish toxins.** *Tetrahedron Letters* 1985, **41**:1019–1025.
164. Pizarro G, Paz B, Franco JM, Suzuki T, Reguera B: **First detection of Pectenotoxin-11 and confirmation of OA-D8 diol-ester in *Dinophysis acuta* from European waters by LC-MS/MS.** *Toxicon* 2008, **52**(8):889-896.
165. Nagai S, Suzuki T, Nishikawa T, Kamiyama T: **Differences in the production and excretion kinetics of okadaic acid, dinophysistoxin-1, and pectenotoxin-2 between cultures of *Dinophysis acuminata* and *Dinophysis fortii* isolated from western Japan.** *Journal of Phycology* 2011, **47**(6):1326-1337.

166. Suzuki T, Mitsuya T, Matsubara H, Yamasaki M: **Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection: Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops.** *Journal of Chromatography A* 1998, **815**(1):155-160.
167. Suzuki T, Mackenzie L, Stirling D, Adamson J: **Conversion of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-2 seco acid in the New Zealand scallop, *Pecten novaezelandiae*.** *Fisheries Science* 2001, **67**(3):506-510.
168. Krock B, Tillmann U, Selwood AI, Cembella AD: **Unambiguous identification of pectenotoxin-1 and distribution of pectenotoxins in plankton from the North Sea.** *Toxicon* 2008, **52**(8):927-935.
169. Miles CO, Wilkins AL, Hawkes AD, Jensen DJ, Selwood AI, Beuzenberg V, Lincoln M. A, Cooney JM, Holland PT: **Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand.** *Toxicon* 2006, **48**(2):152-159.
170. Suzuki T, Beuzenberg V, Mackenzie L, Quilliam MA: **Liquid chromatography–mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand.** *Journal of Chromatography A* 2003, **992**(1–2):141-150.
171. Miles CO, Wilkins AL, Samdal IA, Sandvik M, Petersen D, Quilliam MA, Naustvoll LJ, Rundberget T, Torgersen T, Hovgaard P *et al*: **A Novel Pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* Spp. and Shellfish from Norway.** *Chemical Research in Toxicology* 2004, **17**(11):1423-1433.
172. Sasaki K, Wright JLC, Yasumoto T: **Identification and Characterization of Pectenotoxin (PTX) 4 and PTX7 as Spiroketal Stereoisomers of Two Previously Reported Pectenotoxins.** *The Journal of Organic Chemistry* 1998, **63**(8):2475-2480.
173. Espiña B, Rubiolo JA: **Marine toxins and the cytoskeleton: pectenotoxins, unusual macrolides that disrupt actin.** *FEBS Journal* 2008, **275**(24):6082-6088.
174. Terao K, Ito E, Yanagi T, Yasumoto T: **Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1.** *Toxicon* 1986, **24**(11-12):1141-1151.
175. Miles CO, Wilkins AL, Munday R, Dines MH, Hawkes AD, Briggs LR, Sandvik M, Jensen DJ, Cooney JM, Holland PT *et al*: **Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities.** *Toxicon* 2004, **43**(1):1-9.
176. Ito E, Suzuki T, Oshima Y, Yasumoto T: **Studies of diarrhetic activity on pectenotoxin-6 in the mouse and rat.** *Toxicon* 2008, **51**(4):707-716.

177. EFSA, Authority EFS: **Marine biotoxins in shellfish – Pectenotoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain** *The EFSA Journal* 2009, **1109**:1-47.
178. Chinain M, Darius HT, Ung A, Cruchet P, Wang Z, Ponton D, Laurent D, Pauillac S: **Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate Gambierdiscus polynesiensis (Dinophyceae) in culture.** *Toxicon* 2010, **56**(5):739-750.
179. Scheuer PJ, Takahashi W, Tsutsumi J, Yoshida T: **Ciguatoxin: isolation and chemical nature.** *Science* 1967, **155**(3767):1267-1268.
180. Tachibana K, Nukina M, Joh YG, Scheuer PJ: **Recent developments in the molecular structure of ciguatoxin.** *Biological Bulletin* 1987, **172**:122-127.
181. Gawley RE, Rein KS, Kinoshita M, Baden DG: **Binding of brevetoxins and ciguatoxin to the voltage-sensitive sodium channel and conformational analysis of brevetoxin B.** *Toxicon* 1992, **30**(7):780-785.
182. Birinyi-Strachan LC, Gunning SJ, Lewis RJ, Nicholson GM: **Block of voltage-gated potassium channels by Pacific ciguatoxin-1 contributes to increased neuronal excitability in rat sensory neurons.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005, **204**(2):175-186.
183. Molgo J, Shimahara T, Legrand AM: **Ciguatoxin, extracted from poisonous morays eels, causes sodium-dependent calcium mobilization in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells.** *Neurosci Lett* 1993, **158**(2):147-150.
184. Dickey RW: **Ciguatera toxins: chemistry, toxicology, and detection.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM, Second edn. Boca Raton: CRC Press; 2008: 479-500.
185. Satake M, Murata M, Yasumoto T: **Gambierol: a new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate Gambierdiscus toxicus.** *Journal of the American Chemical Society* 1993, **115**(1):361-362.
186. Sasaki M, Cagide E, Louzao MC: **Gambierol.** In: *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry.* Edited by Botana LM, First edn. Iowa: Blackwell; 2007.
187. Louzao M, Cagide E, Vieytes MR, Sasaki M, Fuwa H, Yasumoto T, Botana LM: **The Sodium Channel of Human Excitable Cells is a Target for Gambierol.** *Cellular Physiology and Biochemistry* 2006, **17**(5-6):257-268.
188. Cuypers E, Abdel-Mottaleb Y, Kopljar I, Rainier JD, Raes AL, Snyders DJ, Tytgat J: **Gambierol, a toxin produced by the dinoflagellate Gambierdiscus toxicus, is a potent blocker of voltage-gated potassium channels.** *Toxicon* 2008, **51**(6):974-983.
189. EFSA, Authority EFS: **Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain.** *The EFSA Journal* 2010, **8**(6):1627.

190. Munday R: **Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins, protocontrolide, spiro-prorocentrimine, and symbioimines.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM, Second edn. Boca Raton: CRC Press; 2008: 581-594.
191. Miles CO, Wilkins AL, Stirling DJ, MacKenzie AL: **New Analogue of Gymnodimine from a Gymnodinium Species.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, **48**(4):1373-1376.
192. Miles CO, Wilkins AL, Stirling DJ, MacKenzie AL: **Gymnodimine C, an Isomer of Gymnodimine B, from Karenia selliformis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, **51**(16):4838-4840.
193. Hu T, Curtis JM, Oshima Y, Quilliam MA, Walter JA, Watson-Wright WM, Wright JLC: **Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish.** *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1995(20):2159-2161.
194. Hu T, Burton IW, Cembella AD, Curtis JM, Quilliam MA, Walter JA, Wright JLC: **Characterization of Spirolides A, C, and 13-Desmethyl C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish.** *Journal of Natural Products* 2001, **64**(3):308-312.
195. Takada N, Umemura N, Suenaga K, Uemura D: **Structural determination of pteriatoxins A, B and C, extremely potent toxins from the bivalve Pteria penguin.** *Tetrahedron Letters* 2001, **42**(20):3495-3497.
196. Torigoe K, Murata M, Yasumoto T, Iwashita T: **Prorocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate, Prorocentrum lima.** *Journal of the American Chemical Society* 1988, **110**(23):7876-7877.
197. Hu T, deFreitas ASW, Curtis JM, Oshima Y, Walter JA, Wright JLC: **Isolation and Structure of Prorocentrolide B, a Fast-Acting Toxin from Prorocentrum maculosum.** *Journal of Natural Products* 1996, **59**(11):1010-1014.
198. Araoz R, Servent D, Molgó J, Iorga BI, Fruchart-Gaillard C, Benoit E, Gu Z, Stivala C, Zakarian A: **Total Synthesis of Pinnatoxins A and G and Revision of the Mode of Action of Pinnatoxin A.** *Journal of the American Chemical Society* 2011, **133**(27):10499-10511.
199. Kharrat R, Servent D, Girard E, Ouanounou G, Amar M, Marrouchi R, Benoit E, Molgó J: **The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity.** *Journal of Neurochemistry* 2008, **107**(4):952-963.
200. Hauser TA, Hepler CD, Kombo DC, Grinevich VP, Kiser MN, Hooker DN, Zhang J, Mountfort D, Selwood AI, Akireddy SR *et al*: **Comparison of acetylcholine receptor interactions of the marine toxins, 13-desmethylspirolide C and gymnodimine.** *Neuropharmacology* 2012, **62**(7):2239-2250.

201. Otero P, Alfonso A, Rodríguez P, Rubiolo JA, Cifuentes JM, Bermúdez R, Vieytes MR, Botana LM: **Pharmacokinetic and toxicological data of spirolides after oral and intraperitoneal administration.** *Food and Chemical Toxicology* 2012, **50**(2):232-237.
202. Munday R, Quilliam MA, LeBlanc P, Lewis N, Gallant P, Sperker SA, Ewart HS, MacKinnon SL: **Investigations into the Toxicology of Spirolides, a Group of Marine Phycotoxins.** *Toxins* 2011, **4**(1):1-14.
203. EFSA, Authority EFS: **Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins): EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM).** *The EFSA Journal* 2010, **8**(6):1628.
204. Rodríguez LP, Vilariño N, Molgó J, Aráoz R, Botana LM: **High-throughput receptor-based assay for the detection of spirolides by chemiluminescence.** *Toxicon* 2013, **75**(0):35-43.
205. Vilariño N, Fonfría ES, Molgó J, Aráoz R, Botana LM: **Detection of Gymnodimine-A and 13-Desmethyl C Spirolide Phycotoxins by Fluorescence Polarization.** *Analytical Chemistry* 2009, **81**(7):2708-2714.
206. Rodríguez LP, Vilariño N, Molgó J, Aráoz R, Antelo A, Vieytes MR, Botana LM: **Solid-Phase Receptor-Based Assay for the Detection of Cyclic Imines by Chemiluminescence, Fluorescence, or Colorimetry.** *Analytical Chemistry* 2011, **83**(15):5857-5863.
207. Otero P, Alfonso A, Alfonso C, Aráoz R, Molgó J, Vieytes MR, Botana LM: **First direct fluorescence polarization assay for the detection and quantification of spirolides in mussel samples.** *Analytica Chimica Acta* 2011, **701**(2):200-208.
208. Moore RE, Scheuer PJ: **Palytoxin: A New Marine Toxin from a Coelenterate.** *Science* 1971, **172**:495-498.
209. Katikou P, Vlamis A: **Palytoxin and analogs: ecobiology and origin, chemistry and chemical analysis.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 105-120.
210. Rossi R, Castellano V, Scalco E, Serpe L, Zingone A, Soprano V: **New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Toxicon* 2010, **56**(8):1381-1387.
211. Béress L, Zwick J, Kolkenbrock HJ, Kaul PN, Wassermann O: **A method for the isolation of the caribbean palytoxin (C-PTX) from the coelenterate (zooanthid) *Palythoa caribaeorum*.** *Toxicon* 1983, **21**(2):285-290.
212. Uemura D, Ueda K, Hirata Y, Naoki H, Iwashita T: **Further studies on palytoxin. II. structure of palytoxin.** *Tetrahedron Letters* 1981, **22**(29):2781-2784.

213. Moore RE, Bartolini G: **Structure of palytoxin**. *Journal of the American Chemical Society* 1981, **103**(9):2491-2494.
214. Ramos V, Vasconcelos V: **Palytoxin and analogs: biological and ecological effects**. *Mar Drugs* 2010, **8**(7):2021-2037.
215. Ukena T, Satake M, Usami M, Oshima Y, Naoki H, Fujita T, Kan Y, Yasumoto T: **Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis***. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001, **65**(11):2585-2588.
216. Cagide E, Louzao MC, Espina B, Vieytes MR, Jaen D, Maman L, Yasumoto T, Botana LM: **Production of functionally active palytoxin-like compounds by Mediterranean *Ostreopsis cf. siamensis***. *Cell Physiol Biochem* 2009, **23**(4-6):431-440.
217. Usami M, Satake M, Ishida S, Inoue A, Kan Y, Yasumoto T: **Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis***. *Journal of the American Chemical Society* 1995, **117**(19):5389-5390.
218. Ito E, Yasumoto T: **Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes**. *Toxicon* 2009, **54**(3):244-251.
219. Lenoir S, Ten-Hage L, Turquet J, Quod JP, Bernard C, Hennion MC: **First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) bentic bloom in southwestern indian ocean**. *Journal of Phycology* 2004, **40**:1042-1051
220. Quod JP: ***Ostreopsis mascarenensis* sp. nov (Dinophyceae), dinoflagelle toxique associé à la ciguatera dans l'Océan Indien**. *Cryptogamie Algologie* 1994, **15**:243-251.
221. Katikou P: **Palytoxin and analogues: Ecobiology and origin, chemistry, metabolism, and chemical analysis**. In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM, Second edn. Boca Raton: CRC Press; 2008: 631-663.
222. Fukuyo Y: **Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs**. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 1981, **47**(8):967-978.
223. Yasumoto T, Seino N, Murakami Y, Murata M: **Toxins produced by benthic dinoflagellates**. *The Biological Bulletin* 1987, **172**:128-131.
224. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N: **Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak**. *J Am Soc Spectrom* 2008, **19**(1):111-120.
225. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pistocchi R: **Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry**. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010, **24**(18):2735-2744.

226. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Battocchi C, Crinelli R, Carloni E, Magnani M *et al*: **Unique toxin profile of a Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strain: HR LC-MS(n) characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener.** *Chem Res Toxicol* 2012, **25**(6):1243-1252.
227. Tindall DR, Miller DM, Tindall PM: **Toxicity of *Ostreopsis lenticularis* from the British and United States Virgin Islands.** In: *Toxic Marine Phytoplankton*. Edited by Granéli E, Sundström B, Edler L, Anderson DM. New York: Elsevier; 1990: 424–429.
228. Norris DR, Bomber JW, Balech E: **Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida Keys. I. *Ostreopsis heptagona* sp. nov.** In: *Toxic Dinoflagellates*. Edited by Anderson DM, White AW, Baden DG. New York: Elsevier Scientific; 1985: 39–44.
229. EFSA, Authority EFS: **Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group: EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM).** *The EFSA Journal* 2009, **7**(12):1393.
230. Vale-Gonzalez C, Pazos MJ, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM: **Study of the neuronal effects of ouabain and palytoxin and their binding to Na,K-ATPases using an optical biosensor.** *Toxicon* 2007, **50**(4):541-552.
231. Pelin M, Sosa S, Della Loggia R, Poli M, Tubaro A, Decorti G, Florio C: **The cytotoxic effect of palytoxin on Caco-2 cells hinders their use for in vitro absorption studies.** *Food and Chemical Toxicology* 2012, **50**(2):206-211.
232. Habermann E, Chhatwal GS: **Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes.** *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1982, **319**(2):101-107.
233. Sandtner W, Egwolf B, Khalili-Araghi F, Sánchez-Rodríguez JE, Roux B, Bezanilla F, Holmgren M: **Ouabain Binding Site in a Functioning Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase.** *Journal of Biological Chemistry* 2011, **286**(44):38177-38183.
234. Chen JQ, Contreras R, Wang R, Fernandez S, Shoshani L, Russo I, Cereijido M, Russo J: **Sodium/potassium ATPase (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: a new paradigm for development of anti- breast cancer drugs?** *Breast Cancer Res Treat* 2006, **96**(1):1-15.
235. Munday R: **Palytoxin toxicology: Animal studies.** *Toxicon* 2011, **57**(3):470-477.
236. Tubaro A, del Favero G, Pelin M, Bignami G, Poli M: **Palytoxin and Analogues: Biological Effects and Detection.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2014: 741-772.
237. Tubaro A, Durando P, Del Favero G, Ansaldi F, Icardi G, Deeds JR, Sosa S: **Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure.** *Toxicon* 2011, **57**(3):478-495.

238. Aligizaki K, Katikou P, Milandri A, Diogène J: **Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art.** *Toxicon* 2011, **57**(3):390-399.
239. Aligizaki K, Katikou P, Nikolaidis G, Panou A: **First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece).** *Toxicon* 2008, **51**(3):418-427.
240. Shinzato T, Furusu A, Nishino T, Abe K, Kanda T, Maeda T, Kohno S: **Cowfish (*Umisuzume, Lactoria diaphana*) poisoning with rhabdomyolysis.** *Intern Med* 2008, **47**(9):853-856.
241. Alcalá AC, Garth JS, Yasumura D, Yasumoto T: **Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin.** *Toxicon* 1988, **26**(1):105-107.
242. Nordt SP, Wu J, Zahller S, Clark RF, Cantrell FL: **Palytoxin Poisoning After Dermal Contact with Zoanthid Coral.** *Journal of Emergency Medicine* 2011, **40**(4):397-399.
243. Hoffmann K, Hermanns-Clausen M, Buhl C, Büchler MW, Schemmer P, Mebs D, Kaufenstein S: **A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury.** *Toxicon* 2008, **51**(8):1535-1537.
244. Rumore MM, Houst BM: **Palytoxin poisoning via inhalation in pediatric siblings.** *International Journal of Case Reports and Images* 2014, **5**(7):501-504.
245. Barroso García P, Rueda de la Puerta P, Parrón Carreño T, Marín Martínez P, Guillén Enríquez J: **Brote con síntomas respiratorios en la provincia de Almería por una posible exposición a microalgas tóxicas.** *Gaceta Sanitaria* 2008, **22**:578-584.
246. Tichadou L, Glaizal M, Armengaud A, Grosseil H, Lemée R, Kantin R, Lasalle JL, Drouet G, Rambaud L, Malfait P *et al*: **Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009.** *Clinical Toxicology* 2010, **48**:839-844
247. Penna A, Vila M, Fraga S, Giacobbe MG, Andreoni F, Riobó P, Vernesi C: **Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western mediterranean sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S r DNA sequences.** *Journal of Phycology* 2005, **41**(1):212-225.
248. Vila M, Garcés E, Masó M: **Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean.** *Aquatic Microbial Ecology* 2001, **26**(1):51-60.
249. Nascimento SM, França JV, Gonçalves JEA, Ferreira CEL: ***Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) bloom in an equatorial island of the Atlantic Ocean.** *Marine Pollution Bulletin* 2012, **64**(5):1074-1078.

250. Vilariño N, Louzao MC, Fraga M, Rodríguez LP, Botana LM: **Innovative detection methods for aquatic algal toxins and their presence in the food chain.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2013, **405**:7719–7732.
251. Bignami GS, Raybould TJG, Sachinvala ND, Grothaus PG, Simpson SB, Lazo CB, Byrnes JB, Moore RE, Vann DC: **Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassays for the measurement of palytoxin in biological samples.** *Toxicon* 1992, **30**(7):687-700.
252. Fusetani N: **Marine Toxins: An Overview.** In: *Marine Toxins as Research Tools.* Edited by Fusetani N, Kem W, vol. 46: Springer Berlin Heidelberg; 2009: 1-44.
253. Fouw FC, van Egmond HP, Speijers GJA: **Ciguatera fish poisoning: a review.** *Research for man and environment* 2001.
254. Holmes MJ, Lewis RJ: **Purification and characterisation of large and small maitotoxins from cultured *Gambierdiscus toxicus*.** *Nat Toxins* 1994, **2**(2):64-72.
255. Yasumoto T, Bagnis R, P.Vernoux J: **Toxicity of the Surgeonfishes-II Properties of the Principal Water-soluble Toxin.** *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 1976, **42**(3):359-365.
256. Yokoyama A, Murata M, Oshima Y, Iwashita T, Yasumoto T: **Some Chemical Properties of Maitotoxin, a Putative Calcium Channel Agonist Isolated from a Marine Dinoflagellate.** *Journal of Biochemistry* 1988, **104**(2):184-187.
257. Daly JW, Lueders J, Padgett WL, Yangmee S, Gusovsky F: **Maitotoxin-elicited calcium influx in cultured cells: Effect of calcium-channel blockers.** *Biochemical Pharmacology* 1995, **50**(8):1187-1197.
258. Freedman SB, Miller RJ, Miller DM, Tindall DR: **Interactions of maitotoxin with voltage-sensitive calcium channels in cultured neuronal cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**(14):4582-4585.
259. Kobayashi M, Ohizumi Y, Yasumoto T: **The mechanism of action of maitotoxin in relation to Ca<sup>2+</sup> movements in guinea-pig and rat cardiac muscles.** *British Journal of Pharmacology* 1985, **86**(2):385–391.
260. Lu XZ, Deckey R, Jiao GL, Ren HF, Li M: **Caribbean maitotoxin elevates [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and activates non-selective cation channels in HIT-T15 cells.** *World Journal of Diabetes* 2013, **4**(3):70–75.
261. Berta P, Sladeczek F, Derancourt J, Durand M, Travo P, Haiech J: **Maitotoxin stimulates the formation of inositol phosphates in rat aortic myocytes.** *FEBS Letters* 1986, **197**(1–2):349-352.
262. De la Rosa L, Álvarez-Parrilla E, Martínez-Martínez A: **Biochemistry of maitotoxin.** In: *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry.* Edited by Botana LM, First edn. Iowa: Blackwell; 2007.

263. Lewis RJ: **Ciguatera: Australian perspectives on a global problem.** *Toxicon* 2006, **48**(7):799-809.
264. Satake M: **Chemistry of maitotoxin.** In: *Phycotoxins: Chemistry and biochemistry.* Edited by Botana LM, First edn. Iowa: Blackwell; 2007.
265. Cooper GM: **Pathways of Intracellular Signal Transduction.** In: *The Cell: A Molecular Approach.* Edited by Cooper GM. Boston: Sinauer Associates; 2000.
266. Mowrey D, Chen Q, Liang Y, Liang J, Xu Y, Tang P: **Signal Transduction Pathways in the Pentameric Ligand-Gated Ion Channels.** *PLoS ONE* 2013, **8**(5):e64326.
267. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J: **Cell-to-cell signaling: hormones and receptors.** In: *Molecular cell biology.* Edited by Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, 4 edn. New York: W H Freeman; 2000.
268. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: **Signal-transduction pathways: An introduction to information metabolism.** In: *Biochemistry.* Edited by Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, 5 edn. New York: W H Freeman; 2002.
269. Greger IH, Esteban JA: **AMPA receptor biogenesis and trafficking.** *Curr Opin Neurobiol* 2007, **17**(3):289-297.
270. Rorsman P, Braun M: **Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets.** *Annual Review of Physiology* 2013, **75**(1):155-179.
271. Zhivotovsky B, Orrenius S: **Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community.** *Cell Calcium* 2011, **50**(3):211-221.
272. Habermann E: **Palytoxin acts through Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase.** *Toxicon* 1989, **27**(11):1171-1187.
273. Hilgemann DW: **From a pump to a pore: How palytoxin opens the gates.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, **100**(2):386-388.
274. Artigas P, Gadsby DC: **Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands.** *J Gen Physiol* 2004, **123**(4):357-376.
275. Tosteson MT, Thomas J, Arnadottir J, Tosteson DC: **Effects of palytoxin on cation occlusion and phosphorylation of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase.** *J Membrane Biol* 2003, **192**(3):181-189.
276. Estévez MD, Vieytes MR, Louzao MC, Botana LM: **Effect of okadaic acid on immunologic and non-immunologic histamine release in rat mast cells.** *Biochemical Pharmacology* 1994, **47**(3):591-593.
277. Rubiolo JA, López-Alonso H, Vega FV, Vieytes MR, Botana LM: **Comparative study of toxicological and cell cycle effects of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in primary rat hepatocytes.** *Life Sciences* 2012, **90**(11-12):416-423.

278. Cabado AG, Leira F, Vieytes MR, Vieites JM, Botana LM: **Cytoskeletal disruption is the key factor that triggers apoptosis in okadaic acid-treated neuroblastoma cells.** *Archives of Toxicology* 2004, **78**(2):74-85.
279. Vale C, Botana LM: **Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins.** *FEBS J* 2008, **275**(24):6060-6066.
280. Perrotti D, Neviani P: **Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy.** *The Lancet Oncology* 2013, **14**(6):e229-e238.
281. Munday R: **Is Protein Phosphatase Inhibition Responsible for the Toxic Effects of Okadaic Acid in Animals?** *Toxins* 2013, **5**(2):267-285.
282. Alfonso A, Alfonso C: **Pharmacology and mechanism of action: biological detection.** In: *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection.* Edited by Botana LM. Boca Raton: CRC Press; 2008: 315-327.
283. de la Rosa LA, Alfonso A, Vilariño N, Vieytes MR, Botana LM: **Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin**★. *Biochemical Pharmacology* 2001, **61**(7):827-833.
284. de la Rosa LA, Alfonso A, Vilariño N, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Maitotoxin-induced calcium entry in human lymphocytes: Modulation by yessotoxin, Ca<sup>2+</sup> channel blockers and kinases.** *Cellular Signalling* 2001, **13**(10):711-716.
285. Ronzitti G, Rossini GP: **Yessotoxin induces the accumulation of altered E-cadherin dimers that are not part of adhesive structures in intact cells.** *Toxicology* 2008, **244**(2-3):145-156.
286. Ferrari S, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Forino M, Malaguti C, Tubaro A, Poletti R, Yasumoto T, Fattorusso E, Rossini GP: **Structure-Activity Relationships of Yessotoxins in Cultured Cells.** *Chemical Research in Toxicology* 2004, **17**(9):1251-1257.
287. Tobío A, Fernández-Araujo A, Alfonso A, Botana LM: **Role of yessotoxin in calcium and cAMP-crosstalks in primary and K-562 human lymphocytes: The effect is mediated by Anchor kinase a mitochondrial proteins.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2012, **113**(12):3752-3761.
288. Bianchi C, Fato R, Angelin A, Trombetti F, Ventrella V, Borgatti AR, Fattorusso E, Ciminiello P, Bernardi P, Lenaz G *et al*: **Yessotoxin, a shellfish biotoxin, is a potent inducer of the permeability transition in isolated mitochondria and intact cells.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2004, **1656**(2-3):139-147.
289. Sosa S, Ardizzone M, Beltramo D, Vita F, Dell'Ovo V, Barreras A, Yasumoto T, Tubaro A: **Repeated oral co-exposure to yessotoxin and okadaic acid: A short term toxicity study in mice.** *Toxicon* 2013, **76**(0):94-102.
290. Beavo JA, Francis SH, Houslay MD: **Role of A-kinase anchoring proteins in the com-partmentation in cyclic nucleotide signaling.** In: *Cyclic nucleotide*

*phosphodiesterases in health and disease*. Edited by Beavo JA, Sharron HF, Miles DH. Boca Raton: CRC Press; 2007: 377–387.

291. Baillie GS, Scott JD, Houslay MD: **Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract**. *FEBS Letters* 2005, **579**(15):3264-3270.
292. Sample V, DiPilato LM, Yang JH, Ni Q, Saucerman JJ, Zhang J: **Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP**. *Nat Chem Biol* 2012, **8**(4):375-382.
293. Carlucci A, Lignitto L, Feliciello A: **Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome**. *Trends Cell Biol* 2008, **18**(12):604-613.
294. Merrill RA, Strack S: **Mitochondria: A kinase anchoring protein 1, a signaling platform for mitochondrial form and function**. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2014, **48**(0):92-96.
295. Burgers PP, Ma Y, Margarucci L, Mackey M, van der Heyden MAG, Ellisman M, Scholten A, Taylor SS, Heck AJR: **A Small Novel A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) That Localizes Specifically Protein Kinase A-Regulatory Subunit I (PKA-RI) to the Plasma Membrane**. *Journal of Biological Chemistry* 2012, **287**(52):43789-43797.
296. Kapiloff MS, Schillace RV, Westphal AM, Scott JD: **mAKAP: an A-kinase anchoring protein targeted to the nuclear membrane of differentiated myocytes**. *Journal of Cell Science* 1999, **112**(16):2725-2736.
297. Asirvatham AL, Galligan SG, Schillace RV, Davey MP, Vasta V, Beavo JA, Carr DW: **A-kinase anchoring proteins interact with phosphodiesterases in T lymphocyte cell lines**. *J Immunol* 2004, **173**(8):4806-4814.
298. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK: **Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis**. *Cell Proliferation* 2012, **45**(6):487-498.
299. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics**. *Br J Cancer* 1972, **26**(4):239-257.
300. Hengartner MO: **The biochemistry of apoptosis**. *Nature* 2000, **407**(6805):770-776.
301. Elmore S: **Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death**. *Toxicologic Pathology* 2007, **35**(4):495-516.
302. Javadov S, Karmazyn M: **Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as an Endpoint to Initiate Cell Death and as a Putative Target for Cardioprotection**. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2007, **20**(1-4):1-22.
303. Fulda S, Debatin KM: **Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy**. *Oncogene* 2006, **25**(34):4798-4811.

304. Høyer-Hansen M, Jäättelä M: **Autophagy: An emerging target for cancer therapy.** *Autophagy* 2008, **4**:574 - 580.
305. Populo H, Lopes JM, Soares P: **The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer.** *Int J Mol Sci* 2012, **13**(2):1886-1918.
306. Lazova R, Camp RL, Klump V, Siddiqui SF, Amaravadi RK, Pawelek JM: **Punctate LC3B Expression Is a Common Feature of Solid Tumors and Associated with Proliferation, Metastasis, and Poor Outcome.** *Clinical Cancer Research* 2012, **18**:370-379.
307. Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G: **Cell death independent of caspases: a review.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(9):3155-3162.
308. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S *et al*: **Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012.** *Cell Death Differ* 2012, **19**(1):107-120.
309. Gao X, Xu X, Pang J, Zhang C, Ding JM, Peng X, Liu Y, Cao JM: **NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes.** *Physiol Res* 2007, **56**(5):559-569.
310. Giordano G, White CC, Mohar I, Kavanagh TJ, Costa LG: **Glutathione levels modulate domoic acid induced apoptosis in mouse cerebellar granule cells.** *Toxicol Sci* 2007, **100**(2):433-444.
311. Pinto-Silva CR, Moukha S, Matias WG, Creppy EE: **Domoic acid induces direct DNA damage and apoptosis in Caco-2 cells: recent advances.** *Environ Toxicol* 2008, **23**(6):657-663.
312. Leira F, Alvarez C, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM: **Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line.** *Toxicology in Vitro* 2002, **16**:23-31.
313. Leira F, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM: **Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts.** *Toxicol In Vitro* 2001, **15**(3):199-208.
314. Jayaraj R, Gupta N, Rao PVL: **Multiple signal transduction pathways in okadaic acid induced apoptosis in HeLa cells.** *Toxicology* 2009, **256**(1-2):118-127.
315. Rossini GP, Sgarbi N, Malaguti C: **The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms.** *Toxicon* 2001, **39**(6):763-770.
316. Ravindran J, Gupta N, Agrawal M, Bala Bhaskar AS, Lakshmana Rao PV: **Modulation of ROS/MAPK signaling pathways by okadaic acid leads to cell death via, mitochondrial mediated caspase-dependent mechanism.** *Apoptosis* 2011, **16**(2):145-161.

317. Riordan FA, Foroni L, Hoffbrand AV, Mehta AB, Wickremasinghe RG: **Okadaic acid-induced apoptosis of HL60 leukemia cells is preceded by destabilization of bcl-2 mRNA and downregulation of bcl-2 protein.** *FEBS Letters* 1998, **435**(2–3):195-198.
318. Lago J, Santaclara F, Vieites JM, Cabado AG: **Collapse of mitochondrial membrane potential and caspases activation are early events in okadaic acid-treated Caco-2 cells.** *Toxicol* 2005, **46**(5):579-586.
319. Valdigués V, Prego-Faraldo MV, Pásaro E, Méndez J, Laffon B: **Okadaic Acid: More than a Diarrheic Toxin.** *Marine Drugs* 2013, **11**(11):4328-4349.
320. Yoon SY, Choi JE, Kweon HS, Choe H, Kim SW, Hwang O, Lee H, Lee JY, Kim DH: **Okadaic acid increases autophagosomes in rat neurons: implications for Alzheimer's disease.** *J Neurosci Res* 2008, **86**(14):3230-3239.
321. Vilariño A, Nicolaou KC, Frederick MO, Vieytes MR, Botana LM: **Irreversible cytoskeletal disarrangement is independent of caspase activation during in vitro azaspiracid toxicity in human neuroblastoma cells.** *Biochemical Pharmacology* 2007, **74**(2):327-335.
322. Twiner MJ, Hanagriff JC, Butler S, Madhkoor AK, Doucette GJ: **Induction of Apoptosis Pathways in Several Cell Lines following Exposure to the Marine Algal Toxin Azaspiracid.** *Chemical Research in Toxicology* 2012, **25**(7):1493-1501.
323. Korsnes MS, Espenes A, Hetland DL, Hermansen LC: **Paraptosis-like cell death induced by yessotoxin.** *Toxicol In Vitro* 2011, **25**(8):1764-1770.
324. Pang M, Qu P, Gao CL, Wang ZL: **Yessotoxin induces apoptosis in HL7702 human liver cells.** *Mol Med Rep* 2012, **5**(1):211-216.
325. Pang M, Wang ZL, Gao CL, Qu P, Li HD: **Characterization of apoptotic changes induced by yessotoxin in the Bel7402 human hepatoma cell line.** *Mol Med Rep* 2011, **4**(3):547-552.
326. Korsnes MS, Hetland DL, Espenes A, Aune T: **Induction of apoptosis by YTX in myoblast cell lines via mitochondrial signalling transduction pathway.** *Toxicol In Vitro* 2006, **20**(8):1419-1426.
327. Korsnes MS, Hetland DL, Espenes A, Tranulis MA, Aune T: **Apoptotic events induced by yessotoxin in myoblast cell lines from rat and mouse.** *Toxicol In Vitro* 2006, **20**(7):1077-1087.
328. Pérez-Gómez A, Ferrero-Gutierrez A, Novelli A, Franco JM, Paz B, Fernández-Sánchez MT: **Potent Neurotoxic Action of the Shellfish Biotxin Yessotoxin on Cultured Cerebellar Neurons.** *Toxicological Sciences* 2006, **90**(1):168-177.
329. McConkey DJ, Orrenius S: **The role of calcium in the regulation of apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **239**(2):357-366.

330. Korsnes MS: **Yessotoxin as a tool to study induction of multiple cell death pathways.** *Toxins* 2012, **4**:568-579.
331. Kim GY, Kim WJ, Choi YH: **Pectenotoxin-2 from marine sponges: a potential anti-cancer agent-a review.** *Mar Drugs* 2011, **9**(11):2176-2187.
332. Levine AJ, Momand J, Finlay CA: **The p53 tumour suppressor gene.** *Nature* 1991, **351**(6326):453-456.
333. Chae HD, Choi TS, Kim BM, Jung JH, Bang YJ, Shin DY: **Oocyte-based screening of cytokinesis inhibitors and identification of pectenotoxin-2 that induces Bim//Bax-mediated apoptosis in p53-deficient tumors.** *Oncogene* 2005, **24**(30):4813-4819.
334. Shin DY, Kim GY, Kim ND, Jung JH, Kim SK, Kang HS, Choi YH: **Induction of apoptosis by pectenotoxin-2 is mediated with the induction of DR4/DR5, Egr-1 and NAG-1, activation of caspases and modulation of the Bcl-2 family in p53-deficient Hep3B hepatocellular carcinoma cells.** *ONCOLOGY REPORTS* 2008, **19** 517-526.
335. Fladmark KE, Serres MH, Larsen NL, Yasumoto T, Aune T, Døskeland SO: **Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes.** *Toxicol* 1998, **36**(8):1101-1114.
336. Espiña B, Louzao MC, Ares IR, Fonfría ES, Vilariño N, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Impact of the Pectenotoxin C-43 Oxidation Degree on Its Cytotoxic Effect on Rat Hepatocytes.** *Chemical Research in Toxicology* 2010, **23**(3):504-515.
337. Sayer A, Hu Q, Bourdelais AJ, Baden DG, Gibson JE: **The effect of brevetoxin on brevetoxin-induced DNA damage in human lymphocytes.** *Arch Toxicol* 2005, **79**(11):683-688.
338. Walsh CJ, Leggett SR, Strohbahn K, Pierce RH, Sleasman JW: **Effects of in vitro brevetoxin exposure on apoptosis and cellular metabolism in a leukemic T cell line (Jurkat).** *Mar Drugs* 2008, **6**(2):291-307.
339. Murrell RN, Gibson JE: **Brevetoxins 2, 3, 6, and 9 show variability in potency and cause significant induction of DNA damage and apoptosis in Jurkat E6-1 cells.** *Archives of Toxicology* 2009, **83**(11):1009-1019.
340. Murrell RN, Gibson JE: **Brevetoxin 2 alters expression of apoptotic, DNA damage, and cytokine genes in Jurkat cells.** *Human & Experimental Toxicology* 2011, **30**(3):182-191.
341. da Silva CA, de Moraes ECP, Costa MDM, Ribas JLC, Guiloski IC, Ramsdorf WA, Zanata SM, Cestari MM, Oliveira Ribeiro CA, Magalhães VF *et al*: **Saxitoxins induce cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in teleost neurons in vitro.** *Toxicol* 2014, **86**(0):8-15.

342. Vale C, Alfonso A, Sunol C, Vieytes MR, Botana LM: **Modulation of calcium entry and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by palytoxin.** *J Neurosci Res* 2006, **83**(8):1393-1406.
343. Fernández DA, Louzao MC, Vilariño N, Espiña B, Fraga M, Vieytes MR, Román A, Poli M, Botana LM: **The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (Caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity.** *FEBS Journal* 2013, **280**(16):3906-3919.
344. Valverde I, Lago J, Reboreda A, Vieites JM, Cabado AG: **Characteristics of palytoxin-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells.** *Toxicology in Vitro* 2008, **22**(6):1432-1439.
345. Valverde I, Lago J, Vieites JM, Cabado AG: **In vitro approaches to evaluate palytoxin-induced toxicity and cell death in intestinal cells.** *Journal of Applied Toxicology* 2008, **28**(3):294-302.
346. McGinnis KM, Gnegy ME, Falk N, Nath R, Wang KKW: **Cytochrome c translocation does not lead to caspase activation in maitotoxin-treated SH-SY5Y neuroblastoma cells.** *Neurochemistry International* 2003, **42**(6):517-523.
347. Sugimoto M, Tahara H, Ide T, Furuichi Y: **Steps Involved in Immortalization and Tumorigenesis in Human B-Lymphoblastoid Cell Lines Transformed by Epstein-Barr Virus.** *Cancer Research* 2004, **64**(10):3361-3364.
348. Di Pietro R, di Giacomo V, Caravatta L, Sancilio S, Rana RA, Cataldi A: **Cyclic nucleotide response element binding (CREB) protein activation is involved in K562 erythroleukemia cells differentiation.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2007, **100**(4):1070-1079.
349. Yamamizu K, Matsunaga T, Katayama S, Kataoka H, Takayama N, Eto K, Nishikawa SI, Yamashita JK: **PKA/CREB Signaling Triggers Initiation of Endothelial and Hematopoietic Cell Differentiation via Etv2 Induction.** *STEM CELLS* 2012, **30**(4):687-696.
350. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N: **The Genoa 2005 Outbreak. Determination of Putative Palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a New Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method.** *Analytical Chemistry* 2006, **78**(17):6153-6159.
351. Accoroni S, Colombo F, Pichierri S, Romagnoli T, Marini M, Battocchi C, Penna A, Totti C: **Ecology of *Ostreopsis cf. ovata* Blooms in the Northwestern Adriatic Sea.** *Cryptogamie, Algologie* 2012, **33**(2):191-198.
352. Mangialajo L, Bertolotto R, Cattaneo-Vietti R, Chiantore M, Grillo C, Lemee R, Melchiorre N, Moretto P, Povero P, Ruggieri N: **The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy.** *Marine Pollution Bulletin* 2008, **56**(6):1209-1214.

353. Riobó P, Paz B, Franco JM, Vázquez JA, Murado MA, Cacho E: **Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose–death time relationships.** *Food and Chemical Toxicology* 2008, **46**(8):2639-2647.
354. Botana LM, Alfonso RA, Rodríguez VM, Loza MI: **Use of yessotoxin in the treatment of allergic and asthmatic processes.** In.: Google Patents; 2011.
355. Botana LM, Alfonso RA, Rodríguez VM, Loza MI: **Therapeutic use of yessotoxin as human tumor cell growth inhibitor.** In.: Google Patents; 2011.
356. Botana LM, Alonso E, Vale C: **Use of yessotoxin and analogues and derivatives thereof for treating and/or preventing neurodegenerative diseases linked to tau and beta amyloid.** In.: Google Patents; 2011.
357. Pazos MJ, Alfonso A, Vиейtes MR, Yasumoto T, Botana LM: **Kinetic Analysis of the Interaction between Yessotoxin and Analogues and Immobilized Phosphodiesterases Using a Resonant Mirror Optical Biosensor.** *Chemical Research in Toxicology* 2005, **18**(7):1155-1160.
358. Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ: **Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A.** *Mol Cell* 1999, **3**(4):413-422.
359. Chen ZH, Lam HC, Jin Y, Kim HP, Cao J, Lee SJ, Ifedigbo E, Parameswaran H, Ryter SW, Choi AMK: **Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, **107**(44):18880-18885.
360. Korsnes MS, Røed SS, Tranulis MA, Espenes A, Christophersen B: **Yessotoxin triggers ribotoxic stress.** *Toxicology in Vitro* 2014, **28**(5):975-981.
361. Salazar G, González A: **Novel Mechanism for Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Endocytosis Revealed by Protein Kinase A Inhibition.** *Molecular Biology of the Cell* 2002, **13**(5):1677-1693.
362. Ponka P, Lok CN: **The transferrin receptor: role in health and disease.** *Int J Biochem Cell Biol* 1999, **31**(10):1111-1137.
363. Daniels TR, Delgado T, Helguera G, Penichet ML: **The transferrin receptor part II: Targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells.** *Clinical Immunology* 2006, **121**(2):159-176.
364. Kasibhatla S, Jessen KA, Maliartchouk S, Wang JY, English NM, Drewe J, Qiu L, Archer SP, Ponce AE, Sirisoma N *et al*: **A role for transferrin receptor in triggering apoptosis when targeted with gambogic acid.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(34):12095-12100.

365. Marsee DK, Pinkus GS, Yu H: **CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens.** *Am J Clin Pathol* 2010, **134**(3):429-435.
366. Bottomley SS, Wolfe LC, Bridges KR: **Iron metabolism in K562 erythroleukemic cells.** *Journal of Biological Chemistry* 1985, **260**(11):6811-6815.
367. Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K: **The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1.** *Cancer Science* 2009, **100**(5):970-977.
368. Rubiolo JA, López-Alonso H, Martínez P, Millán A, Cagide E, Vieytes MR, Vega FV, Botana LM: **Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3.** *Cellular Signalling* 2014, **26**(2):419-432.
369. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ: **Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8.** *Science* 2004, **304**(5676):1500-1502.
370. Hussain T, Mulherkar R: **Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair.** *Int J Mol Cell Med* 2012, **1**(2):75-87.
371. Sie L, Loong S, Tan EK: **Utility of lymphoblastoid cell lines.** *J Neurosci Res* 2009, **87**(9):1953-1959.
372. Sugimoto M, Tahara H, Ide T, Furuichi Y: **Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus.** *Cancer Res* 2004, **64**(10):3361-3364.
373. Yatime L, Laursen M, Morth JP, Esmann M, Nissen P, Fedosova NU: **Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.** *Journal of Structural Biology* 2011, **174**(2):296-306.
374. Muzes G, Sipos F: **Anti-tumor immunity, autophagy and chemotherapy.** *World J Gastroenterol* 2012, **18**(45):6537-6540.
375. Soucie EL, Evan G, Penn LZ: **Apoptosis and cancer.** In: *Apoptosis in health and disease Clinical and therapeutic aspects.* Edited by Holcik M, Lacasse E, McKenzie A, Kornelux R. New York: Cambridge University Press; 2005: 75-95.
376. Riobó P, Franco JM: **Palytoxins: Biological and chemical determination.** *Toxicon* 2011, **57**(3):368-375.
377. Urban MW: **AFM studies of self-healing polymer films based on thiol-disulfide exchange reactions.** *Polymer preprints* 2011, **52**(2):620-621.
378. Accoroni S, Romagnoli T, Colombo F, Pennesi C, Di Camillo CG, Marini M, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E *et al*: **Ostreopsis cf. ovata bloom**

**in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile.** *Marine Pollution Bulletin* 2011, **62**(11):2512-2519.

379. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Yasumoto T, Battocchi C, Giacobbe M, Amorim A *et al*: **Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis cf. siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry.** *Harmful Algae* 2013, **23**(0):19-27.

380. Vila M, Camp J, Garcés E, Masó M, Delgado M: **High Resolution Spatio-temporal Detection of Potentially Harmful Dinoflagellates in Confined Waters of the NW Mediterranean.** *Journal of Plankton Research* 2001, **23**(5):497-514.

381. Vila M, Riobó P, Bravo I, Masó M, Penna A, Reñé A, Sala MM, Battocchi C, Fraga S, Rodriguez F *et al*: **A three-year time series Of toxic *Ostreopsis* blooming in a NW mediterranean coastal site: preliminary results.** In: *ICHA14 Conference Proceedings Crete: 2010*; 2010.

382. Amzil Z, Sibat M, Chomerat N, Grosseil H, Marco-Miralles F, Lemee R, Nezan E, Sechet V: **Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *Ostreopsis cf. ovata* blooms on the French Mediterranean coast.** *Mar Drugs* 2012, **10**(2):477-496.

383. Vanucci S, Pezolesi L, Pistocchi R, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Tartaglione L, Guerrini F: **Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis cf. ovata*.** *Harmful Algae* 2012, **15**(0):78-90.

384. Pistocchi R, Pezolesi L, Guerrini F, Vanucci S, Dell'aversano C, Fattorusso E: **A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*.** *Toxicon* 2011, **57**(3):421-428.

385. Morton SL, Norris DR, Bomber JW: **Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1992, **157**(1):79-90.