



TESIS DOCTORAL

FICOTOXINAS MARINAS: ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

Andrés Crespo Vieira

FACULTAD DE VETERINARIA
LUGO
2015





TESIS DOCTORAL

FICOTOXINAS MARINAS: ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

Asdo.

Andrés Crespo Vieira

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y
APLICADA EN CIENCIAS VETERINARIAS
FACULTAD DE VETERINARIA
LUGO**

2015



Prof. **Dr. D. Luis M. Botana López** como Director da tese titulada: “**Ficotoxinas mariñas: Estudos histopatolóxicos**”.

Pola presente **DECLARO:**

Que a tese presentada por **Don Andrés Crespo Vieira** é idónea para ser presentada, de acordo co artigo 41 do *Regulamento de Estudos de Doutoramento*, pola modalidade de compendio de ARTIGOS, nos que o doutorando tivo participación no peso da investigación e a súa contribución foi decisiva para levar a cabo este traballo.

E que está en coñecemento dos coautores, tanto doutores como non doutores, participantes nos artigos, que ningún dos traballos reunidos nesta tese serán presentados por ningún deles noutra tese de Doutoramento, o que asino baixo a miña responsabilidade.

Lugo, a de de 2015.

Asdo.: Luis M. Botana López



Prof. **Dr. D. José Manuel Cifuentes Martínez**, como Director da tese titulada: “**Ficotoxinas mariñas: Estudos histopatolóxicos**”.

Pola presente **DECLARO**:

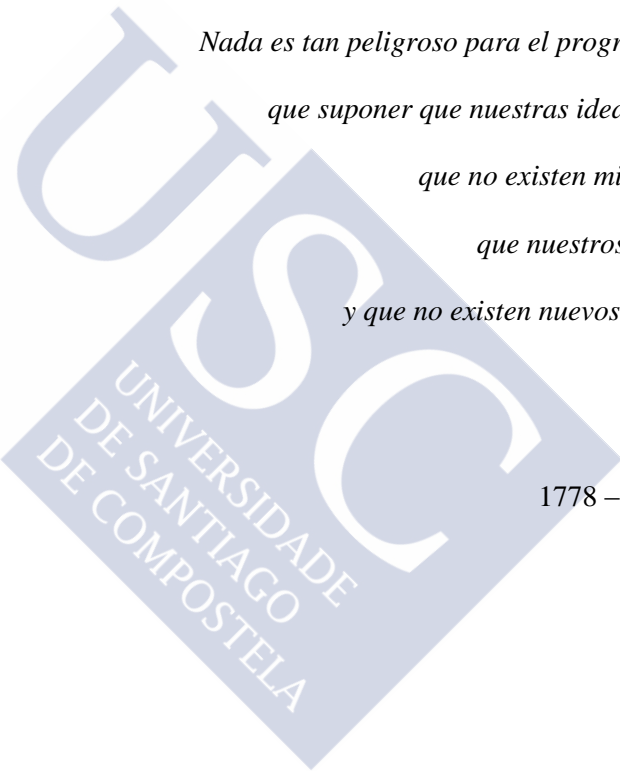
Que a tese presentada por **Don Andrés Crespo Vieira** é idónea para ser presentada, de acordo co artigo 41 do *Regulamento de Estudos de Doutoramento*, pola modalidade de compendio de ARTIGOS, nos que o doutorando tivo participación no peso da investigación e a súa contribución foi decisiva para levar a cabo este traballo.

E que está en coñecemento dos coautores, tanto doutores como non doutores, participantes nos artigos, que ningún dos traballos reunidos nesta tese serán presentados por ningún deles noutra tese de Doutoramento, o que asino baixo a miña responsabilidade.

Lugo, a de de 2015.

Asdo.: J. Manuel Cifuentes Martínez





*Nada es tan peligroso para el progreso de la mente humana
que suponer que nuestras ideas científicas son finales,
que no existen misterios en la naturaleza,
que nuestros triunfos son completos,
y que no existen nuevos mundos por conquistar.*

Humphry Davy
1778 – 1829 Químico británico





A mi padre





AGRADECIMIENTOS



Agradecimientos

Esta tesis no es fruto sólo de mi trabajo y dedicación, ya que considero que sin el apoyo de mucha gente nunca podría haberla realizado. Si los agradecimientos pudiesen ser tan extensos como yo realmente quisiera, ocuparían muchas páginas. No obstante, me veo en la obligación de ser más escueto.

En primer lugar quería agradecer al Dr. Luis M. Botana, por darme la oportunidad de venir a Lugo y poder realizar mi tesis doctoral en su laboratorio.

Al Dr. J. M. Cifuentes, por dedicarme muchísimas horas de su tiempo, sus consejos y sus enseñanzas. Y sobre todo por aguantarme como doctorando.

A las Dras. Amparo Alfonso, Eva Cagide, M. Carmen Louzao, Carmen Vale, Mercedes R. Vieytes, Natalia Vilariño y al Dr. Juan Rubiolo, por las sugerencias y el apoyo en el transcurso del trabajo.

A todo Departamento de Anatomía y Embriología, particularmente a la Dra. Nuria Alemañ y al Dr. Roberto Bermúdez, por su paciencia y sus consejos en el trabajo experimental, de redacción y estar ahí en el día a día. Sin ellos no sólo el trabajo hubiera sido muchísimo más duro de lo que fue sino que la presente tesis no sería una realidad. Muchas gracias por todo vuestro tiempo.

A mi viejo grupo de Biofarma de Santiago de Compostela, en especial a Patricio, a Beatriz, a Silvia y a Sonia, no estaría aquí sin todo el tiempo que estuve con vosotros, que aprendí mucho y me divertí más.

A toda mi gente de Lugo, tanto de mis dos departamentos como a los que conocí fuera de la facultad. Os merecéis cada uno de vosotros una dedicatoria personal, pero sois tantos que me veo en la obligación de daros las gracias en conjunto. Gracias a Álvaro, Andrea, Diego, Eva Alonso, Fernando, Ibán, Jon, Laura, María Fraga, María Roel, Marta, Mateus, Mercedes, Olalla, Paolo, Paula, Paz, Sandra, Sara, Silvia, Soraya, Víctor y William. En especial a aquellos que son compañeros de cañas, cafés y fatigas, sois lo mejor de Lugo.

A mi gente de Coruña, esa a la que conozco de hace años, que son mi argumento para decir que en Coruña hay muy buena gente. Esto va por Figui, Iria Cabado, María del Mar, Mena, Nacho, Poti, Richi, Sara, Sofía, Tarek, Tato, Vasco, Xacobe y Zapata.

Querría señalar a cuatro personas en particular: a Juan, porque ha sido un buen amigo desde hace más tiempo del que puedo recordar; a Roi (o Dr. Mera), por ser un compañero de fatigas inigualable; a Pedro, por sus conversaciones y apoyo constante; y a Vito, bueno, por ser como es.

A mis amigos de natación, porque quién me iba a mí a decir que hacer un deporte acabaría por darme un grupo de amigos tan cojonudo. A André Crespo, Carlos, Cris, Daniela, Iria Vieites, Miguel, Natalia y Stefano.

A mi familia. A mis tíos Charo y Luciano, a mis primos Marta y Pablo. A mi tío Juan y a mi prima Sabela, gracias por estar ahí y su apoyo y comprensión. A mi abuela, a mi tía abuela Chita, a mi tía Thelma, a mis primos Xoel, Alana, Miguel y Belencita. A mi madre. A mi tía Ana, por portarse como se portó en los momentos difíciles. A los que ya no están: a mi abuelo y a mi tío Moncho.

A mi hermana Belén, quien muchas veces en vez de hermana pequeña se tuvo que comportar como la mayor y ayudar al plasta de su hermano. Por ser como es, que nunca haya perdido la sonrisa y las ganas de vivir con todo lo que nos pasó, y haya hecho que yo nunca las haya perdido tampoco.

A Alba, a quien todos los agradecimientos del mundo serían insuficientes para demostrar todo lo que ha hecho por mí. Por perdonar todos mis defectos, por ser mi compañera en tanto en los momentos duros como en los felices y por haberme apoyado y querido siempre. Gracias de corazón.

Y por último a mi padre, a quien echo de menos cada día. Ojalá pudieras añadir este libro a tu biblioteca.



RESUMEN



RESUMO

Na presente tese doctoral abórdase o estudo dos efectos histopatolóxicos provocados pola intoxicación con ácido okadaico e ácido domoico, principais representantes dos seus respectivos grupos de toxinas mariñas: as toxinas diarreicas (DSP) e as toxinas amnésicas (ASP).

O estudo dos efectos do ácido okadaico realízase tras a administración oral da toxina en ratos, detectándose a súa presenza mediante técnicas inmunohistoquímicas nos riles e no fígado, órgano onde se observa unha importante necrose. Estudos moleculares mostran unha alteración da expresión de certas enzimas hepáticas relacionadas coa detoxificación, confirmando o dano producido no fígado.

A administración do ácido domoico por vía intraperitoneal pon en evidencia que as ratas son máis vulnerables ós efectos neurotóxicos da toxina que os ratos. Se ben a sintomatoloxía é similar en ambas especies, a letalidade é maior en ratas, presentándose lesións a nivel do sistema nervioso central nos individuos que sobreviven e detectándose inmunomarcaxe nas neuronas piramidais do hipocampo. As lesións máis destacadas inclúen a morte neuronal acompañada de astrocitosis e microgliosis de diferentes rexións do sistema límbico, así como calcificacións a longo prazo dalgunhas das zonas afectadas. Así mesmo descríbese por primeira vez a presenza da toxina na hipófise de ambas especies, feito trascendente que podería explicar algúns dos efectos desta toxina.

Os resultados obtidos nos ensaios con ambas toxinas axudan á comprensión sobre o seu mecanismo de acción e a súa toxicidade.

PALABRAS CHAVE

ficotoxinas, ácido okadaico, ácido domoico, amnesia, histoloxía

RESUMEN

En la presente tesis doctoral se aborda el estudio de los efectos histopatológicos provocados por la intoxicación con ácido okadaico y ácido domoico, principales representantes de sus respectivos grupos de toxinas marinas: las toxinas diarreicas (DSP) y las toxinas amnésicas (ASP).

El estudio de los efectos del ácido okadaico se realiza tras la administración oral de la toxina en ratones, detectándose su presencia mediante técnicas inmunohistoquímicas en los riñones y en el hígado, órgano donde se observa una importante necrosis. Estudios moleculares muestran una alteración de la expresión de ciertas enzimas hepáticas relacionadas con la detoxificación, confirmando el daño producido en el hígado.

La administración de ácido domoico por vía intraperitoneal pone en evidencia que las ratas son más vulnerables a los efectos neurotóxicos de la toxina que los ratones. Si bien la sintomatología es similar en ambas especies, la letalidad es mayor en ratas, presentándose lesiones a nivel del sistema nervioso central en los individuos que sobreviven y detectándose inmunomarcaje en las neuronas piramidales del hipocampo. Las lesiones más destacadas incluyen la muerte neuronal acompañada de astrocitosis y microgliosis de diferentes regiones del sistema límbico, así como calcificaciones a largo plazo de algunas de las zonas afectadas. Asimismo se describe por primera vez la presencia de la toxina en la hipófisis de ambas especies, hecho trascendente que podría explicar algunos de los efectos de esta toxina.

Los resultados obtenidos en los ensayos con ambas toxinas ayudan a la comprensión sobre su mecanismo de acción y su toxicidad.

PALABRAS CLAVE

ficotoxinas, ácido okadaico, ácido domoico, amnesia, histología

SUMMARY

In the present thesis we study the histopathological effects of the intoxication with okadaic acid and domoic acid, the main constituents of their respective groups: diarrhetic (DSP) and amnesic (ASP) toxins.

The study of okadaic acid effects is done after oral administration of the toxin in mice, and its presence is detected in the kidneys and in the liver, where a severe necrosis is observed. Molecular studies show an alteration in the expression of several hepatic enzymes, which supports the injuries observed in the liver.

The intraperitoneal administration of domoic acid shows that rats are more sensible to neurotoxic effects than mice. Although symptomatology is similar in both species, lethality is higher in rats, with injuries in the Central Nervous System of surviving individuals, and immunostaining is detected in the pyramidal neurons of the hippocampus. The more remarkable injuries include neuronal death accompanied by astrogliosis and microgliosis in several limbic system regions, and long-term calcification in some affected areas. Additionally, this is the first time that the presence of this toxin in the hypophysis is described, an important fact which may explain some of the toxic effects.

The results obtained in both toxin assays help to the understanding of their action mechanism and their toxicity.

KEYWORDS

phycotoxins, okadaic acid, domoic acid, amnesia, histology





ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

µg	Microgramo
µm	Micrómetro
AMPA	Ácido α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic
AO	Ácido okadaico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AZA	Azaspirácido
AZP	Intoxicación por azaspirácido
CA	Cuerno de Amón (<i>Cornus Ammonis</i>)
Ca ⁺²	Calcio
CAT	Catalasa
CFP	Intoxicación ciguatérica por consumo de pescado (<i>Ciguateric fish poisoning</i>)
CTX	Ciguatoxina
DG	Giro Dentado (<i>Dentate Gyros</i>)
DL ₅₀	Dosis letal 50
DMBA	Dimethylbenz(a)anthracene
DOM	Ácido domoico
DSP	Intoxicación diarreica por consumo de molusco (<i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i>)
DTX	Dinofisistoxinas
EEUU	Estados Unidos de América
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa endotelial (<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)

GFAP	Proteína gliofibrilar ácida (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
Glu	Glutamato
GluR	Receptor de glutamato
g	Gramo
GSH	Glutación
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HAB	Floración algal nociva (<i>Harmful algal Bloom</i>)
HMOX1	Heme oxigenasa 1 (<i>heme oxygenase 1</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High performance liquid chromatography</i>)
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
iGluRs	Receptores de glutamato ionotrópicos
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
KA	Ácido kaínico
Kg	Kilogramo
LC-MS/MS	Espectrometría de masas (<i>Liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS/MS</i>)
LOAEL	Nivel más bajo observado de efecto adverso (<i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>)
mg	Miligramo
mGluRs	Receptores de Glutamato metabotrópicos
mm	Milímetro
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal (<i>neuronal Nitric Oxide Synthase</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)

NOAEL	Nivel sin efecto adverso observable (<i>No-Observed-Adverse-Effect-Level</i>)
NOS	Óxido nítrico sintasa
NQO ₂	NAD(P)H dehidrogenasa, quinona 2
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NSP	Intoxicación neurotóxica por consumo de molusco (<i>Neurotoxic Shellfish Poisoning</i>)
PITX	Palitoxina
PP1	Serin-treonina proteína fosfatasa 1 (<i>Protein phosphatase 1</i>)
PP2A	Serin-treonina proteína fosfatasa 2A (<i>Protein phosphatase 2A</i>)
PSP	Intoxicación paralizante por consumo de molusco (<i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>)
PTX	Pectenotoxinas
p.v.	Peso vivo
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxide Species</i>)
s.c.	Subcutánea
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	Superóxido dismutasa-1
STX	Saxitoxina
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato
TSH	Tirotropina
YTX	Yesotoxina





ÍNDICE



ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. FICOTOXINAS	1
1.2. ÁCIDO OKADAICO	15
1.2.1. Organismos productores y distribución geográfica	15
1.2.2. Estructura química y mecanismo de acción	17
1.2.3. Estudios <i>in vitro</i>	19
1.2.4. Estudios histopatológicos	22
1.3. ÁCIDO DOMOICO	27
1.3.1. Organismos productores y distribución geográfica	27
1.3.2. Estructura y mecanismo de acción	30
1.3.3. Estudios toxicológicos	33
1.3.3.1. Toxicidad en la naturaleza	33
1.3.3.2. Toxicidad en animales de experimentación	38
1.3.3.3. Efectos histopatológicos.....	42
1.3.3.4. Relación del DOM con la edad	53
2.OBJETIVOS	59
3.PUBLICACIONES	63
3.1. Artículo 1. <i>Oral Toxicity of Okadaic Acid in Mice: Study of Lethality, Organ Damage, Distribution and Effects on Detoxifying Gene Expression</i>	63
3.2. Artículo 2. <i>Brain pathology in adult rats treated with sublethal doses of domoic acid</i>	66
3.3. Artículo 3. <i>Dose-response and histopathological study, with special attention to the hypophysis, of the differential effects of domoic acid on rats and mice</i>	68

4.DISCUSIÓN	72
5.CONCLUSIONES	88
6.BIBLIOGRAFÍA	92





INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN

1.1 FICOTOXINAS

Las algas planctónicas microscópicas (o microalgas) son organismos con un tamaño comprendido entre 2 y 200 μm , presentes tanto en agua dulce como de agua salada. Las microalgas conforman la principal fuente de alimento de muchos organismos filtradores, entre los que se encuentran los moluscos bivalvos. Por ello poseen un papel vital en los ecosistemas marinos, al constituir la base de la cadena alimenticia marina. La gran ubicuidad de las microalgas ocasiona que exista una amplia variedad de especies, que se clasifican en función de sus características morfológicas; en algunos casos coexisten especies de macroalgas y microalgas dentro de una misma división (Drews et al. 2013.).

Cuando las condiciones de temperatura, luz, salinidad y nutrientes son óptimas, se puede producir un crecimiento exponencial de estas especies, causando en algunos casos que las microalgas alcancen una concentración capaz de afectar a la vida marina, debido a la drástica reducción de oxígeno o bien por el bloqueo de la luz solar (Bower et al., 1981; Friedman and Levin, 2005). De las 5000 especies de microalgas conocidas, unas 300 son capaces de producir un cambio de color del agua debido a los pigmentos que poseen (James et al., 2010; Smayda, 1997). De ese modo las aguas pueden adquirir diferentes tonalidades, de las que el color rojizo o pardo es una de las más frecuentes. De ahí la denominación de “mareas rojas” o HABs, iniciales de “*Harmful Algal Blooms*” (Fig.1) (Daranas et al., 2001; Hallegraeff, 1993, 1995; Lindahl, 1998).



Fig. 1.- Fotografía aérea de una marea roja no tóxica producida por el dinoflagelado *Noctiluca scintillans* en las costas de Nueva Zelanda. Fotografía de Godfrey.

Estas proliferaciones de microalgas son en muchas ocasiones inofensivas para el ser humano, siempre y cuando se produzcan en zonas con una alta renovación de agua, aunque pueden causar alarma social innecesaria si las autoridades sanitarias o los consumidores no están bien informados. Es por ello necesario identificar y cuantificar las diferentes especies que están presentes a intervalos regulares.

La frecuencia de los HABs ha aumentado en los últimos años, pudiendo darse varias explicaciones a este hecho. El calentamiento de las aguas marinas causado por el cambio climático puede causar una expansión de especies que por lo general sólo se encontraban en bajas latitudes. También puede influir una mayor transferencia de productos marinos de una zona del globo a otras, lo que contribuye a la propagación de especies de microalgas desde sus hábitats originales a unos nuevos (Hallegraeff, 1993).

No hay que desdeñar tampoco la mejora de los mecanismos para su detección, por lo cual algunos investigadores hablan de un aumento aparente de los HABs (Orozco and Medlin, 2013). Dado que estos fenómenos han empezado a estudiarse en épocas relativamente recientes se desconoce si, previamente al control de los HABs, estos existieron en un número similar al detectado hoy en día (Reguera 2002). Asimismo, la cada vez más estricta legislación de los organismos de control para la detección de toxinas podría causar que eventos que previamente pasaban desapercibidos sean advertidos hoy en día.

Entre las microalgas responsables de la formación de estos HABs existe un grupo formado por unas 100 especies capaces de sintetizar toxinas marinas, también llamadas ficotoxinas. Muchas de estas especies productoras de toxinas marinas pertenecen principalmente a la división *Dinophyta* (dinoflagelados) y, en menor proporción, a la clase *Bacillariophyceae* (diatomeas).

El grupo de los dinoflagelados comprende unas 1500 especies (Gómez, 2005), de las cuales aproximadamente el 50% son autótrofas, aunque muchas de ellas se consideran mixotróficas (capaces de obtener energía de la fotosíntesis y de seres vivos) (Burkholder et al., 2008). El grupo de las diatomeas comprende de 10,000 a 12,000 especies, tanto autótrofas como heterótrofas, que se caracterizan por poseer una pared celular hecha de sílice opalino (dióxido de silicio hidratado) llamada frústula, que posee una gran variedad de formas (Norton et al. 1996).

Tanto los dinoflagelados como las diatomeas forman parte de la base de la cadena alimenticia. Por ello, debido a la resistencia de los organismos filtradores a sus efectos nocivos, las ficotoxinas producidas por estos dos grupos son capaces de afectar a peces, aves y mamíferos debido a su bioacumulación a través de la cadena trófica (James et al., 2010).

Aunque las microalgas no son los únicos organismos capaces de sintetizar toxinas marinas, ya que existen algunas especies de bacterias capaces de producirlas, constituyen el principal grupo productor (Kodama et

al., 1988). No siempre la presencia de las especies productoras implica la existencia de toxicidad, pues la concentración de los diferentes organismos en el agua es un importante factor a considerar. La concentración a partir de la que las microalgas son consideradas tóxicas es muy variable: oscilando desde bajas concentraciones ($10^2 - 10^4$ células/litro), caso de dinoflagelados productores del ácido okadaico, hasta las concentraciones celulares elevadas ($10^5 - 10^6$ células/litro), en el caso de las diatomeas productoras del ácido domoico (Reguera 2002).

Tanto la abundancia de los organismos productores como la toxicidad de sus metabolitos están influenciadas por la disponibilidad y concentración de determinados nutrientes. Por ejemplo, la producción de la saxitoxina por el dinoflagelado *A. tamarense* está determinada por la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en el medio donde se encuentran estos organismos (Anderson et al., 1990; Anderson et al. 2002).

Otro ejemplo de la influencia de determinados nutrientes es la mayor producción de ácido domoico por la diatomea *Pseudo-nitzschia multiseries* cuando la concentración de silicato es baja y una disminución de la generación de la toxina cuando este elemento se encuentra en elevadas concentraciones (Pan et al. 1996). Una explicación a este hecho es que la sílice no sólo es necesaria para la producción de la frústula sino que también es un elemento importante en varios procesos metabólicos, como la replicación del DNA. La disponibilidad de este nutriente afecta al metabolismo celular lo que puede conllevar a una producción mayor o menor de la toxina (Pan et al. 1996).

Los efectos de las ficotoxinas en seres humanos causan gran variedad de síntomas, entre los que se incluyen gastrointestinales (diarrea, vómitos, dolores abdominales), respiratorios, neurológicos (convulsiones, pérdida de sensibilidad, coma, amnesia), cardiovasculares (bradicardias), e incluso en última instancia son capaces de causar la muerte. Hasta el año 2000, se cree que una media de 60,000

individuos fueron afectados cada año, con una mortalidad del 1,5% (Munday and Reeve, 2013; Van Dolah, 2000; Wang, 2008).

Además de sus efectos nocivos en la salud, no se puede obviar el impacto económico que tienen estos HABs, producido por la prohibición de la recolección de marisco o la interrupción de las actividades de la acuicultura durante períodos de tiempo de duración variable. Dicho impacto económico ha ido creciendo progresivamente a lo largo de los años (Ferreira et al., 2014; Hoagland and Scatasta, 2006).

Las toxinas marinas pueden dividirse en diferentes grupos dependiendo del criterio que se emplee. Las clasificaciones más comunes se realizan teniendo en cuenta la estructura química de las ficotoxinas o bien atendiendo al tipo de intoxicación que causan. La división de las toxinas marinas en función de la sintomatología ocasionada sigue siendo bastante común y, aunque existe variabilidad a la hora de definir el número de grupos, por lo general se acepta su división en seis grupos diferentes (Daranas et al., 2001). Los seis síndromes descritos son: *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP); *Neurotoxic Shellfish Poisoning* (NSP); *Azaspiracid Poisoning* (AZP); *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP); *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP) y *Ciguateric Fish Poisoning* (CFP).

Sin embargo, la clasificación de las toxinas marinas en cuanto a su estructura química es la que está actualmente aceptada por la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (*Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO*), coincidiendo muchos de estos grupos con la división en función de su sintomatología (Tabla 1) (Toyofuku, 2006).

Tabla 1.- Clasificación de las ficotoxinas en función a su sintomatología y a su estructura química.

Ficotoxinas Marinas			
Clasificación por sintomatología		Clasificación por estructura química	
Grupo	Toxina representativa	Grupo	Toxina representativa
<i>Azspiracid Poisoning</i>	Azaspirácido	Ácido Domoico	Ácido Domoico
<i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>	Ácido Domoico	Ácido Okadaico y dinofisistoxinas	Ácido Okadaico
<i>Ciguatera Fish Poisoning</i>	Gambierol	Azaspirácidos	Azaspirácidos
<i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i>	Ácido Okadaico	Brevetoxinas	Brevetoxinas
<i>Neurotoxic Shellfish Poisoning</i>	Brevetoxinas	Iminas cíclicas	Espirólidos
<i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>	Saxitoxinas	Pectenotoxinas	Pectenotoxinas
		Saxitoxinas	Saxitoxinas
		Yesotoxinas	Yesotoxinas

La división en función de su estructura química nos permite diferenciar ocho grupos (Toyofuku, 2006):

1.- Azaspirácidos: causantes de AZP. La principal especie productora es el dinoflagelado *Azadinium spinosum* (Fig. 2) (Tillmann et al., 2009).

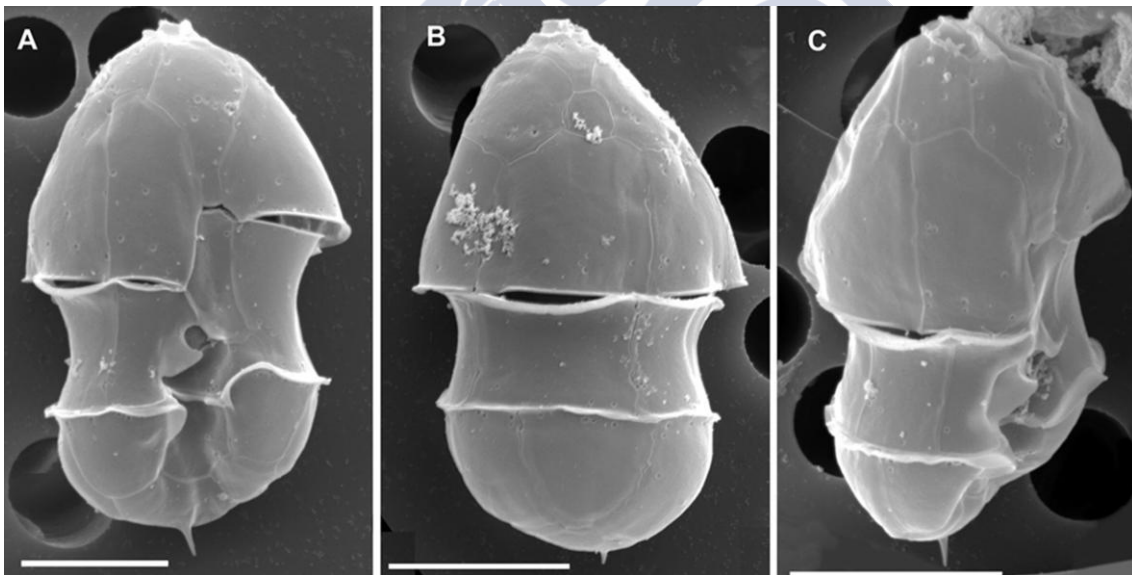


Fig. 2.- Microscopía electrónica de barrido. Vistas ventral (A), dorsal (B) y lateral (C) de *Azadinium spinosum*,. Escalas: 5 µm. Adaptado de Tillmann et al. (2009).

Al ser una de las toxinas de más reciente aparición tanto su mecanismo de acción como su diana farmacológica son aún desconocidos hoy en día (Botana et al., 2014; Chevallier et al., 2015; Vale et

al., 2007a, 2008). Su sintomatología fue definida a finales de los años 90, cuando se detectó una serie de intoxicaciones en consumidores caracterizadas por efectos similares a los de DSP (náusea, diarrea y dolores abdominales), aunque no se apreció la presencia de ninguna de las ficotoxinas de ese grupo en concentraciones elevadas (McMahon and Silke, 1996; Satake et al., 1998).

2.- Brevetoxinas: causantes de NSP. El NSP se desarrolla a causa de la ingesta de moluscos contaminados por brevetoxinas, producidas por el dinoflagelado *Karenia brevis* (Fig. 3) (Baden, 1983; Baden et al., 2005).

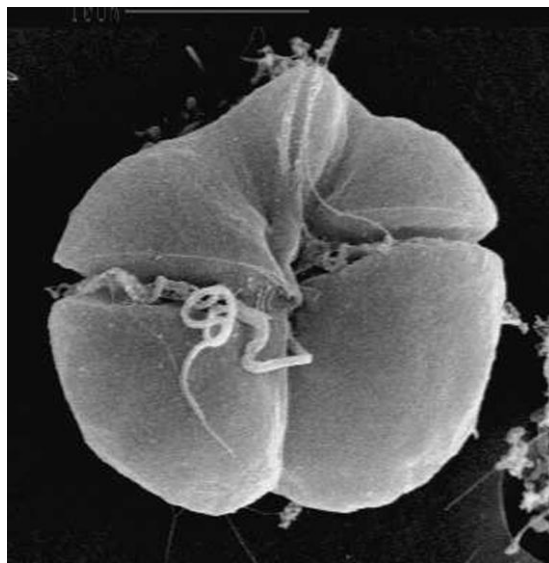


Fig. 3.- Microscopía electrónica de barrido. *Karenia brevis*. Adaptado de Florida Fish and Wildlife Conservation Commission.

Las toxinas de este grupo son moléculas despolarizantes que abren los canales de sodio, produciendo una entrada descontrolada de este ión en las células (Baden, 1983; Dechraoui et al., 1999). La sintomatología se caracteriza por síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos y diarrea) y neurológicos (pérdida de coordinación, dolores de cabeza y parálisis parcial de las extremidades) (Morris et al., 1991; Poli et al., 2000).

3. - Iminas cíclicas: se trata de un grupo heterogéneo de toxinas con estructura muy similar. La toxina más conocida de este grupo son los espirólidos, compuestos de reciente aparición producidos por dinoflagelados, entre los que destaca la especie *Alexandrium ostenfeldii* (Fig. 4) (Cembella et al., 2000).

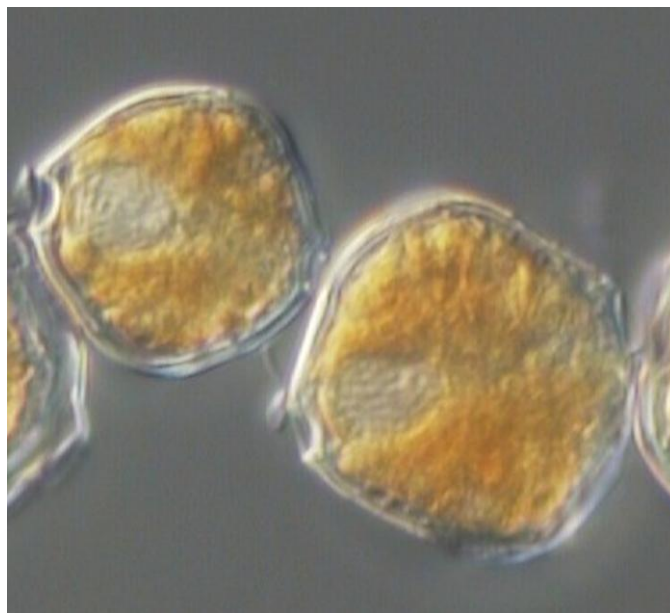


Fig. 4.- *Alexandrium ostenfeldii* en cultivo. Imagen adaptada de Lewis.

Su mecanismo de acción implica el bloqueo de la activación de los receptores colinérgicos nicotínicos, que poseen una importante función en la transmisión y modificación del impulso nervioso (Bourne et al., 2010; Role and Berg, 1996). Hasta el momento no se han descrito efectos en seres humanos atribuibles a este grupo de toxinas pero la toxicidad manifestada en los bioensayos hace que muchos autores cuestionen su actual estatus de toxinas sin control legal (EFSA 2010; Espiña et al., 2011; Otero et al., 2012; Wandscheer et al., 2010).

4.- Pectenotoxinas: Las pectenotoxinas (PTXs) son compuestos lipofílicos que se encontraron por primera vez en la vieira japonesa (*Patinopecten yessoensis*) (Yasumoto et al., 1985), y que han aparecido en otras partes del globo como Europa y Oceanía (Draisci et al., 1996; Pavela-Vrancic et

al., 2001; Suzuki et al., 2001; Vale and de M Sampayo, 2002). Son producidas por dinoflagelados del género *Dinophysis* (como *D. fortii* o *D. caudata*), al igual que el ácido okadaico y sus derivados, con los que parece coexistir (Fig. 5) (Luisa Fernández et al., 2006; MacKenzie et al., 2002; Miles et al., 2004).

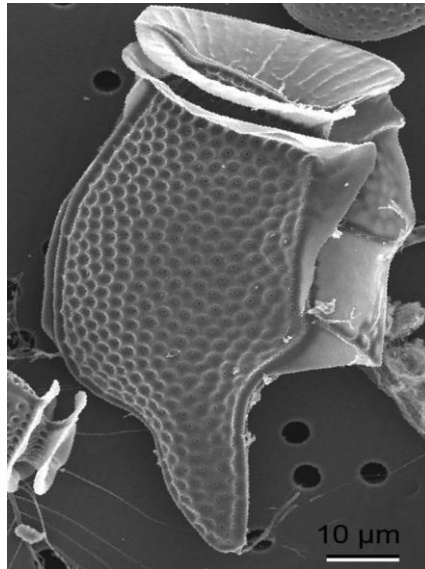


Fig. 5.- Microscopía electrónica de barrido. *Dinophysis caudata*. Imagen adaptada de Hansen (2009).

Estas toxinas fueron excluidas del grupo de las DSPs, ya que entre sus efectos tóxicos no se encuentra la diarrea (España and Rubiolo, 2008; España et al., 2010a; Miles et al., 2004; Terao et al., 1986). Se ha observado un importante daño en el hígado tras su administración intraperitoneal (i.p.) en ratones, caracterizado por la vacuolización de los hepatocitos de la zona periportal (Ito et al., 2008; Terao et al., 1986).

5.- Saxitoxinas: causantes de PSP. La intoxicación paralizante o PSP está causada por un grupo de compuestos de diferente toxicidad, de los que la saxitoxina (STX) es el referente del grupo. Estas ficotoxinas son producidas por dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* (Fig. 6) (Mons et al., 1998).

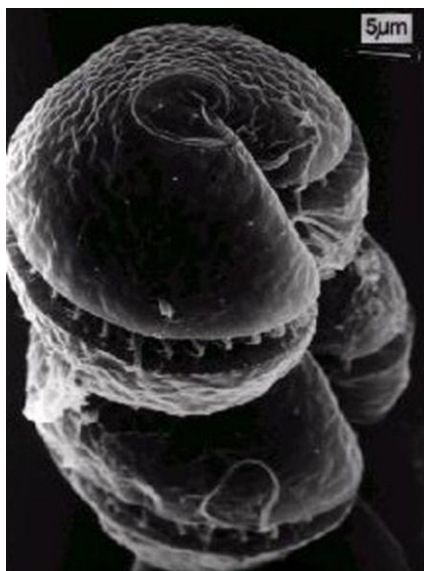


Fig. 6.- al Microscopía electrónica de barrido. *Gymnodinium catenatum*. Imagen adaptada de Fukuyo y Takayama.

Su mecanismo de acción se basa en la unión al sitio 5 de los canales de sodio presentes en las membranas de las células nerviosas, impidiendo la despolarización de la membrana y la transmisión del impulso nervioso (Wingerd et al., 2012). La intoxicación se caracteriza por efectos que oscilan desde un ligero cosquilleo e insensibilidad en los casos más leves, hasta la muerte por parada cardiorrespiratoria en los casos más graves (García et al., 2004; García et al., 2005; Llewellyn, 2006; Munday 2014).

6.- Yesotoxinas: La yesotoxina (YTX) fue aislada por primera vez en 1987 (Murata et al., 1987), coexistiendo con otras ficotoxinas diarreicas como el ácido okadaico. Sus organismos productores son dinoflagelados como el *Lingulodinium polyedrum* o el *Gonyaulax spinifera* (Fig. 7) (Howard et al., 2008).

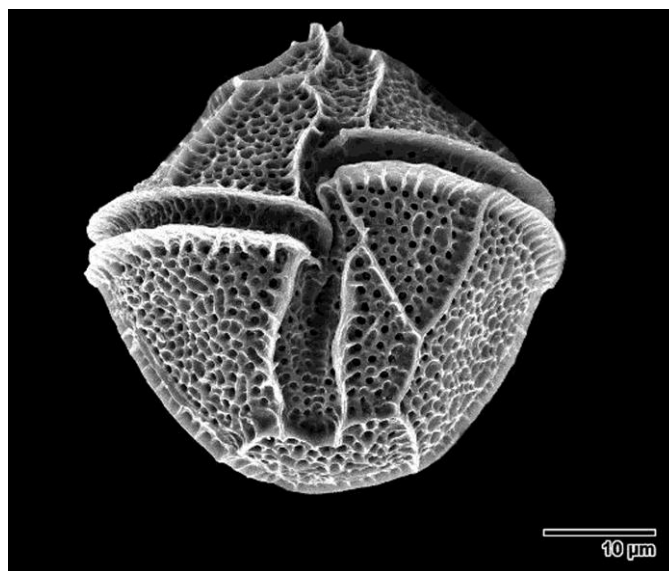


Fig. 7.-Microscopía electrónica de barrido. *Lingulodinium polyedrum*. Imagen adaptada de Faust y Whittaker.

Su mecanismo de acción se conoce bastante, aunque debido a su complejidad la diana no está plenamente identificada. Sin embargo, todas las evidencias indican que su mecanismo de acción es la fosfodiesterasa 4A, que a su vez modula numerosas otras funciones celulares (Alfonso et al., 2003; Fernández-Araujo et al., 2015; Rubiolo et al., 2013; Tobío et al., 2012). Una característica importante de la yesotoxina es su potencial como molécula guía (Botana et al., 2004a,b; Botana et al., 2011; Rubiolo et al., 2012; Rubiolo et al., 2011a)

Al igual que las PTXs, la YTX no produce diarrea y los bioensayos con dosis letales producen la muerte de los animales por fallo respiratorio (Ogino et al., 1997; Paz et al., 2008). Los estudios mediante microscopía electrónica muestran que su principal diana es el músculo cardíaco (Aune et al., 2002; Dell'Ovo et al., 2008; Sosa et al., 2013; Tubaro et al., 2010). No se tiene constancia de intoxicaciones en seres humanos, y existen serias dudas de que sea un compuesto tóxico desde el punto de vista de la seguridad alimentaria (EFSA 2008a)

7.- Ácido okadaico (AO) y dinofisistoxinas. El AO es la principal toxina responsable del DSP y las dinofisistoxinas son toxinas derivadas del AO. Sus organismos productores son dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum*. El mecanismo de acción se basa en la inhibición de las fosfatasa de serina-treonina y su sintomatología se caracteriza por la aparición de diarrea (EFSA 2008b). En el siguiente capítulo se desarrollara con mayor profundidad el estudio de esta toxina.

8.- Ácido domoico (DOM): El DOM y sus análogos son las responsables de la intoxicación amnésica o ASP. El mecanismo de acción de esta neurotoxina se basa en su gran afinidad por los receptores de glutamato ionotrópicos, muy abundantes en ciertas regiones del encéfalo. Estas toxinas se caracterizan por causar síntomas gastrointestinales (náusea, diarrea, vómitos), y síntomas neurológicos en los casos más graves, como alucinaciones, pérdida de memoria a corto plazo y coma, llegando incluso a causar la muerte (Costa, 2010; EFSA, 2009a; Pulido, 2008; Ramsdell 2007). El mecanismo de acción del DOM y sus efectos histopatológicos constituyen uno de los temas centrales del trabajo que se presenta en la presente tesis y se desarrollará pormenorizadamente en el capítulo correspondiente.

9.- Otras toxinas: Además de los ya mencionados es preciso incluir dos grupos más que a la clasificación realizada: el grupo de la palitoxina (PITX) y el grupo de la ciguatoxina (CTX) (EFSA 2008b).

La PITX es un compuesto extremadamente grande y complejo, que fue purificado e identificado en corales de la familia *Zoanthidae* en el año 1971 (Moore and Scheuer 1971), siendo posteriormente identificado dicho coral como *Palythoa toxica* (Walsh and Bowers 1971). El mecanismo de acción de esta ficotoxina se basa en su unión a la bomba de sodio-potasio. Al unirse la PITX a esta ATPasa, se facilita el flujo de los iones a favor de su gradiente de concentración, igualándose así las concentraciones de sodio y potasio extracelulares y citoplásmicas, con lo que se paraliza el

movimiento activo de iones (Alfonso et al., 2012; Espiña et al., 2009; Hilgemann 2003; Vale et al., 2006, 2007b; Vale-Gonzalez et al., 2007; Wu 2009). Una alteración de la concentración de los iones por sí sola ya es capaz de causar la muerte celular, pero asimismo la PITX produce otros importantes efectos farmacológicos, como la contracción del músculo esquelético y cardíaco, alteraciones en el citoesqueleto, hemólisis o agregación de plaquetas (Fernandez et al., 2013; Louzao et al., 2011; Ramos and Vasconcelos 2010; Silva et al., 2015; Tubaro et al., 2014).

La PITX es uno de los compuestos más tóxicos que se han descrito hasta el momento, aunque su toxicidad oral se reduce mucho (Fernandez et al., 2013). En ratones, vía oral su dosis letal 50 (DL₅₀, la dosis requerida para producir la muerte de la mitad de los sujetos de experimentación tras un período de tiempo determinado) es de 767 µg/kg (Munday 2014; Sosa et al. 2009). Los daños causados se producen principalmente en el estómago, observándose también lesiones de pulmón, corazón, hígado y páncreas (Ramos and Vasconcelos 2010; Sosa et al. 2009).

Se han descrito varias intoxicaciones, algunas mortales en seres humanos (EFSA 2009b). La sintomatología es muy variada: sabor metálico, dolores abdominales, náuseas, vómitos, diarrea, bradicardia, y fallo renal. En los casos más graves se detecta también cianosis y fallo respiratorio, precediendo estos síntomas a la muerte (EFSA 2009b).

Por último, el grupo de la CTX es responsable del síndrome CFP, causado por el consumo de peces contaminados con toxinas producidas por el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* (Figura 8).

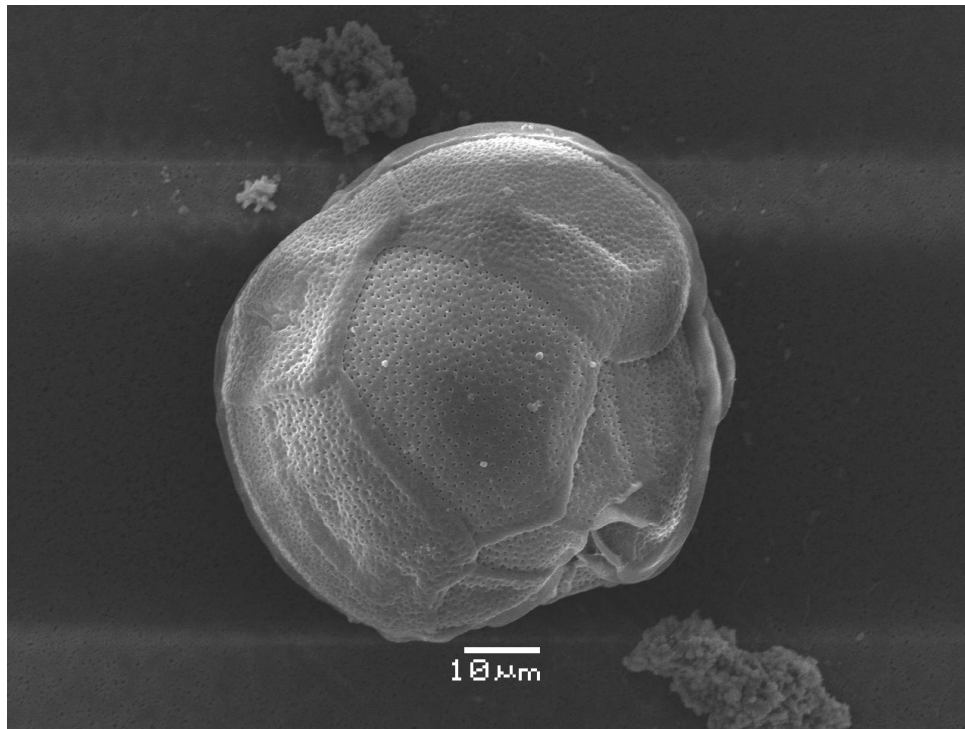


Fig. 8.- Microscopía electrónica de barrido. *Gambierdiscus toxicus*. Elaboración propia.

La CTX no es la única toxina responsable de causar CFP, estando otras dos toxinas frecuentemente presentes en las intoxicaciones: la maio toxina y el gambierol, producidas por el mismo dinoflagelado (Satake et al. 1993). La CTXs posee una alta afinidad por el canal de sodio; al unirse a él se produce una apertura prolongada del canal causando alteraciones en la transmisión del impulso nervioso (Lehane and Lewis 2000; Wingerd et al., 2012). Los estudios *in vivo* realizados en ratones mostraron un descenso de la temperatura corporal, relacionado con el efecto neurotóxico de la CTX en el hipotálamo (Peng et al. 1995). A la hipotermia se le añade la capacidad diarreica de esta toxina. Los estudios histológicos mostraron alteraciones en el intestino de ratones intoxicados, siempre y cuando sobrevivan a los efectos neurotóxicos (Lehane and Lewis 2000). En gatos, la administración de CTX por vía intravenosa provoca alteraciones respiratorias (hiperventilación a dosis bajas y fallos respiratorios a altas dosis) y cardiovasculares (bradicardia a dosis bajas y taquicardia a dosis subletales, produciendo paro cardíaco con las dosis más altas) (Legrand et al. 1982).

La toxicidad en seres humanos está caracterizada por síntomas gastrointestinales (náuseas, diarrea y dolores abdominales), cardiovasculares (bradicardia), así como por síntomas neurológicos como dolores de cabeza, alucinaciones y vértigo. En algunos casos se produce la hospitalización de los afectados e incluso la CTX ha llegado a causar la muerte (Lehane 1999; Quod and Turquet, 1996; Tatnall et al. 1980).

1.2 ÁCIDO OKADAICO

1.2.1. Organismos productores y distribución geográfica

Tanto el AO como sus derivados, las dinofisistoxinas (DTXs), constituyen el grupo más conocido de las toxinas pertenecientes a las DSPs. Las DTXs son moléculas de menor toxicidad que el AO, y de las que se han descrito hasta 5 tipos diferentes: de la DTX-1 a la DTX-5. La DTX-1 y la DTX-2 son moléculas análogas del AO, mientras que la DTX-3 se produce por la agregación de un grupo acilo al AO y a la DTX-2 (James et al., 1999). Finalmente las DTX-4 y DTX-5 son precursores diol éster del AO (Reguera et al., 2014). Tanto el AO como las DTXs causan efectos similares en los seres humanos.

A pesar de que el AO se había aislado en un primer momento de esponjas del género *Halichondria* (en concreto de las especies *Halichondria okadai* y *Halichondria melanodocia*) (Bialojan and Takai, 1988; Tachibana et al., 1981; Vale and Botana, 2008), los verdaderos productores de estas ficotoxinas son los dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* (principalmente *D. acuta*, *D. acuminata*, y *D. fortii*) y *Prorocentrum* (*P. lima* y *P. concavum*) (Fig. 9) (An et al., 2010; Dickey et al., 1990; Dominguez et al., 2010; FAO, 2004; Hu et al., 1995; Lee et al., 1989; Murakami et al., 1982; Valdiglesias et al., 2013b).

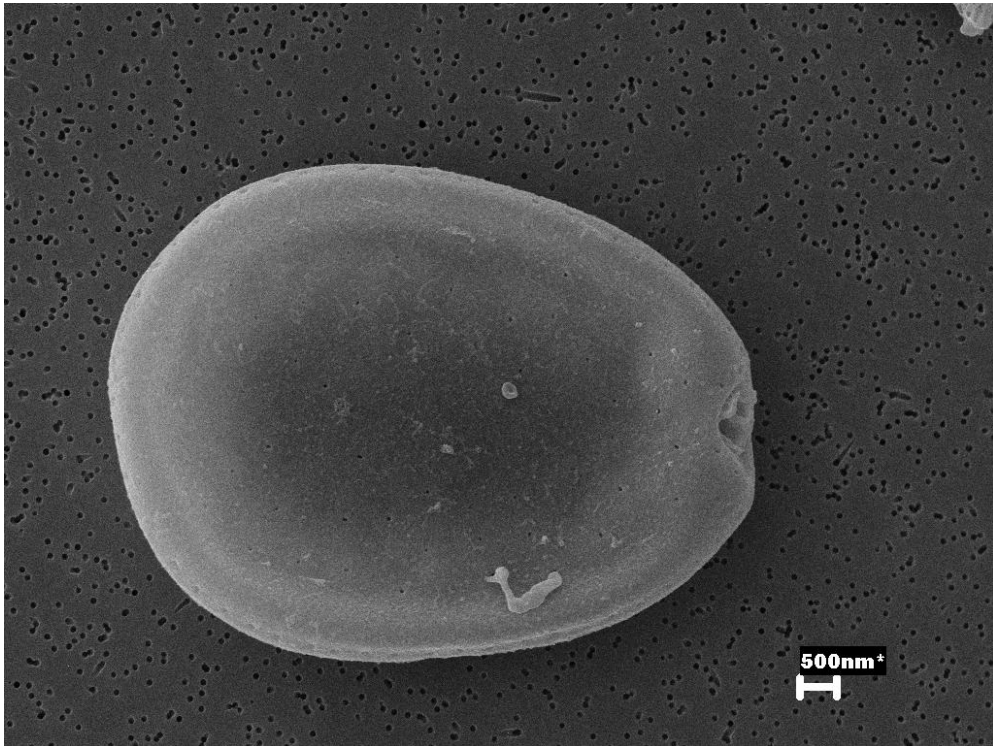


Fig. 9.- Microscopía electrónica de barrido. *Prorocentrum lima*. Elaboración propia.

Los primeros casos de DSP se producen en los Países Bajos (Kat 1983, 1985), observándose intoxicaciones posteriormente en Japón, donde se identifica al AO como el agente causante (Murata et al., 1982; Yasumoto et al., 1978, 1980). En la actualidad, el AO es el principal causante de DSP en Europa, detectándose también en África (Marruecos y Túnez), América (costas este y oeste de EEUU, el Caribe y Chile), Asia (China y Japón) y Oceanía (Nueva Zelanda), como queda reflejado en el mapa de la Figura 10 (Chen et al., 2013; Elgarch et al., 2008; Kumagai et al., 1986; Zamorano et al., 2013).



Fig. 10.- Localizaciones en las que se ha confirmado la presencia de AO y/o DTXs.

1.2.2. Estructura química y mecanismo de acción

Tanto el AO como las DTXs son compuestos que contienen anillos tipo piranósicos y furanósicos así como una función alfa-hidrocarboxilo (Fig. 11) (Dominguez et al., 2010). Las diferencias entre los diferentes compuestos de este grupo se deben sólo al número o a la posición de los grupos metilo (Dominguez et al., 2010). El AO y las DTXs son capaces de estar presentes simultáneamente en los organismos filtradores afectados, así pues no es de extrañar que se detecten diferentes niveles de cada uno de los compuestos cuando se produce una intoxicación. Una fracción importante de los compuestos tóxicos que se encuentran en los bivalvos que acumulan estas ficotoxinas se compone de las formas con grupos acilos, aunque existen variaciones en función de la especie de bivalvo analizada (Dominguez et al., 2010). Como estos derivados sólo se detectan en el cuerpo de los bivalvos se cree que podría ser producto del metabolismo del animal y, por tanto, no serían producidos por las microalgas (Wright, 1995).

que no inhibe las fosfatasa, sí altera notablemente la estructura del citoesqueleto (España et al., 2010b; Munday 2013; Vilariño et al., 2008).

1.2.3. Estudios *in vitro*

El control de la integridad del citoesqueleto por parte de las fosfatasa de proteína juega un papel muy importante, dado que su desregulación podría afectar a las uniones intercelulares y a la capacidad de adhesión de la célula (Eriksson et al., 1992; Opsahl et al., 2013). Los ensayos realizados con AO en diferentes cultivos celulares, tanto humanos como animales, mostraron una serie de alteraciones morfológicas (condensación de la cromatina, redistribución de los orgánulos, formación de vacuolas) que se relacionan con el proceso de la apoptosis o muerte celular programada (Blankson et al., 1995; Boe et al., 1991, 1991b; Inomata et al., 1995; Jayaraj et al., 2009; Kim et al., 2003; Leira et al., 2001b). Existe una relación muy estrecha entre la desorganización del citoesqueleto y la apoptosis, siendo esta desorganización uno de los pasos previos a la muerte celular programada.

Las alteraciones del citoesqueleto se observaron también en células hepáticas, incluso llegando a perder las células su morfología habitual (Berven et al., 2001; Blankson et al., 1995; Reaven et al., 1993). Esta hepatotoxicidad, comprobada en varios modelos celulares, es considerada por algunos investigadores como un factor determinante de la letalidad del AO (Berven et al., 2001; Blankson et al., 1995; Rubiolo et al., 2011b).

La neurotoxicidad causada por el AO ha sido estudiada en numerosos ensayos *in vitro*. Al administrar esta ficotoxina a diversos cultivos de células neuronales se produce una hiperfosforilación de la proteína tau, así como una pérdida de las sinapsis y por ende, la modificación de la red neuronal (Arias et al., 1993; Caillet-Boudin and Delacourte, 1996; Candeo et al., 1992; Kamat et al. 2013; Kim et al., 1999; Malchiodi-Albedi et al., 1997; Sautière et al., 1993; Tapia et al., 1999). La proteína tau es

responsable de la estabilización de los microtúbulos de los axones de las neuronas, su hiperfosforilación produce una alteración de esta función, y es una de las principales causas de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Otras proteínas, como las que conforman los neurofilamentos (constituyentes de los filamentos intermedios de las neuronas), también se alteran al hiperfosforilarse (Wang et al., 2001).

La actividad proteína-fosfatasa es muy importante en los mecanismos de neuroprotección, su inhibición puede causar un desequilibrio en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo cual causa estrés oxidativo e induce la muerte neuronal (Tapia et al., 1999; Yi et al., 2009). El AO también parece causar la presencia de autofagosomas (cuerpos que digieren partes de las células y contienen orgánulos en descomposición), como parte de un proceso que está relacionado con la neurodegeneración y muerte celular (Yoon et al., 2008).

Por último, la capacidad inhibitoria de las proteína-fosfatasas se ha relacionado con ciertas propiedades oncogénicas del AO observadas *in vitro* (Fujiki and Suganuma, 1993; Fujiki et al., 1992; Suganuma et al., 1988), que luego se confirmaron con estudios *in vivo*. Los promotores tumorales se clasifican en dos grupos, los tipo 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA), capaces de unirse a receptores de ésteres de forbol en la superficie celular y activar la de la proteína kinasa C; y los no-TPA, que no promueven la generación de tumores a través de esta vía (Fujiki et al., 1987). El AO y las DTXs forman parte de este segundo grupo, y su capacidad oncogénica se debe a la inhibición de las PP1y PP2A (Fujiki et al., 1991; Suganuma et al., 1988). Una característica que sí comparte el AO con los promotores tipo TPA es la capacidad angiogénica (formación de nuevos vasos sanguíneos), que es un proceso crucial para la propagación y extensión de los tumores (Oikawa et al., 1992). Aunque no hay estudios que puedan relacionar la incidencia del cáncer en la población y el AO, a nivel molecular la adicción de AO a cultivos neuronales humanos produce la alteración de la expresión de un grupo de genes relacionados con el cáncer (Valdiglesias et al. 2013a); con lo cual se comprueba que el AO posee un marcado papel

oncogénico que no debería ser desdeñado. Un resumen de las principales actividades *in vitro* de esta toxina está reflejado en la Figura 12.

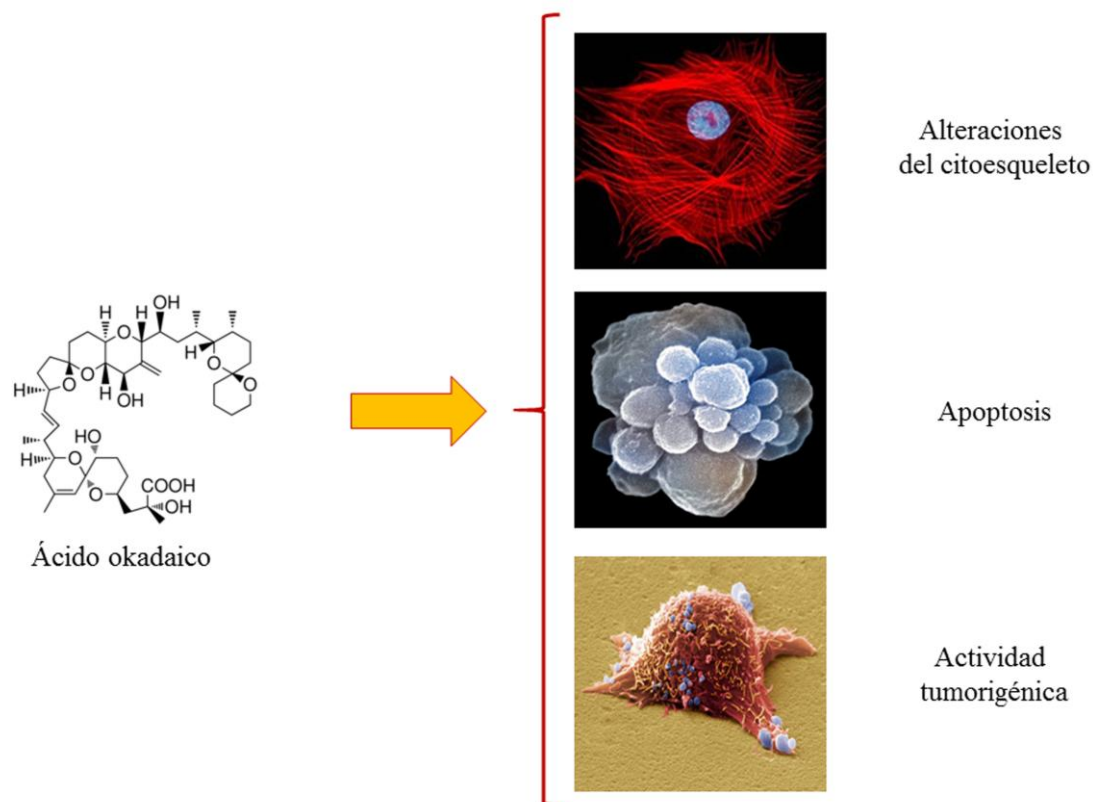


Fig. 12.- Principales actividades *in vitro* del AO.

A pesar de que por lo general se considera que la inhibición de la actividad de PP1 y PP2A por parte del AO es la causante de su toxicidad, han surgido recientemente voces discordantes que cuestionan que esta capacidad sea determinante, dado que no existe una proporción entre la actividad inhibitoria y los efectos tóxicos observados, otros inhibidores de la actividad proteín-fosfatasa ya conocidos (como la tautomicina) no ejercen los mismos efectos que el AO y sus derivados (Munday, 2013), y el metil okadaato, que no inhibe las fosfatasas, sí altera los microtúbulos celulares (España et al., 2010b).

Tanto el AO como las DTXs son capaces de afectar a procesos muy diversos, lo que convierte a este grupo de toxinas en uno de los más estudiados tanto *in vitro* como *in vivo* y uno sobre los que se tiene más información acerca de sus efectos.

1.2.4. Estudios histopatológicos

La intoxicación por AO en seres humanos produce una sintomatología que se convertiría en la característica de las toxinas del grupo de las DSPs: diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal. Los vómitos y la diarrea son los síntomas más abundantes, detectándose en un 92% (vómitos) y en un 79% (diarrea) de los afectados en el caso de la intoxicación ocurrida en Japón en los años 70 (Dominguez et al., 2010; Yasumoto et al, 1978). Los síntomas comienzan entre 30 minutos y unas pocas horas después de la ingestión del marisco contaminado, sin que se suela requerir la hospitalización de los afectados. La recuperación completa ocurre en unos tres días, sin haberse relatado ningún síntoma o efecto a medio o largo plazo tras la exposición al AO o a las DTXs (Kat, 1983; Valdiglesias et al., 2013b; Yasumoto et al., 1978, 1985). Se estima que la dosis mínima para producir síntomas en seres humanos adultos es de 48 µg de AO por individuo (Dominguez et al., 2010).

Hasta el momento pocos organismos además de los seres humanos se han confirmado como afectados por el AO o sus análogos. Como única referencia de presencia de AO en seres vivos diferentes a la especie humana podemos citar la presencia de AO en concentraciones muy bajas en delfines “nariz de botella” (*Tursiops truncatus*), durante un HAB ocurrido en Texas, EEUU (Fire et al. 2011). Sin embargo, no sería extraño que pueda afectar a muchos otros organismos dada su amplia distribución, pasando las intoxicaciones desapercibidas debido a la levedad de los síntomas.

Las intoxicaciones ocurridas en seres humanos han permitido a los organismos regulatorios fijar tanto el LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*, la concentración más baja de una sustancia que

causa una alteración en la morfología, el desarrollo o la funcionalidad de un organismo), en 50 µg AO/persona, lo que se traduce en aproximadamente 0,8 µg/kg; así como el NOAEL o “Nivel sin efecto adverso observable” (*No-Observed-Adverse-Effect-Level*, la máxima concentración de un tóxico que no causa alteraciones adversas), fijado en 0,3 µg/kg (EFSA 2008). Aunque es preciso tener en cuenta que son datos basados en estimaciones sobre la cantidad de marisco contaminado ingerida así como en la cantidad de AO que llega al organismo.

Los ensayos de toxicidad del AO y las DTXs en animales de experimentación han mejorado la comprensión de los mecanismos de acción de estas ficotoxinas. Se realizaron un gran número de ensayos para determinar tanto la letalidad como la patología.

La DL₅₀ del AO tras su administración por vía i.p. oscila entre valores de 192 y 225 µg/kg (Aune et al., 2007; Dickey et al., 1990; Tubaro et al., 2003). En cuanto a las DTXs, existe cierta variabilidad entre los diferentes subtipos. La DL₅₀ vía i.p. de la DTX1 es similar a la del AO, del orden de 160 µg/kg (Aune 2008), mientras que la DL₅₀ de la DTX2, aproximadamente 350 µg/kg, implica una menor potencia de este análogo (Aune et al., 2007).

El AO posee una menor toxicidad al ser administrado vía oral, aunque la variabilidad es mayor. Ensayos realizados en el año 2003 en ratones mostraron que una dosis oral de 1 mg/kg no producía la muerte a ningún ejemplar, mientras que la dosis de 2 mg/kg causaba una letalidad del 80% (Tubaro et al. 2003). El grupo de Le Hégarat y colaboradores empleando dosis de AO comprendidas entre 510 y 625 µg/kg muestran que en un primer experimento todos los ratones intoxicados sobreviven, mientras que en un segundo experimento se produce la muerte de todos los ejemplares (Le Hégarat et al., 2006). Los últimos ensayos de administración oral en ratones se realizaron en el año 2012, estimándose una DL₅₀ de 880 µg/kg (Aune, 2012).

Independientemente de la ruta de administración, la causa de la muerte también es muy variable: mientras que algunos investigadores afirman que la muerte de los especímenes se produce por parálisis respiratoria (Dickey et al., 1990; Munday, 2013), otros autores consideran que es debida a un shock hipovolémico causado por una hemorragia en el hígado (Ito and Terao, 1994).

Los efectos histopatológicos del AO han sido ampliamente estudiados. Los primeros ensayos realizados con el homogeneizado de hepatopáncreas de mejillón (*Mytilus edulis*) contaminado muestran una rápida secreción de fluidos al ser inyectado en el intestino delgado de ratas (Edebo et al., 1988). Posteriormente, se comprobarían los efectos de la administración oral e i.p. de AO y DTXs en roedores, observándose la aparición de diarrea y el daño producido en ambos intestinos: las microvellosidades del intestino delgado aparecen fusionadas y se produce una alteración de las glándulas de Lieberkühn, estructuras encargadas de renovar el revestimiento intestinal presentes en el intestino grueso (Fig. 13) (Berven et al., 2001; Ito and Terao, 1994; Ito et al., 2002b).



Fig. 13.- Mucosa intestinal de una rata tras 4 horas de una administración de AO, mostrando una arquitectura irregular producida por la fusión de las microvellosidades. X 150. Adaptado de Berven et al. 2001.

La alteración de filamentos intermedios de citoqueratina observada en hepatocitos aislados (Blankson et al., 1995) conduciría a pensar en un posible efecto hepatotóxico del AO. Las lesiones en este órgano finalmente se comprobarían tras la administración intravenosa (i.v.) de AO en ratas, viendo que a pesar de que los hepatocitos están intactos, el hígado posee una gran acumulación de sangre a nivel histológico (Fig. 14) (Berven et al., 2001).

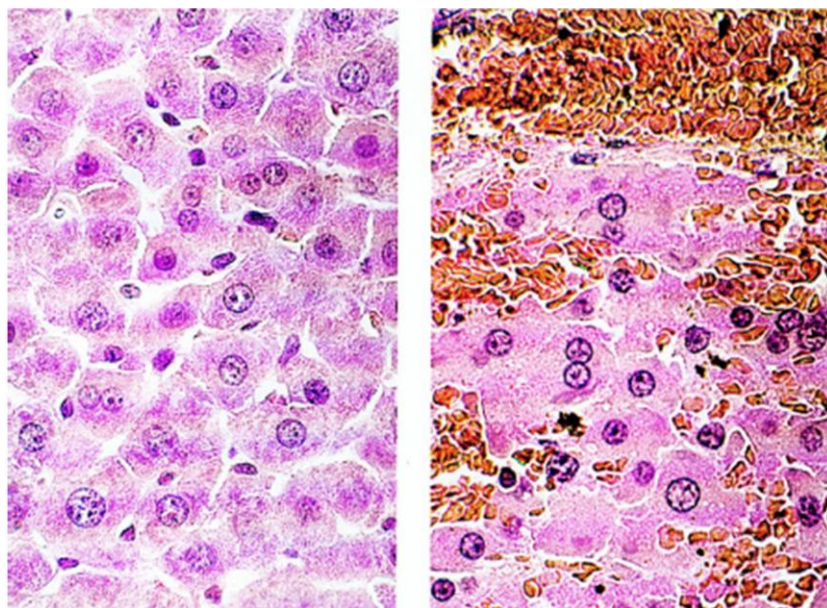


Fig. 14.- Fotomicrografía de hígado de una rata control (izquierda) y de una rata tratada con AO vía i.v. (derecha). Se observa observar la importante hemorragia hepática en el espécimen intoxicado. X 600. Adaptado de Berven et al., 2001.

La administración de AO vía i.v. no produjo la diarrea que sí estaba presente en los roedores al administrar la toxina intragástricamente, lo que explica que la vía de administración influye en la patología producida.

Además de en el aparato digestivo, se describen daños en pulmones, donde se observan pequeños edemas (Ito et al., 2002b); así como en el sistema inmune, siendo el AO capaz de producir lesiones en el timo y en el bazo (Franchini et al., 2005). El daño en el timo se refleja en forma de una intensa depleción

de los timocitos (células hematopoyéticas que darán lugar a los linfocitos T), una desorganización del complejo epitelial de la corteza y la aparición de áreas angiogénicas; mientras que en el bazo las lesiones comprenden una significativa pérdida de volumen y una aguda respuesta inmune caracterizada por la presencia de granulocitos y macrófagos (Franchini et al., 2005). La capacidad del AO de afectar a estos órganos relacionados con la inmunidad del organismo no es desdeñable, pudiendo estar relacionada esta inmunotoxicidad con la capacidad tumorigénica apuntada por otros investigadores.

La neurotoxicidad observada en cultivos celulares pudo confirmarse en diversos ensayos *in vivo*. La administración de esta ficotoxina directamente en el hipocampo de ratas produjo alteraciones de su comportamiento (hiperexcitabilidad y temblores) que se relacionaron, una vez realizado el análisis histológico, con una importante pérdida de células piramidales del hipocampo (Arias et al., 1998; He et al., 2001, 2005; Kamat et al. 2013; Ramirez-Munguia et al., 2003). No sólo se produce una pérdida de neuronas piramidales, sino que se observa también la muerte de células de la glía (células que ejercen una función de soporte y nutrición de las neuronas) (Costa et al. 2012). Al verse afectado el hipocampo, es comprensible que la memoria espacial estuviese afectada, al ser el hipocampo la principal región del Sistema Nervioso Central (SNC) implicada en este proceso (Zhang and Simpkins, 2010). Las alteraciones en la memoria espacial finalmente se confirmarían *in vivo* tras realizar diversos test que evalúan las alteraciones del comportamiento (como el test *Morris water maze*) (He et al., 2001; Kamat et al. 2010, 2011; Song et al. 2013; Tian et al., 2004).

La capacidad del AO y de la DTX-1 para producir tumores en diversos órganos fue demostrada por Sukanuma y colaboradores. Comprobaron que mientras que la inoculación en la piel de ratones de un importante agente carcinógeno (el dimethylbenz(a)anthracene, o DMBA) por sí solo no producía un número elevado de tumores, la inoculación del AO en combinación con el DMBA causaba un alto porcentaje de tumores (en alrededor del 90% de los ratones tratados). Estos tumores eran en su mayoría

papilomas (tumores benignos de las células epiteliales) y, en menor medida, sarcomas (tumores malignos) (Suganuma et al., 1988, 1989). Posteriormente se comprobó que el AO actuaba también como promotor tumoral en ratas, causando un aumento de las hiperplasias y adenocarcinomas iniciados por un mutágeno (la N-methyl-N²-nitro-N-nitrosoguanidina) en el estómago (Suganuma et al., 1992). Aunque por sí solo el AO es la causa de algunos de los tumores observados (Suganuma et al., 1988), su eficacia se alcanza al ir en combinación con otros agentes mutagénicos.

Por tanto, los resultados observados en los ensayos *in vivo* corroboran los obtenidos *in vitro*, convirtiendo al AO y a sus derivados DTXs en una de las ficotoxinas con efectos más diversos. A pesar de que es el principal constituyente de las DSPs, los efectos diarreicos no son los únicos que se deberían tener en cuenta, pudiendo causar esta ficotoxina graves alteraciones en otros tejidos (como el hígado o el encéfalo) además de su principal diana (el intestino).

1.3 ÁCIDO DOMOICO

1.3.1 Organismos productores y distribución geográfica

El DOM es la principal toxina causante del ASP, cuyo nombre hace referencia a la capacidad de afectar a la memoria a corto plazo. Este síndrome tiene su origen en el año 1987, cuando un grupo de personas en la isla Príncipe Eduardo (Canadá) sufrió una grave intoxicación alimenticia debido al consumo de mejillones azules (*Mytilus edulis*) contaminados. Entre los síntomas que se detallaron estaban síntomas gastrointestinales (dolores abdominales, vómitos) y neurológicos, como la pérdida de memoria a corto plazo (Hallegraeff, 1995; Perl et al., 1990; Teitelbaum et al., 1990). Debido a este último signo se denominó a este tipo de intoxicación como *Amnesic Shellfish Poisoning* (Perl et al., 1990).

El DOM se identificó en un primer momento en el año 1957 en la macroalga *Chondria armata* en la costa sureste de Japón (Takemoto and Daigo, 1958), siendo posteriormente identificadas las diatomeas de los géneros *Pseudo-nitzschia* y *Amphora* como los principales organismos productores de esta toxina (Fig. 15) (Bates, 2000; Lefebvre and Robertson 2010).

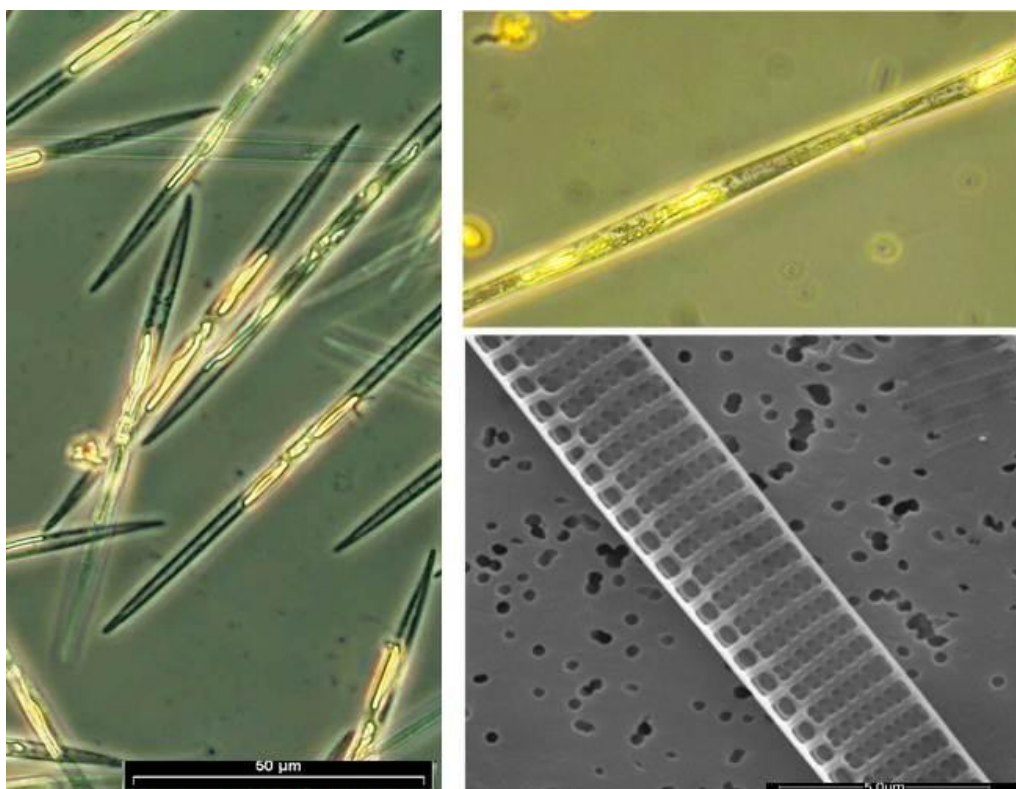


Fig. 15.- *Pseudo-nitzschia pungens*. Imágenes modificada de Hansen (2011).

El evento ocurrido en la isla Príncipe Eduardo ha sido la intoxicación más grave por DOM hasta la fecha y la que ha disparado las alarmas sobre los efectos de esta ficotoxina. Poco tiempo después se realizarían controles de monitorización de las aguas costeras para la detección tanto de las especies productoras (sobre todo del género *Pseudo-nitzschia*) como del mismo DOM.

En la Figura 16 se representan los diferentes emplazamientos donde se ha detectado esta toxina. Aunque el número de localizaciones es menor que en el caso de otras toxinas (como el AO), también se caracteriza por poseer una distribución mundial.



Fig. 16.- Localizaciones en las que se ha confirmado la presencia de DOM.

Mención especial merece el trabajo de Silver y colaboradores, quienes estudiaron la presencia de las especies productoras de este tipo de ficotoxinas en diversos puntos del océano Pacífico, comprobando que no siempre coincide la presencia de especies productoras con la detección de la toxina (Silver et al. 2010). Esto parece indicar que las diatomeas productoras no sintetizan siempre el DOM en la misma magnitud, o al menos no lo van a producir en cantidades analizables por los sistemas de detección actuales. Es posible que parámetros como la disponibilidad de nutrientes, temperatura o pH puedan afectar a la síntesis de la toxina por parte de las especies productoras (Silver et al. 2010).

1.3.2. Estructura y mecanismo de acción

El DOM es un ácido hidrofílico con un peso molecular de 311 dalton que posee una estructura muy similar a la del ácido kaínico (KA), otra importante neurotoxina (Fig. 17). Posee 10 isómeros conocidos: desde el isodomoico A hasta el isodomoico H y el DOM 5' diastereómero (Jeffery, 2004; Meda et al., 1986; Wright et al., 1990a, b; Zaman et al., 1997). El DOM puede convertirse en alguno de sus isómeros por exposición a la luz ultravioleta o al calor (Wright, 1990a, b).

Estos isómeros poseen una menor toxicidad que el DOM (Munday et al., 2008) y no siempre están presentes en los moluscos contaminados. No obstante, en algunas ocasiones la concentración de alguno de estos isómeros es mayor que la del propio DOM. Ocurre así en eventos ocurridos en Filipinas (Kotaki et al., 2005) y en Nueva Zelanda (Holland et al., 2005).

Tanto el DOM como el KA son análogos del glutamato (Glu), el principal neurotransmisor excitatorio del SNC (Fig. 17) (Conn and Pin, 1997; Traynelis et al., 2010; Willard and Koochekpour, 2013). El Glu desempeña un importante papel en la potenciación neuronal a largo plazo. En este proceso se produce un aumento de los receptores del Glu en la neurona post-sináptica, mejorando así la sinapsis entre las neuronas y que está relacionado con la memoria espacial y el aprendizaje (Cooke and Bliss, 2006; Morris et al., 1986; Tang et al., 1999; Tzschentke, 2002). La principal concentración de receptores de glutamato (GluRs) se encuentra fundamentalmente en el SNC, aunque los GluRs también están presentes en otros órganos como el corazón, el hígado, los pulmones o los riñones (Gill et al., 2007; Gill and Pulido, 2001).

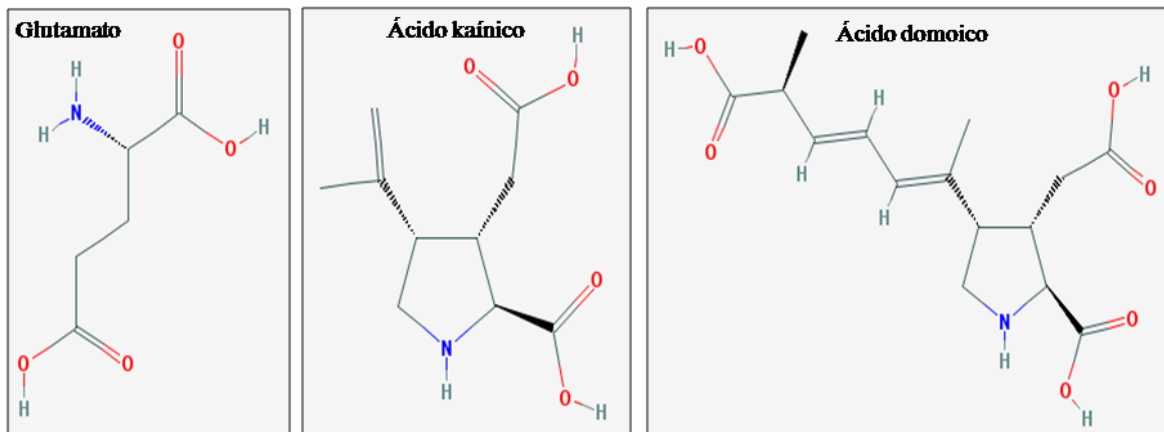


Fig. 17.- Estructuras químicas del Glutamato, KA y DOM. PubChem CID: 33032, 10255 y 17753955.

Los GluRs se clasifican en receptores metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (iGluRs). Los mGluRs forman parte de los receptores acoplados a proteínas G, poseyendo 7 dominios transmembrana y realizando su función a través de segundos mensajeros (Palmada and Centelles, 1998; Pin and Acher, 2002), mientras que los iGluRs son proteínas integrales de membrana formadas por cuatro grandes subunidades que forman un canal iónico.

Los iGluRs se dividen en 4 grupos diferentes en función de su farmacología y homología estructural: ácido α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic (AMPA), KA, N-metil-D-aspartato (NMDA) y receptores δ (Traynelis et al., 2010). Los tres primeros tipos de iGluRs (AMPA, KA y NMDA) se unen al Glu y desempeñan funciones relacionadas con el aprendizaje y la memoria (Platt, 2007; Riedel et al., 2003). Los receptores δ , por su parte, están incluidos en los iGluRs debido a su homología, a pesar de no poseer la capacidad de unirse al Glu (Balazs et al., 2005).

El DOM, debido a las similitudes estructurales con el KA, posee una alta afinidad por los subtipos de receptores iGluRs AMPA y KA (Jane et al., 2009; Jeffery, 2004). La unión del DOM a estos dos grupos de receptores produce una elevación en los niveles de calcio (Ca^{+2}), produciendo la salida del Glu al espacio extracelular (Berman et al., 2002; Costa, 2010), causando la activación de los receptores NMDA, que liberarán más Glu al medio. Esta acción combinada provoca la entrada de Ca^{+2} en las células, que al

llegar a ciertos niveles puede producir especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxide Species*, ROS) y la activación de fosfolipasas, proteína kinasa C, proteasas, proteína-fosfatasa, óxido nítrico sintasa (*Nitric oxide synthase*, NOS) y caspasa-3 (Fig. 18) (Costa, 2010; Ledo, 2004; Pulido, 2008).

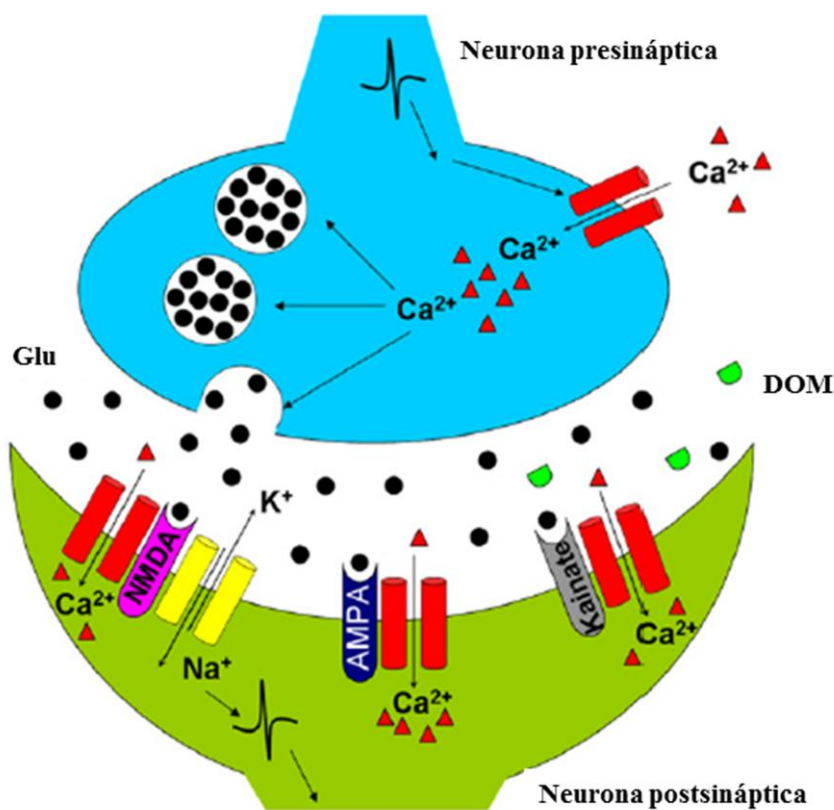


Fig. 18.- Esquema del funcionamiento de la neurotoxicidad del DOM en una sinapsis, con los receptores implicados (NMDA, AMPA y KA), y el papel que desempeñan el Ca^{2+} , el Glu y el propio DOM. Adaptación de Lefebvre and Robertson, 2010.

La entrada de Ca^{2+} promueve la salida al exterior celular de glutatión (GSH), un tripéptido con función neuroprotectora capaz de paliar los efectos del exceso de estrés oxidativo (Pompella et al., 2003). Al existir poca concentración de GSH en el interior celular, se elevará la concentración de ROS, que aumentarán a su vez la peroxidación de los lípidos, contribuyendo a la muerte celular (Giordano et al., 2008a). El papel del GSH está ligado a la mayor o menor toxicidad del DOM, ya que niveles bajos de este tripéptido aumenta la apoptosis inducida por esta ficotoxina en cultivos neuronales (Giordano et al.,

2006). El papel del estrés oxidativo en la muerte celular causada por DOM se confirmó en estudios realizados en leones marinos, donde se comprobó que esta toxina era capaz de aumentar la síntesis de los marcadores de estrés oxidativo en las neuronas de animales intoxicados (Madl et al. 2014).

Aunque los estudios *in vitro* de los efectos del DOM han proporcionado importante información acerca del mecanismo de acción de esta toxina, fueron los estudios *in vivo* los que nos mostraron la causa de su sintomatología y letalidad.

1.3.3 Estudios toxicológicos

Existen numerosos estudios de los efectos toxicológicos del DOM en seres vivos, tanto a corto como a largo plazo. Para una mejor comprensión de sus efectos, hemos diferenciado entre los análisis de las intoxicaciones que ocurren en la vida natural o salvaje y los experimentos realizados en el laboratorio bajo condiciones controladas. Finalmente se señalan las alteraciones histopatológicas comunes y divergentes de ambos grupos, así como la relación de la edad con la patología causada por esa toxina.

1.3.3.1 Toxicidad en la naturaleza

Los organismos invertebrados bivalvos, tales como los mejillones (*Mytilus edulis*) o las navajas (*Siliqua patula*), así como los crustáceos, constituyen uno de los principales vectores por los cuales el DOM es capaz de introducirse en la cadena trófica. Se ha comprobado que en momentos de gran expansión de especies de microalgas productoras del DOM, esta ficotoxina se acumula en el sistema digestivo de estos organismos, pero sin causar ningún perjuicio o alteración aparente en ellos. Este hecho es de suma importancia, dado que al no producirse efectos visibles en las poblaciones de estas especies, el único mecanismo para salvaguardar la salud de los consumidores es el muestreo rutinario de las especies de consumo.

No son sólo los crustáceos y bivalvos filtradores los únicos capaces de acumular DOM, ya que se ha comprobado que algunos crustáceos carnívoros también pueden actuar como vectores. Entre estos crustáceos están los cangrejos, abundantes en nuestras costas, como la especie *Polybius henslowii* (Costa et al., 2003). Algunos invertebrados pueden servir como indicadores de la presencia del DOM, tal es el caso del cangrejo de arena (*Emerita analoga*), en el que los niveles de DOM están en sincronía con la abundancia de las especies productoras de esta ficotoxina (Ferdin et al., 2002). El hecho de que algunos organismos que actúan como vectores del DOM sean carnívoros y no filtradores implica que los niveles de toxina no varían en función de los HABs sino de las presas, y por tanto la concentración de toxinas es mucho más variable. Estudios realizados en moluscos carnívoros como la sepia (*Sepia officinalis*), también muestran esta variación: los niveles de toxina en el organismo son muy altos cuando existe un HAB, pero siguen siendo altos transcurrido mucho tiempo desde la finalización del HAB (Costa et al., 2005).

No se han podido observar efectos por la acumulación de la toxina en ninguno de los organismos invertebrados en presencia del DOM, lo que indica que podrían tener algún tipo de mecanismo para reducir su toxicidad. La bioacumulación de la toxina en estos organismos es potencialmente perjudicial para el ser humano, ya que su consumo conllevará la ingesta de altas concentraciones de toxina, capaces de causar diversos síntomas y patologías. Los efectos del cocinado en los alimentos, aunque reduce la cantidad del DOM, no llega a eliminarlo, y aún pueden quedar concentraciones muy elevadas de esta ficotoxina capaces de producir efectos adversos en los consumidores (Costa et al., 2003). Además, estudios realizados con muestras congeladas ponen en evidencia que la cantidad de toxina no disminuye por este proceso, demostrando que el DOM es una toxina capaz de conservar su estructura también a temperaturas muy bajas (McCarron et al. 2007).

Los peces son otros de los grupos afectados capaces de constituirse en vectores del DOM, sobre todo aquellas especies planctívoras u omnívoras que se alimentan de microalgas productoras de DOM, como las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*. Se ha detectado DOM en las vísceras de la anchoa de California (*Engraulis mordax*), así como de la sardina (*Sardinops sagax*) (Bejarano et al., 2008; Lefebvre et al., 2002; Lefebvre et al., 1999). En ninguna de las dos especies se han relatado síntomas de intoxicación (Lefebvre et al., 2001). En ambas especies el DOM está presente sólo mientras dura el HAB de las diatomeas productoras, reduciéndose sus niveles hasta desaparecer en cuanto el HAB termina. Esto sugiere que la toxina es rápidamente eliminada del organismo en estas especies y que sólo serán nocivas para los predadores mientras el HAB persista. Se cree que los peces podrían servir como vectores de intoxicación para mamíferos marinos, comprobándose que la anchoa (*Engraulis mordax*) ha sido capaz de actuar como tal en la intoxicación de leones marinos (Lefebvre et al., 1999).

También se han producido episodios tóxicos en aves, entre los que podemos encontrar un episodio ocurrido a principios de los años 90, donde se observó que dos especies: el pelícano pardo (*Pelecanus occidentalis*) y el cormorán de Brandt (*Phalacrocorax penicillatus*), presentes en la costa de California, manifestaron síntomas típicos de la intoxicación por el DOM (movimientos oscilantes de la cabeza, rascado, vómitos) (Bejarano et al., 2008; Fritz et al., 1992). Se encontraron concentraciones elevadas del DOM en las anchoas, una de sus principales fuentes de alimento. Pocos años después, esta misma ficotoxina fue la responsable de la muerte de mayor parte de la colonia de pelícanos pardos en la península de Baja California, siendo en este caso el vector los peces denominados toninos (*Scomber japonicus*) (Sierra Beltran et al., 1997).

El DOM afecta también a mamíferos marinos, aunque los episodios tóxicos son poco numerosos. Se ha detectado la presencia del DOM en delfines mulares (*Tursiops truncatus*) capturados en Florida (Twiner et al. 2011), pero son las intoxicaciones de leones marinos de California (*Zalophus californianus*)

las que nos proporcionan más información sobre la toxicología del DOM. Hay documentados eventos de gran mortandad de estos animales a finales de la década de los 70, con síntomas neurológicos semejantes a los que causa el DOM (Gulland, 2000). En episodios posteriores, como el ocurrido en el año 1998 donde se produjo la muerte casi 50 ejemplares, se determinó que la causa de la mortalidad era el DOM, ya que la mortandad coincidió con un HAB de varias especies de microalgas entre las que se encontraba una diatomea del género *Pseudo-nitzschia* (concretamente la *P. australis*), detectándose niveles muy altos del DOM (Scholin et al., 2000). Los síntomas neurológicos en los leones marinos afectados fueron muy amplios, incluyendo los habituales de ASP: convulsiones, ataxia, movimientos bruscos de cabeza y rascados (Cook et al. 2011; Goldstein et al., 2008). Cuatro años después, otra intoxicación ligada al DOM con síntomas similares afectaría no sólo a leones marinos, sino también a delfines, concretamente a dos especies: el delfín común costero (*Delphinus capensis*) y el delfín común oceánico (*Delphinus delphis*), apareciendo muchos de estos animales varados en la costa californiana (de la Riva et al., 2009). También se relaciona esta toxina con un incremento de abortos en los leones marinos de la costa de California, ya que se comprobó la presencia tanto de la toxina como de las microalgas productoras en algunos de los fetos (Goldstein et al., 2009).

Los leones marinos se convierten así en una de las especies más estudiadas en cuanto a la intoxicación por DOM, considerándose una buena especie indicadora de su presencia.

Finalmente, también la especie humana se ha visto afectada por este tipo de episodios tóxicos. La intoxicación que se produjo en el año 1987 en Canadá afectó a más de 100 personas caracterizándose por una serie de síntomas gastrointestinales (tales como diarrea, náuseas, vómitos) que se manifestaron durante las primeras 24 horas seguidas, en algunos casos, de alteraciones cardiovasculares (presión sanguínea inestable) y neurológicas (confusión, pérdida de memoria, dolores de cabeza, espasmos y desorientación) que se prolongaron durante 48 horas (Perl et al., 1990; Pulido, 2008; Teitelbaum et al., 1990). La sintomatología más grave se produjo en un grupo de 14 personas en los que se manifestaron los

síntomas neurológicos más graves: convulsiones, coma e incluso la muerte de cuatro de los afectados durante las primeras semanas transcurridas tras la intoxicación. Meses más tarde, algunos afectados supervivientes aún padecían pérdidas de memoria a corto plazo (Teitelbaum et al., 1990)

Se determinó que la presencia de un HAB constituido por especies productoras del DOM en el mismo período de tiempo, así como la presencia de la misma ficotoxina en los mejillones que se consumieron fue la causa de la intoxicación (Todd, 1990; Wright et al., 1990a).

Los niveles de DOM ingeridos oscilaron desde 15 - 20 mg de una persona que no se vio afectada (lo que proporciona una dosis de 0,2 – 0,3 mg/kg), a unos 60 – 110 mg de una persona con síntomas gastrointestinales (unos 0,9 – 2mg/kg) hasta llegar finalmente a los 420 mg de DOM en los casos más graves (4,2 mg/kg) (Costa et al. 2010; Todd, 1993).

A la vista de este grave incidente, las autoridades competentes han establecido un límite de 20 µg de DOM por gramo de marisco, siendo éste un límite impuesto por Canadá y que posteriormente fue adoptado también por la Unión Europea, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia (Costa et al. 2010; Lefebvre and Robertson, 2010). El límite fijado es una concentración 10 veces menor que la estimación del nivel capaz de causar síntomas en humanos (200 µg/g de mejillón). Concentraciones de DOM por encima del límite de 20 µg/g de marisco obligan al cierre de las áreas de producción afectadas (Lefebvre and Robertson, 2010).

Un segundo incidente se desarrolló en el año 1991, en el estado de Washington (noroeste de EEUU), donde 24 personas sufrieron gastroenteritis, y dos de ellas también desarrollaron síntomas neurológicos, tras el consumo de navajas (*Siliqua patula*) contaminadas con DOM (Todd, 1993; Wekell et al., 1994). En este caso la severidad de los síntomas y la patología fue menor, sin que hubiese que lamentar ningún

fallecimiento. El organismo productor no pudo ser identificado en este caso, pero se asume que fue una especie productora como la *Pseudonitzschia*.

Por tanto, el DOM es capaz de afectar a un gran número de especies diferentes a lo largo de los últimos años. Aunque en la mayoría de las ocasiones no se ha podido realizar un examen histológico, sí que existe un nexo común entre todas las intoxicaciones: el daño neurológico concentrado en el área del sistema límbico. Se ha comprobado que en muchas de las especies afectadas (aves, leones marinos), incluyendo seres humanos, existen alteraciones motoras plenamente visibles (convulsiones, movimientos de cabeza), así como de comportamiento (agresividad) y de pérdida de memoria. Es por tanto el sistema límbico una de las principales regiones afectadas por esta ficotoxina, lo que se confirmó no sólo por las autopsias y necropsias realizadas, sino por diversos ensayos realizados en laboratorio (Pulido, 2008). Dichos ensayos proporcionaron una información aún mayor del mecanismo de acción de esta toxina.

1.3.3.2 Toxicidad en animales de experimentación

Dada las características de esta ficotoxina y la severidad de su sintomatología, se han realizado a lo largo del tiempo numerosos ensayos con animales de experimentación, siendo los roedores los principales especímenes de análisis. Aunque minoritarios, también se han realizado ensayos de los efectos del DOM en otros mamíferos (monos), así como algunos invertebrados y peces.

A pesar de que la bioacumulación del DOM en organismos invertebrados es la causa de que se produzcan intoxicaciones en depredadores que se alimentan de ellos, se han realizado pocos estudios empleando estos organismos. Entre estos ensayos, se pueden encontrar la exposición a DOM realizados en la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), donde se evaluaron los cambios en la actividad en los hemocitos, que constituyen el principal sistema defensivo del animal. Se observó un aumento del número de hemocitos durante la exposición a la toxina, volviendo a niveles normales 48 horas después. A

excepción de los hechos señalados, no se detectaron mayores efectos nocivos en las ostras (Jones et al., 1995).

Estudios realizados recientemente con cangrejos (*Metacarcinus magister*), empleando varios métodos de administración (oral e intravascular) y dosis muy variadas (algunas tan elevadas como 20 mg/kg) mostraron que la toxina se acumula rápidamente en el organismo sin producir efectos graves y es lentamente eliminada por vía urinaria (Schultz et al. 2013). Si el tiempo que permanece el DOM en estos organismos es elevado, al no producir efectos tóxicos notables, podría causar graves perjuicios en niveles superiores de la cadena trófica.

Aunque minoritarios, existen algunos estudios realizados en peces como la anchoa, donde se mostraron efectos neurotóxicos tras la inyección intracelómica de esta toxina: desorientación, alteración de la manera de nadar, movimientos bruscos de la cabeza e incluso la muerte de algunos ejemplares (Lefebvre et al., 2001). Otros estudios empleando tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) tampoco describen efectos letales del DOM, pero sí que confirman la elevación del estrés oxidativo causado por esta toxina, confirmando los estudios *in vitro* (Mazmanci and Çavaş, 2010). En ensayos con la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se comprueba un aumento de la agresividad en aquellos especímenes a los que se administró la neurotoxina, por lo que se comprueba de nuevo la capacidad de esta neurotoxina de afectar al comportamiento de los organismos intoxicados (Bakke et al., 2010).

Fueron los ensayos en roedores, tanto ratones como ratas, los que proporcionaron un amplio conocimiento de los órganos afectados en mayor medida por esta ficotoxina y, asimismo, donde se determinó su letalidad.

Las vías de administración más frecuentes a la hora de evaluar la toxicidad de una toxina son la vía oral y la i.p., aunque también se han realizado ensayos empleando otras vías como la intracerebroventricular, la subcutánea (s.c.) y la i.v.

En cuanto a la administración de DOM por vía oral, se comprobó que los ratones son más susceptibles que las ratas, teniendo un NOAEL de 28 mg/kg, mientras que en las ratas se sitúa en 60 mg/kg (Iverson et al., 1989). Comparado con la intoxicación en seres humanos de Canadá del año 1987, donde se estimó el NOAEL en 0,2 - 0,3 mg/kg (Costa et al. 2010; Perl et al., 1990; Todd, 1993), se aprecia claramente que el ser humano es especialmente susceptible a esta toxina.

En el mismo estudio realizado por Iverson y colaboradores se estableció en 35 mg/kg y en 80 mg/kg las dosis vía oral de DOM necesarias para inducir la neurotoxicidad en ratones y ratas, respectivamente (Iverson et al., 1989). En este estudio se fijó la primera DL₅₀ de la administración i.p. de DOM en ratones, situándola en 2,4 mg de DOM/kg de peso (Iverson et al., 1989). Esta DL₅₀ es similar a la que obtuvo el grupo de Grimmelt y colaboradores: 3,6 mg/kg (Grimmelt et al., 1990), así como por Tasker y colaboradores: 4 mg/kg (Tasker et al., 1991). El cálculo de la DL₅₀ no está exento de variabilidad, ya que los últimos estudios mostraron que la dosis de DOM fue aún más elevada, concretamente 6 mg/kg (Munday et al., 2008).

En ratas, los primeros estudios confirmaron la presencia de daños histológicos tras la administración i.p. de dosis mayores a 2 mg/kg, siendo las dosis menores a esa concentración aparentemente inocuas (Tryphonas et al., 1990b). Estudios posteriores con ratas adultas divergieron en cuanto a la letalidad de la ficotoxina, ya que dosis menores a 2 mg/kg (concretamente 1,32 mg/kg) causaron la muerte de varios ejemplares (Sobotka et al., 1996). Esta variabilidad en cuanto a la concentración a partir de la cual se

observan lesiones a nivel histológico o su letalidad se observa frecuentemente en los estudios con esta ficotoxina.

En ambas especies de roedores, la sintomatología es muy similar, independientemente de la vía de administración: desde efectos muy evidentes como el rascado, las convulsiones y movimientos de cabeza; hasta alteraciones del comportamiento (agresividad) y de la memoria a corto plazo, que se estudian por medio de diversos tests (Clayton et al., 1999; Colman et al., 2005; Chiamulera et al., 1992; Dakshinamurti et al., 1991; Fuquay et al., 2012; Hesp et al., 2007; Iverson et al., 1989; Nakajima and Potvin, 1992; Petrie et al., 1992; Ryan et al. 2010; Sawant et al., 2008; Scallet et al., 2004; Schwarz et al. 2014; Sutherland et al., 1990; Tryphonas and Iverson, 1990). También se describió una disminución del peso en especímenes tratados, aunque este efecto no se ha podido observar siempre (Sobotka et al., 1996).

Finalmente, aunque mucho menos frecuentes en la actualidad, se han realizado estudios de la toxicidad del DOM en primates, que complementaron los estudios realizados en roedores. La administración vía oral de la toxina en macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*), proporcionó un NOAEL de 0,75 mg/kg; siendo necesaria por tanto una menor concentración de DOM para causar sus primeros efectos adversos (Costa et al. 2010; Truelove et al., 1997). La administración tanto vía i.p. como vía i.v. de diversas dosis de DOM (desde 0,0025 mg/kg hasta 4 mg/kg) produjo vómitos, movimientos espasmódicos de cabeza, agresividad, fatiga, temblores, hipotermia e incluso la muerte por edema pulmonar en el espécimen tratado con la dosis más alta (Tryphonas et al., 1990a). En ambas vías de administración existe un breve período asintomático inmediatamente posterior a la administración de la toxina, que puede estar ausente en las dosis más elevadas. La sintomatología fue dosis-dependiente: a mayor concentración de la ficotoxina administrada menor tiempo transcurría hasta la aparición de los síntomas, mayor duración tenían y mayor severidad presentaban (Tryphonas et al., 1990a).

1.3.3.3 Efectos histopatológicos

La principal variabilidad de la toxicidad del DOM en las diferentes especies estudiadas se refiere a su letalidad, viéndose que la susceptibilidad de los primates a esta toxina es mayor que la de los roedores. Los seres humanos, tras los estudios realizados posteriormente al incidente de 1987, son incluso más susceptibles de sufrir efectos adversos que los primates no-humanos. Sin embargo, es en roedores donde las lesiones causadas por el DOM se definen mejor, siendo ya capaces de relacionar los daños observados con la dosis administrada. Esta relación no se ha sido podido establecer en los organismos que se vieron afectados en la naturaleza (como los leones marinos) o bien en humanos (donde los análisis histopatológicos fueron minoritarios y asimismo es complejo establecer la dosis que afectó a los intoxicados). Sin embargo, tanto los estudios de los efectos del DOM en la naturaleza como los realizados en condiciones controladas confirman que el DOM se comporta como una neurotoxina. Dentro del SNC es el hipocampo, constituyente del sistema límbico, donde los daños fueron más severos, independientemente de la especie analizada.

Bajo la denominación de sistema límbico se describen varias estructuras y núcleos funcionalmente interconectados que se localizan principalmente en el telencéfalo, así como en el diencefalo (tálamo, hipotálamo, subtálamo, y epitálamo). Aunque en menor medida, también forman parte del sistema límbico algunas regiones situadas en el mesencéfalo o cerebro medio (como el núcleo interpenduncular o la formación reticular). Los componentes del sistema límbico cumplen varias funciones, la mayoría tienen que ver con el control de las funciones necesarias para la autopreservación y conservación de la especie. Regulan la función autónoma y endocrina, particularmente la relacionada con estímulos emocionales. Además, muchas de estas áreas son fundamentales para determinados tipos de memoria.

Las áreas que normalmente se incluyen en el sistema límbico se dividen en dos categorías: corticales y subcorticales. Entre las regiones corticales se encuentran el hipocampo, circunvolución subcallosa, giro

cingulado y la circunvolución del hipocampo. Esta corteza se ha denominado “lóbulo límbico” ya que hace un anillo que rodea el cuerpo calloso, siguiendo el ventrículo lateral. Las porciones subcorticales incluyen el hipotálamo, la amígdala, el núcleo septal y algunos núcleos talámicos como el núcleo anterior y posiblemente el núcleo rosmoedial (Fig. 19) (Swenson, 2006).

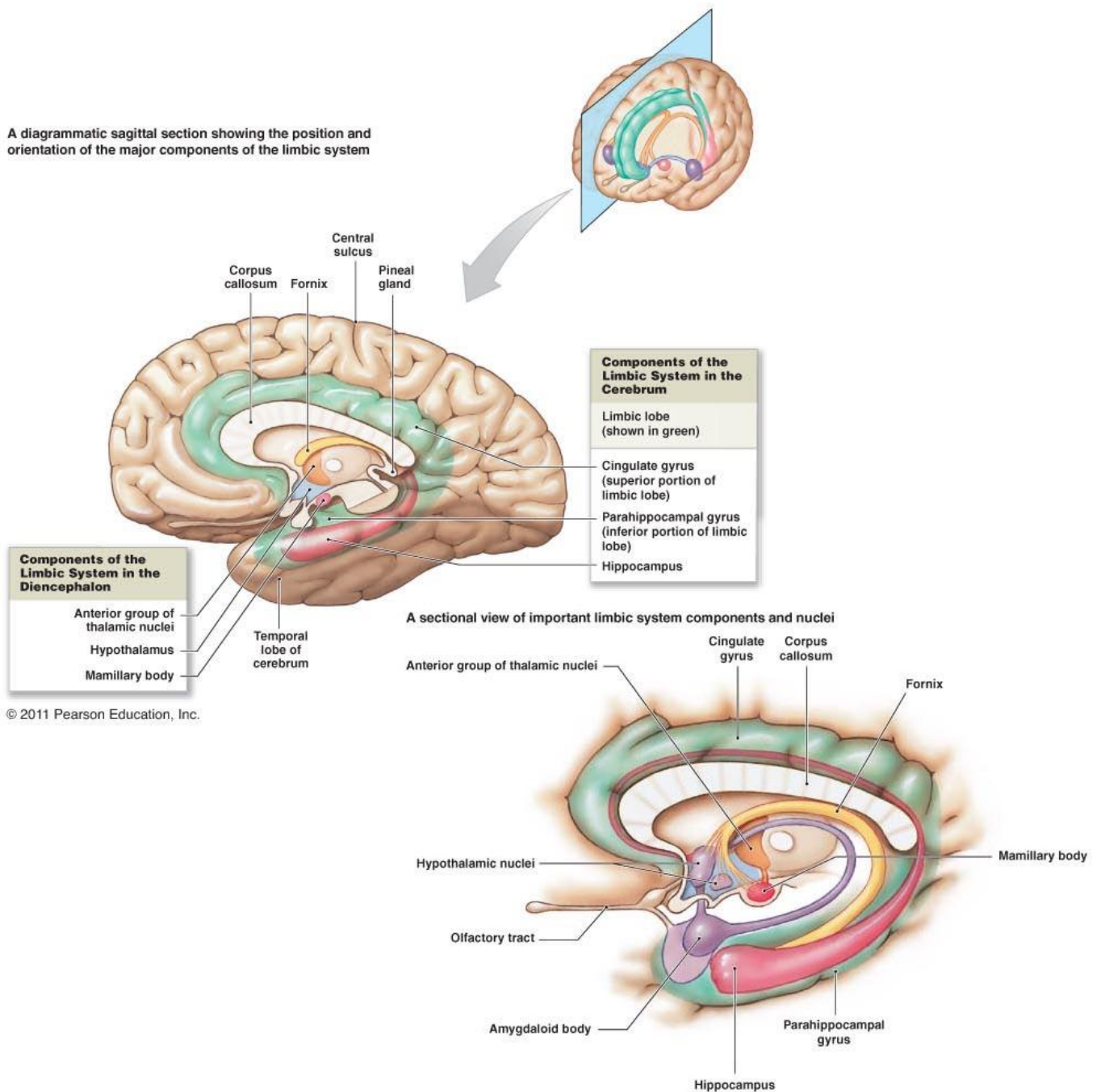


Fig. 19. Esquema representativo de las diferentes regiones que componen el sistema límbico. Adaptado de Swenson, 2006.

La interconexión entre las diferentes regiones del sistema límbico crea una red muy compleja en la que todos los componentes están relacionados. Una visión esquemática de las regiones interconectadas se puede apreciar en la Figura 20.

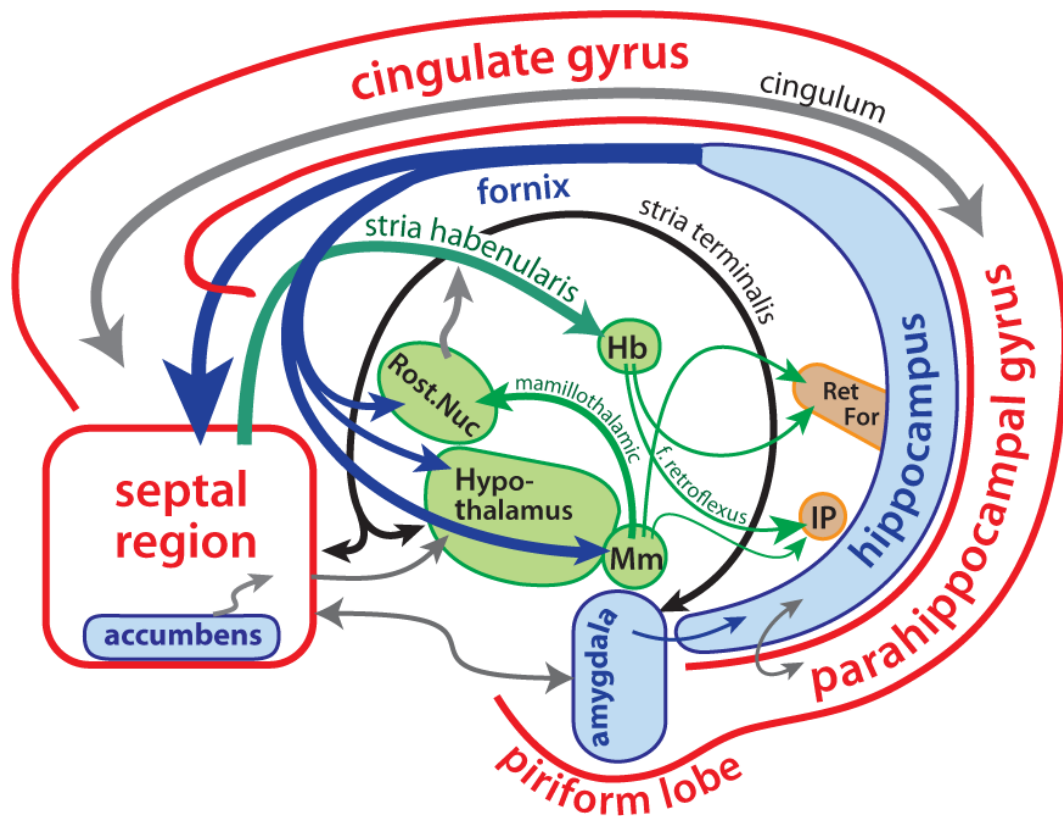
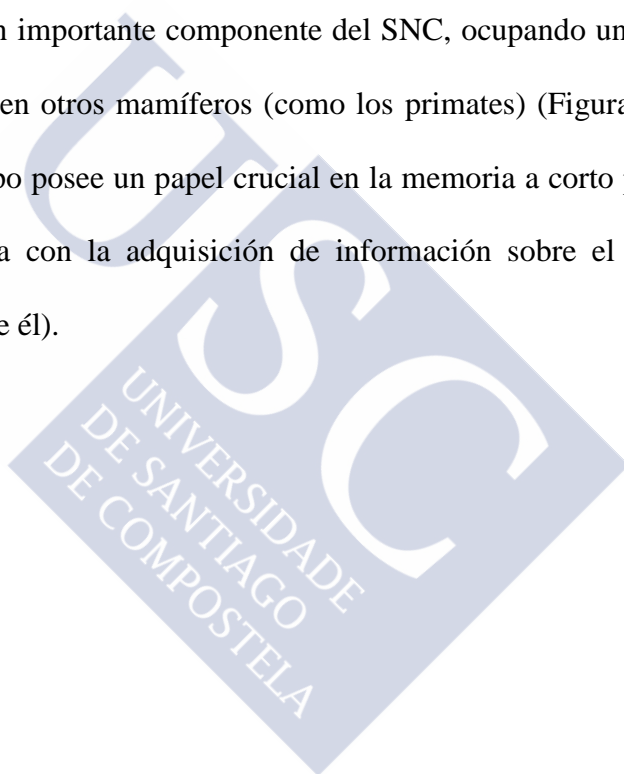


Fig. 20. Dibujo esquemático de los componentes del sistema límbico y sus interconexiones. El córtex cerebral, constituyente del telencéfalo, forma la parte más externa del sistema límbico (en rojo). Los componentes más internos del telencéfalo (como la amígdala y el hipocampo) se muestran en azul. Los componentes del diencefalo se muestran en verde mientras que los componentes del mesencefalo se muestran en marrón. Las conexiones axonales que relacionan las diferentes regiones incluyen el cingulum, el fornix (que sale del hipocampo), la estria terminal (que sale de la amígdala), así como varias conexiones del diencefalo (mostradas en verde). (Rost.Nuc. : núcleos talámicos rostrales; Mm. : cuerpo mamilario; Hb : habénula; IP : núcleo interpenduncular; Ret For : formación reticular; y f. : fascículo). Adaptado de Fletcher and Beitz, 2013.

Dentro del sistema límbico, el hipocampo constituye la principal diana del DOM en muchas de las especies analizadas. Esta región es una estructura simétrica que se encuentra próxima a la corteza, donde forma una invaginación en forma de “S”, forma que es constante en mamíferos, desde roedores hasta primates (Amaral and Lavenex, 2006). Su forma recuerda en seres humanos a la forma de un caballito de mar, de ahí su nombre, o bien a los cuernos de un carnero o del dios Amón (de ahí provienen los nombres de las regiones denominadas CA, del *Cornus Ammonis*). Aunque las similitudes en el hipocampo entre los diversos mamíferos son elevadas, existe cierta variabilidad, tanto en forma como en la estructura.

En la rata, el hipocampo es un importante componente del SNC, ocupando un área muy superior en relación al resto del encéfalo que en otros mamíferos (como los primates) (Figura 21) (Swanson, 1983; Swanson et al. 1987). El hipocampo posee un papel crucial en la memoria a corto plazo y en la memoria espacial (aquella que se relaciona con la adquisición de información sobre el espacio que rodea al individuo y la orientación dentro de él).



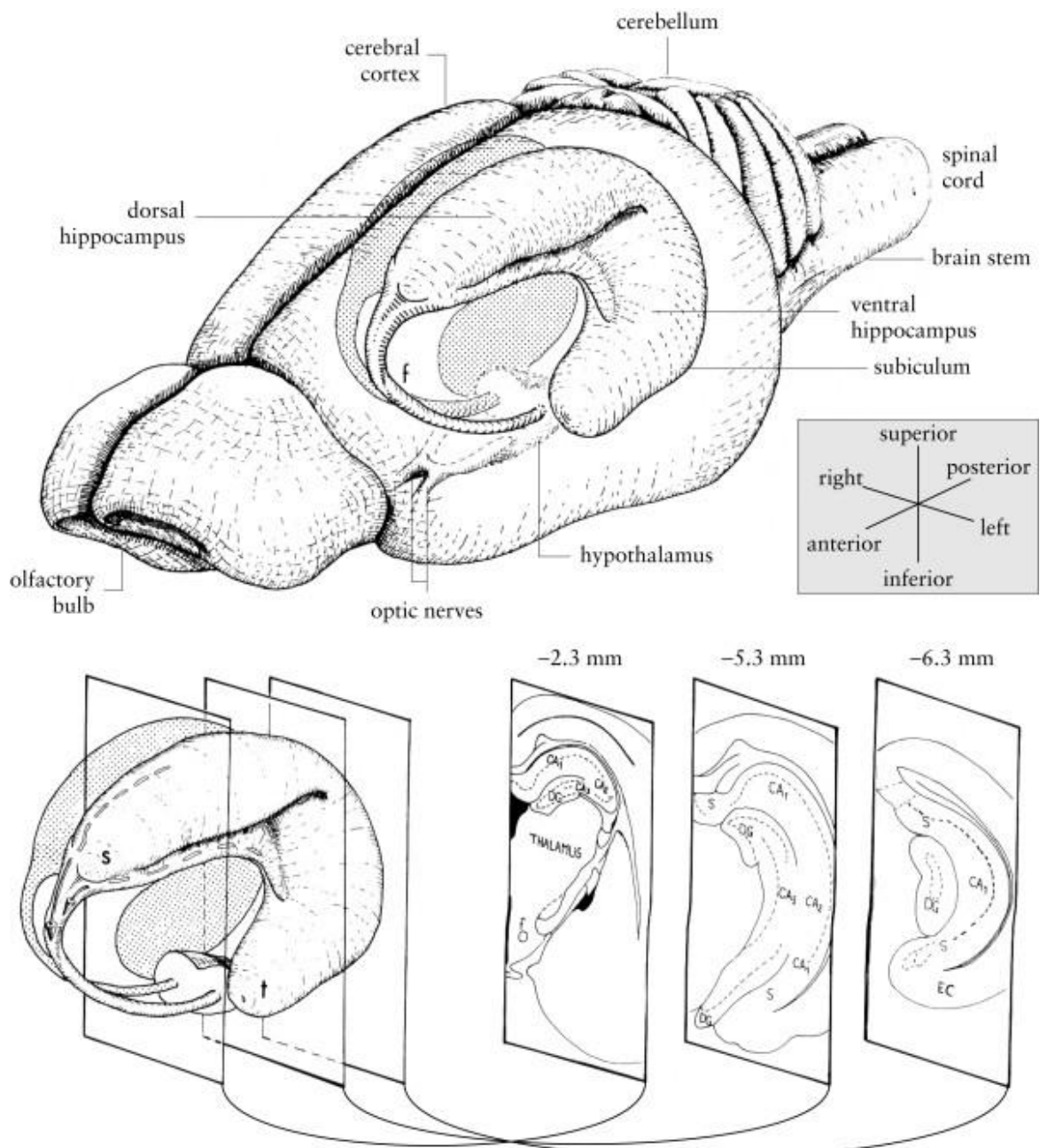


Fig. 21. Diagrama del hipocampo de la rata. Se muestra la organización tridimensional del hipocampo así como sus estructuras relacionadas. En la parte inferior derecha de la figura se muestran tres secciones coronales, con sus coordenadas anterioposteriores en relación al bregma (punto anatómico donde se encuentran el hueso frontal y el parietal). (CA1, CA2, CA3: subcampos del *Cornu Ammonis* 1-3 ; DG: giro dentado; EC: corteza entorrinal; f: fórnix; s: región septal del hipocampo; S: subiculum; t: región temporal del hipocampo). Adaptado de Cheung and Cardinal, 2005.

El complejo hipocampal se divide en el giro dentado (*dentate gyrus*, DG), el hipocampo propiamente dicho (dividido a su vez en tres campos: CA1, CA2 y CA3); el subículo; el presubículo; el parasubículo; y finalmente la corteza entorrinal. Algunos investigadores añaden un cuarto campo en el hipocampo, el CA4, que se sitúa a continuación del CA3 y próximo al DG (Bhatnagar and Shukla 2008). El subículo, el presubículo y el parasubículo en ocasiones son agrupados juntos en el complejo subicular (Amaral and Witter, 1995). Las áreas del hipocampo propiamente dicho (de la CA1 a la CA3), son las regiones que se consideran la diana del DOM. (Figura 22).

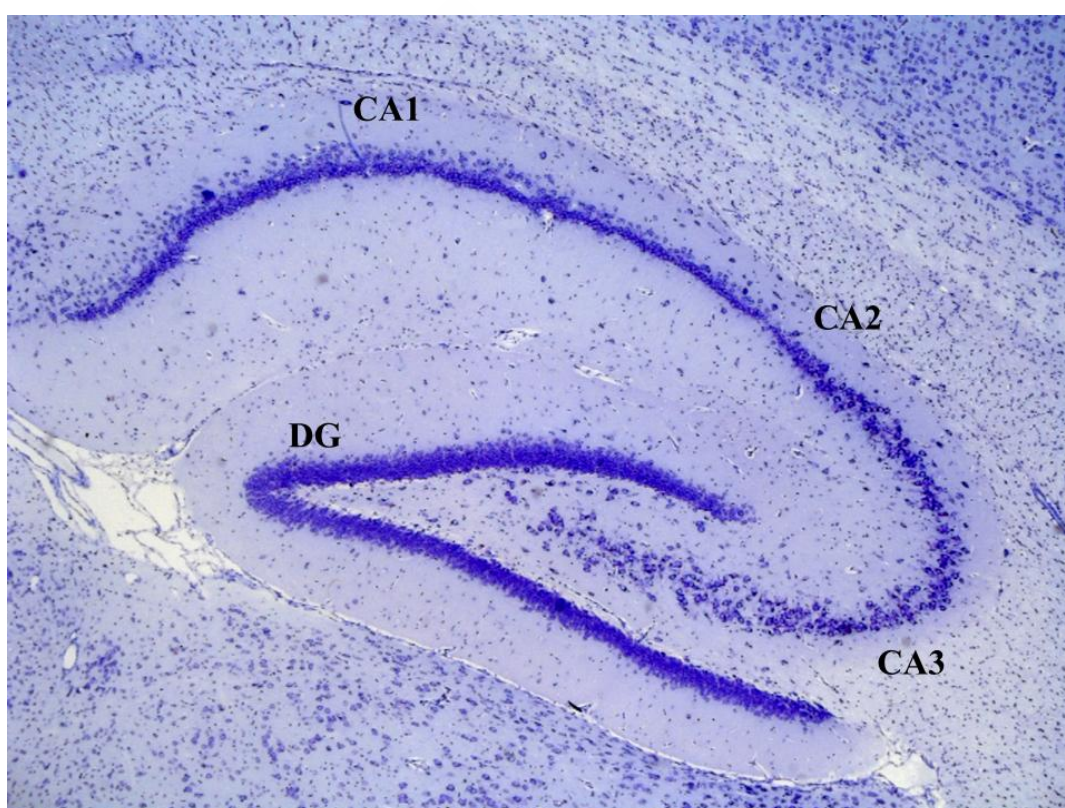


Fig. 22. Hipocampo de roedor (en este caso una rata), mostrando las 3 regiones en las que se divide esta región: CA1, CA2, CA3, así como el giro dentado (DG). Tinción de Nissl. 40X. Fuente propia.

Estructuralmente, el hipocampo posee tres capas:

- Una capa molecular, con escasas interneuronas que está subdividida en tres estratos (lúcido, radiado, lacunoso).

- Una capa de células piramidales con diversas interneuronas asociadas. Las neuronas piramidales son de gran tamaño e introducen sus dendritas apicales en la capa molecular; distribuyendo su profuso árbol dendrítico basal en la capa subyacente, el *stratum oriens* (Fig. 23).
- Una capa plexiforme denominada *stratum oriens* que presenta algunas interneuronas y cubre sin límite claro a la sustancia blanca subyacente, denominada *alveus*.

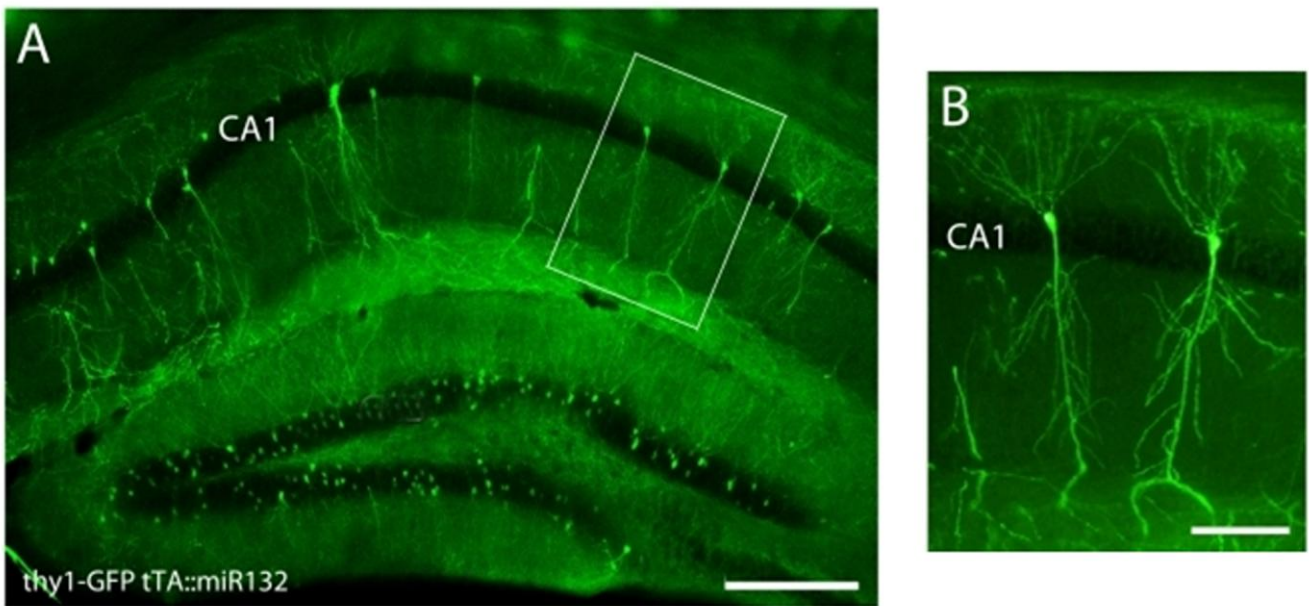


Fig. 23. Representación de neuronas piramidales de hipocampo. Escalas: 200 μm (A), 100 μm (B). Adapado de Hansen et al, 2010

Las longitudes de las prolongaciones dendríticas varían mucho entre los distintos campos, siendo por lo general muy extensas, pudiendo alcanzar hasta 16 mm de longitud en algunas neuronas piramidales del campo CA3 (Amaral et al. 1990). Las diferencias entre las regiones del hipocampo se deben tanto al tamaño de las células piramidales (siendo las neuronas del campo CA3 de mayor tamaño que las del campo CA1) como las distintas conexiones neuronales que se establecen con otras regiones (las neuronas del campo CA3 reciben conexiones del giro dentado mientras que las del campo CA1 no). Estas y otras diferencias nos ayudan a distinguir los 3 campos en los que se subdivide el hipocampo (Fig. 24) (Amaral et al. 1995).

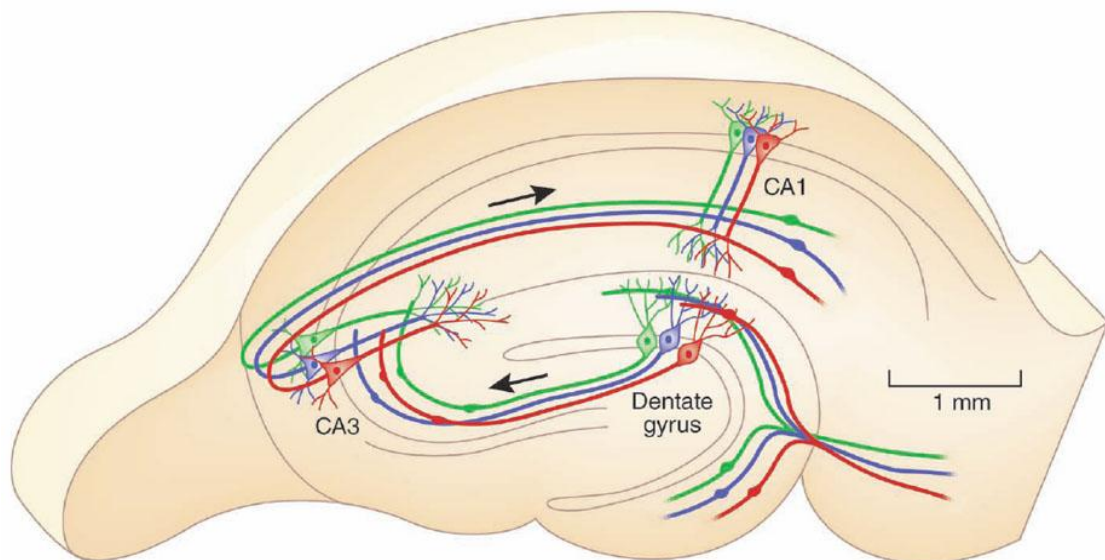


Fig. 24. Representación del encéfalo de un roedor mostrando las diferentes regiones del hipocampo.

Adapado de Moser, 2011.

Las lesiones producidas por el DOM en el hipocampo son comunes en muchas especies afectadas, tanto de vida libre como en condiciones controladas. El examen histológico de los ejemplares de leones marinos que murieron a causa de la intoxicación por DOM reveló lesiones cerebrales que se concentran en el área del hipocampo, donde los campos CA3, CA4, CA1 y CA2 (en orden descendente de severidad de daño observado), así como el giro dentado, presentan numerosas células piramidales en estado de necrosis (Buckmaster et al. 2014; Gulland, 2000; Scholin et al., 2000; Silvagni et al., 2005). Asimismo, las autopsias de los individuos fallecidos en la intoxicación ocurrida en 1987 en Canadá mostraron un importante daño cerebral caracterizado por la necrosis en el área hipocampal (Carpenter, 1990; Pulido, 2008; Teitelbaum et al., 1990).

Los ensayos llevados a cabo con monos y roedores (tanto ratas como ratones) en condiciones controladas confirmaron que el hipocampo es la principal diana del DOM, siendo por lo general el campo CA3 la región más afectada (Bruni et al., 1991; Debonnel et al., 1990; Nakajima and Potvin, 1992; Peng et al., 1994; Petrie et al., 1992; Pulido, 2008; Qiu and Curras-Collazo, 2006; Scallet et al., 1993; Scallet et al., 2004; Sobotka et al., 1996; Strain and Tasker, 1991; Sutherland et al., 1990).

A la necrosis hay que sumar una importante astrocitosis (incremento de las células de la glía, encargadas del soporte metabólico de las neuronas), descrita por algunos investigadores (Ananth et al., 2003b; Appel et al., 1997; Nakajima and Potvin, 1992; Sobotka et al., 1996).

Otra región íntimamente relacionada con el sistema límbico que se ve afectada por el DOM es el bulbo olfatorio (Colman et al., 2005; Peng et al., 1994; Scallet et al., 2004; Tiedeken et al. 2013). Esta región, que en humanos ocupa un pequeño volumen en comparación con otras formaciones nerviosas, posee un volumen importante en los roedores. También se han observado lesiones en el hipotálamo y en el tálamo (Bruni et al., 1991; Friedberg and Ross, 1993; Schmued et al., 1995; Tiedeken et al. 2013; Tryphonas et al., 1990a).

Asimismo, se han comprobado la existencia de lesiones en el lóbulo piriforme de leones marinos intoxicados, así como en la amígdala de todos los mamíferos analizados tanto en estado salvaje como en condiciones controladas, y en los seres humanos afectados (Appel et al., 1997; Carpenter, 1990; Pulido, 2008; Teitelbaum et al., 1990; Tiedeken et al. 2013). También se han descrito lesiones en la amígdala (Amunts et al. 2005; Appel et al., 1997; Tiedeken et al. 2013).

Con independencia del sistema límbico, también se han descrito lesiones en otras áreas del sistema nervioso central, como el área postrema, región ubicada en el límite anteroposterior del cuarto ventrículo cuya función es el control del vómito (Bruni et al., 1991; Peng et al., 1994; Tryphonas et al., 1990a). Dichas lesiones comprenden la vacuolización del neuropilo (densa región conformada por axones, dendritas y células gliales, con un número escaso de células), el aumento de volumen de los astrocitos, la disminución de tamaño de las neuronas y la hipercromasia de las neuronas afectadas.

También se han detallado daños en la retina de leones marinos, consistentes en la vacuolización de la capa de células ganglionares (Silvagni et al., 2005). Lesiones similares se encontraron en roedores, tras administrar DOM vía i.p., viéndose una necrosis muy severa de esta región, acompañada de edema (Jeffery et al., 2004; Tryphonas et al., 1990b); así como en macacos, donde los animales tratados con elevadas dosis de la neurotoxina (4 mg/kg) mostraron también una vacuolización de las células de esta región (Tryphonas et al., 1990a). Tanto la retina como el área postrema son regiones afectadas por el DOM que no están protegidas por la barrera hematoencefálica, que se compone de una densa formación de células endoteliales que ejercen de filtro entre los vasos sanguíneos y el SNC. Por tanto, es posible que una vez el DOM llega a la corriente sanguínea afecte en primer lugar aquellas estructuras del SNC situadas en el exterior de esta barrera. Efectos similares se han relatado en otras neurotoxinas como el ácido glutámico (Olney et al., 1977).

Wang et al., (2000) y Xu et al., (2008) describieron cómo la administración i.p. produjo lesiones en la médula espinal en ambas especies de roedores, caracterizadas por hemorragia y vacuolización de las neuronas. El daño se atribuye a la inducción por parte del DOM del aumento de estrés oxidativo así como una disfunción de las mitocondrias, lo que conllevaría a la apoptosis de las células de esta región (Xu et al., 2008).

Tras las regiones del SNC anteriormente citadas, el órgano en el que más se ha señalado la toxicidad del DOM es el corazón, en el que se describen necrosis muy severas y edemas en muchos de los leones marinos afectados (Gulland, 2000). En menor medida también se observó fibrosis, hiperplasia nuclear e hipertrofia (Gulland, 2000). Posteriormente, se relacionó la presencia del DOM con los daños observados en nutrias marinas (*Enhydra lutris*), concretamente con la aparición de miocarditis (inflamación del miocardio), posible causa de la muerte de algunos individuos (Kreuder et al. 2005). El corazón de

numerosas especies, incluyendo a los seres humanos, presenta GluRs (Gill et al., 2007; Gill and Pulido, 2001), por tanto es posible que este órgano pueda verse afectado por el DOM.

Vranyac-Tramoundanas et al. (2011), describen como la administración i.p. de la toxina en ratas causó alteraciones hemodinámicas, como el incremento del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) o de la interleucina-1, ambas citocinas liberadas por células del sistema inmunitario con gran relación con los procesos inflamatorios. A nivel histológico también se observaron lesiones tales como vacuolización de las células, fibrosis, aumento de las células inflamatorias (macrófagos y leucocitos) e incluso necrosis inflamatoria (Vranyac-Tramoundanas et al. 2011). En el mismo estudio, las alteraciones hemodinámicas causadas por la exposición al DOM en corazones aislados es mucho menor. Este hecho, junto con las observaciones realizadas *in vitro* empleando cardiomiocitos aislados, hace suponer que esta patología podría estar relacionada con las convulsiones que sufren los animales expuestos a dosis altas de DOM (Vranyac-Tramoundanas et al., 2008). Por tanto, los efectos del DOM sobre el corazón pueden ejercerse de una manera indirecta dado que las alteraciones se ejercen a nivel de áreas del SNC que controlan la actividad cardíaca (Khoorkhor and Umegaki 2013; Vranyac-Tramoundanas et al. 2011).

Asimismo, se ha comprobado que el DOM posee un efecto inmunotóxico en ratones. Esta toxina es capaz de aumentar la presencia de monocitos 12 horas después de la administración de la toxina, seguida por un aumento de la proliferación de neutrófilos y de linfocitos T a las 24 horas (Levin et al., 2008). 48 horas después de la administración, todos los niveles volverían a la normalidad, lo que se correlaciona con la eliminación del DOM del organismo (Levin et al., 2008).

Finalmente, dada la gran presencia de GluRs en numerosos tejidos, es posible que el DOM sea capaz de afectar a más órganos que los que se han descrito hasta el momento. Un ejemplo de ello es la investigación de reciente publicación de Funk y colaboradores, donde se observó por primera vez lesiones

en riñones tras la exposición de ratones a DOM (Funk et al. 2014). La toxicidad en este tejido no es de extrañar, puesto que el sistema renal es la principal vía de eliminación del DOM en mamíferos (Suzuki and Hierlihy, 1993).

1.3.3.4 Relación del DOM con la edad

Dado que el DOM actúa principalmente como una neurotoxina, es importante señalar los efectos que tiene la edad del organismo en las alteraciones que esta ficotoxina pueda causarle.

Los fallecimientos ocurridos durante la intoxicación de 1987 correspondían a personas de avanzada edad, con edades comprendidas entre los 71 y los 84 años (Perl, 1990). Tres de ellas fallecieron en un período menor a un mes, mientras que el cuarto afectado falleció en los 3 meses posteriores a la intoxicación (Perl, 1990). Asimismo, sería el grupo de mayor edad el que poseía mayor susceptibilidad a la pérdida de memoria (Perl, 1990; Teitelbaum et al., 1990). El examen histológico de los fallecidos mostraría una necrosis neuronal severa, así como una importante astrocitosis, principalmente en las regiones del hipocampo y la amígdala (Perl, 1990). Debido a los estudios que muestran que una alteración de la función renal aumenta la toxicidad de esta neurotoxina (Costa, 2010; Truelove and Iverson, 1994), es posible que este incremento de la toxicidad del DOM en estos individuos afectados podría ser debida a la menor funcionalidad renal en estos individuos de mayor edad.

En esta relación edad-daño también podría influir la peor capacidad de combatir los efectos del estrés oxidativo de un individuo de edad avanzada. Los estudios realizados tanto con DOM como con KA en roedores de diversas edades mostraron que ratas jóvenes tienen una menor sensibilidad que los animales más viejos (Kerr et al., 2002; Wozniak et al., 1991).

La exposición pre-natal de DOM en animales de experimentación (fundamentalmente roedores) confirma que esta toxina es capaz de afectar a los organismos durante su estado de desarrollo. La

administración i.p. de DOM en hembras gestantes produce una serie de alteraciones en las crías tanto en su comportamiento como en cuanto a la morfología del cerebro. Diversos tests para el estudio de la actividad locomotora, de la memoria y de la ansiedad mostraron que las crías de hembras tratadas poseían serias deficiencias al ser comparadas con animales control (Costa, 2010; Levin et al., 2005; Tanemura et al., 2009). En cuanto a las alteraciones morfológicas, hay constancia de alteraciones en el hipocampo, como un aumento de los niveles de receptores de KA y de Glu (Dakshinamurti et al., 1993; Levin et al., 2005; Maucher and Ramsdell, 2007). El estudio de Maucher y Ramsdell demostró, al medir los niveles de DOM en líquido amniótico y cerebro de los fetos mediante la técnica ELISA, que esta ficotoxina es capaz de cruzar la barrera de la placenta (Maucher and Ramsdell, 2007). Esta susceptibilidad podría explicar los efectos observados en algunas poblaciones de leones marinos afectadas por el DOM, siendo esta ficotoxina capaz de afectar también a la neurogénesis en los fetos de esta especie (Ramsdell and Zabka, 2008).

Se realizaron muchos estudios sobre la administración de esta toxina en roedores recién nacidos (durante las dos primeras semanas de vida) que aportaron más datos sobre el mecanismo de acción del DOM. En dichos experimentos, las crías mostraron una mayor susceptibilidad al DOM que los ejemplares adultos. La susceptibilidad de las crías al medir los valores del DL_{50} es entre 2 y 6 veces más bajos cuando se compara las crías con individuos adultos (Sobotka et al., 1996; Xi et al., 1997). Existen dos explicaciones posibles al mayor efecto del DOM en las crías: o bien una menor filtración renal de la toxina o bien una barrera hematoencefálica aún incompleta (Xi et al., 1997). Independientemente de la causa, se hace necesario tener en cuenta el factor edad en la toxicología del DOM.

A pesar de las numerosas investigaciones llevadas a cabo sobre la toxicología del DOM *in vivo*, debido a la variabilidad observada (sobre todo en cuanto a la letalidad y a las lesiones causadas), se hacen necesarios más estudios para concretar los efectos de esta ficotoxina, sobre todo a nivel histopatológico.

En este ámbito se desarrolla la presente tesis, intentando aportar nueva información útil tanto del mecanismo de acción del DOM como de sus efectos histopatológicos.







OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis doctoral incluyen:

1.- Estudiar los efectos histopatológicos de la administración oral de AO en ratones, observando asimismo la presencia de la toxina por métodos inmunohistoquímicos; y estudiando la expresión de enzimas relacionadas con la detoxificación desde un punto de vista molecular.

2.- Estudiar los efectos de la administración i.p. de DOM en ratas y ratones en cuanto a su sintomatología, así como en la patología causada, empleando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.







PUBLICACIONES



3 PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos en el trabajo desarrollado durante el periodo dedicado a la elaboración de la tesis doctoral han dado lugar a tres publicaciones que se adjuntan a continuación, relativos a los efectos del ácido okadaico y del ácido domoico

Artículo 1. *Oral Toxicity of Okadaic Acid in Mice: Study of Lethality, Organ Damage, Distribution and Effects on Detoxifying Gene Expression.*

Resumen:

Se relatan los efectos de la administración oral de concentraciones crecientes de AO en ratones. Se detecta la cantidad de AO expulsada en heces por medio de espectrometría de masas (*Liquid chromatography–mass spectrometry*, LC-MS/MS), para cada una de las dosis empleadas, comprobándose que el 99% del AO permaneció en el interior del organismo después de 24 horas.

Por otra parte, se analizan los efectos producidos por el AO en encéfalo, estómago, hígado, intestino delgado, intestino grueso, pulmones y riñones, así como la presencia de la toxina por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Se observan importantes lesiones en hígado y, en menor medida, en riñón, en tanto que en los restantes órganos no se apreciaron daños. Se produce inmunomarcaje tanto en el hígado como en los riñones.

Finalmente, mediante la técnica PCR cuantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) se comprobó una disminución de la expresión del ARN mensajero (ARNm) que codifica las enzimas superóxido dismutasa-1 (SOD1), catalasa (CAT) y NAD(P)H dehidrogenasa, quinone 2 (NQO2), todas ellas proteínas relacionadas con el proceso de detoxificación y reducción del estrés oxidativo. También se produjo un descenso de la expresión del Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), un factor de transcripción que aumenta la expresión de enzimas antioxidantes. Por último, la expresión del ARNm de la

enzima heme oxigenasa 1 (*heme oxygenase 1*, HMOX1) se vio incrementada en los animales intoxicados en respuesta a la acción del AO. La pérdida de capacidad del hígado de reducir el estrés oxidativo podría explicar en parte las lesiones observadas en los análisis histológicos.





Artículo 2. *Brain pathology in adult rats treated with sublethal doses of domoic acid.*

El objetivo de este trabajo es el estudio de la sintomatología y de los efectos patológicos tras la administración i.p. de DOM en ratas. Se observa mediante diversas técnicas histológicas el estado de diversos órganos tanto a corto plazo (entre 6 y 24 horas) como a largo plazo (5 y 54 días). Asimismo, se procede a la detección de la ficotoxina por medio de un anticuerpo monoclonal específico de la toxina. No se observan lesiones a corto plazo; sin embargo a largo plazo se constata la existencia de daños principalmente en la región del hipocampo, córtex piriforme, amígdala y tálamo. Las regiones afectadas por esta toxina pertenecen al sistema límbico, y se caracterizan por poseer varios subtipos de GluR por los cuales el DOM posee afinidad. Las lesiones se caracterizaron por la presencia de necrosis y una importante astrocitosis, así como de la pérdida de la integridad del citoesqueleto de las neuronas del hipocampo. También se observa un ligero aumento de la expresión de la NOS a los 5 días, que fue mucho mayor a los 54 días.

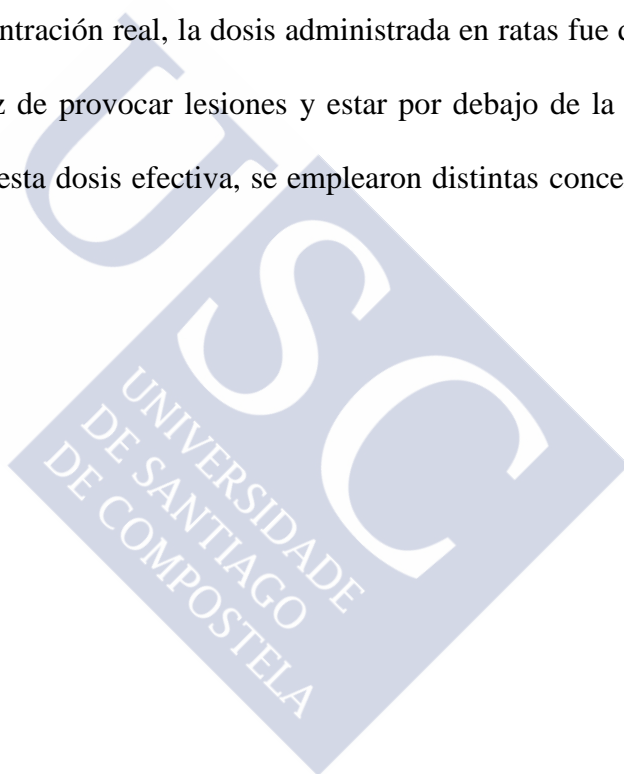
Por técnicas inmunohistoquímicas, se detecta el DOM en el hipocampo, con una mayor intensidad en el campo CA3 a las 6 horas y 10 horas después de la administración, sin detectarse en los períodos más largos. Se considera que el daño que se observa a largo plazo se debe a una muerte neuronal retardada causada por la toxina, que es eliminada en las primeras 24 horas del organismo y por ello no se detecta a largo plazo. La inducción de la actividad de la NOS observada a los 5 días y 54 días posteriores a la administración de la toxina podría estar relacionada con esta muerte celular retardada.



Artículo 3. *Dose-response and histopathological study, with special attention to the hypophysis, of the differential effects of domoic acid on rats and mice.*

En este trabajo se abordan diferencias que se presentan entre ratas y ratones, las dos especies más empleadas en el estudio de esta toxina, tras la administración i.p. del DOM. Dada la diversidad de concentraciones de toxina descrita en la bibliografía, se decide medir la concentración del DOM comercial por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (*High performance liquid chromatography*, HPLC), comprobándose que existían amplias variaciones entre la concentración medida y la esperada.

Una vez determinada la concentración real, la dosis administrada en ratas fue de 2,5mg/kg peso vivo (p.v.) por ser esta una dosis capaz de provocar lesiones y estar por debajo de la DL_{50} . En cuanto a los ratones, dado que desconocíamos esta dosis efectiva, se emplearon distintas concentraciones de 3 mg/kg p.v. a 8 mg/kg p.v.



<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jemt.22486/full>





DISCUSIÓN



4 DISCUSIÓN

Dado que en cada uno de los artículos figura su correspondiente discusión, el objetivo de este apartado es dar un enfoque más genérico, haciendo una reflexión de los resultados obtenidos y sus posibles implicaciones.

La frecuencia de aparición de los HABs es cada vez mayor, estando muchos de ellos acompañados de la presencia de toxinas marinas. Las regulaciones actuales ayudan a impedir que estas ficotoxinas lleguen a los seres humanos pero es necesaria una monitorización constante para detectar los fenómenos tóxicos a tiempo. La aparición de nuevas toxinas hace que sea necesario una inversión de recursos constante en este campo, tanto para la seguridad alimentaria como para evitar los perjuicios medioambientales y económicos que los HABs pueden causar (Ferreira et al., 2014; McMahon and Silke, 1996; Satake et al., 1998).

Tan importante como su pronta detección es el estudio de los mecanismos de acción de las diferentes toxinas marinas y la diversidad e intensidad de las patologías que causan. Aunque los estudios *in vitro* proporcionan datos útiles sobre la actuación de las toxinas, la utilidad de los ensayos *in vivo* no debe ser minusvalorada. En estos últimos influyen muchos parámetros en la toxicidad que no se pueden medir en los estudios *in vitro*. Es en estos estudios *in vivo* donde se sitúan los análisis histopatológicos, proporcionando información sobre los tejidos diana de las ficotoxinas y las alteraciones que causan en ellos, lo que ayuda a explicar la sintomatología y sus mecanismos de acción.

El AO, como principal constituyente del grupo de las DSPs, es una de las toxinas sobre la que existe más bibliografía. No obstante, la mayoría de la información que se posee de ella se basa en estudios *in vitro*. Entre los estudios *in vivo* comprobamos que el AO, como toxina diarreica que es, actúa

principalmente a nivel del intestino (Berven et al., 2001; Ito and Terao, 1994; Ito et al., 2002b). No obstante, el daño en esta región tampoco es constante, existiendo asimismo una gran variabilidad tanto en la letalidad, órganos afectados y severidad de los daños producidos por el AO.

En nuestro trabajo, como resultado de los análisis por LC-MS/MS se comprobó que más del 99% del AO estaba en el interior del organismo, independientemente de la dosis empleada. Con ello constatamos la capacidad del AO de producir daño a medio o largo plazo, ya que está aún circulante transcurridas 24 horas de su administración por vía oral. Nuestros resultados están en concordancia con la bibliografía, ya que estudios realizados analizando la eliminación del AO en ratones mostraron que esta toxina se expulsa lentamente del organismo, estando presente días y semanas tras la administración (Matias et al., 1999).

Los análisis de la expresión del ARNm de SOD1, CAT y NQO2 por qPCR dieron como resultado una disminución de las tres enzimas. La enzima SOD1 cataliza la reacción de dismutación de superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno, mientras que la CAT produce descomposición de H_2O_2 en agua y oxígeno (Fig. 25). Tanto el anión superóxido como el peróxido de hidrógeno son agentes oxidantes muy importantes dentro del sistema inmune del organismo, pero deben ser rápidamente eliminados por su alta capacidad oxidante. Asimismo la NQO2, al igual que la CAT y la SOD1, también está implicada en la respuesta celular al estrés oxidativo.

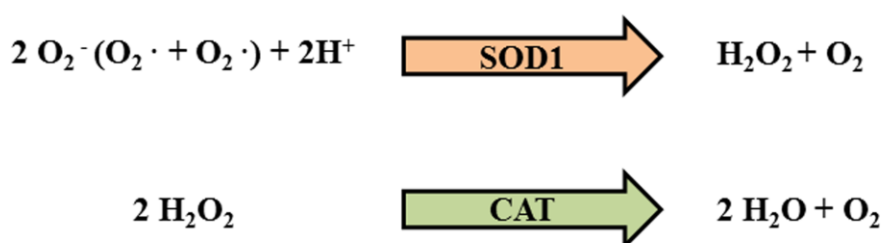


Fig 25. Esquema de funcionamiento de la SOD1 y de la CAT.

Junto con estas tres enzimas, la expresión del factor de transcripción Nrf2 también se redujo. Este factor de transcripción controla la expresión de enzimas antioxidantes, aumentando dicha expresión en caso de estrés oxidativo. Una de estas enzimas es la NQO2, por lo que existe una correlación directa entre la disminución de la expresión Nrf2 y de la expresión de NQO2 (Kaspar et al., 2009; Venugopal and Jaiswal, 1996). Finalmente la expresión de la enzima HMOX1 se incrementó, en concordancia con los resultados en ensayos con hepatocitos *in vivo* (Immenschuh et al., 2000).

Como se ha comentado, varias enzimas con capacidad antioxidante y detoxificante presentes en el hígado se encuentran inhibidas y por tanto no pueden realizar su función con normalidad. Se podría establecer por ello una relación entre esta disminución a nivel molecular de los mecanismos de defensa del hígado con los resultados histológicos.

Con las técnicas histológicas que se han empleado no se detectaron lesiones en el intestino (tanto intestino delgado como intestino grueso), en el cerebro y en los pulmones, órganos donde previamente se habían descrito lesiones (Berven et al., 2001; Ito and Terao, 1994; Ito et al., 2002b; Rajasekar et al. 2013). Por otro lado se observaron leves lesiones en el riñón así como una severa necrosis hepática en algunos de los ejemplares intoxicados. Las lesiones están en concordancia con los ensayos inmunohistoquímicos, que mostraron presencia de toxina únicamente en riñón e hígado, y no se encontró marcaje en los restantes órganos analizados. La ausencia de lesiones en cerebro y pulmones podría explicarse por la enorme variabilidad característica de los ensayos *in vivo* (Berven et al., 2001; Ito and Terao, 1994; Ito et al., 2002b; Rajasekar et al. 2013). Dada la severa diarrea observada en los ratones intoxicados es razonable pensar que el AO ha afectado al intestino a pesar de la ausencia de lesiones. Algunos investigadores afirman que la variabilidad de lesiones en esta región tras la intoxicación por AO puede deberse a la gran capacidad de regeneración de este tejido (Ito and Terao, 1994).

Es especialmente relevante el daño que se produce en hígado, con presencia de una importante necrosis. El daño hepático causado por el AO ya ha sido descrito anteriormente, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Berven et al., 2001; Blankson et al., 1995; Ito and Terao, 1994; Rubiolo et al., 2011b). Pero es la primera vez que se puede relacionar la disminución de la actividad de enzimas medidas en un ensayo *in vivo* con los resultados histopatológicos. Esta doble aproximación resulta útil en el estudio de los efectos del AO a corto plazo. Desconocemos la evolución del daño observado si los especímenes prosiguieran con vida más allá del tiempo de exposición empleado en nuestro trabajo.

Aunque no se ha observado hasta el momento la presencia de efectos tumorales en la región hepática por parte del AO, este hecho no es descartable dado el potencial tumorigénico de esta ficotoxina. Otras toxinas producidas por cianobacterias como la microcistina (péptidos tóxicos producidos por el género *Microcystis*), o la nodularina (producida por la especie *Nodularia spumigena*), poseen un mecanismo de acción similar al AO y son capaces de promover la aparición de tumores hepáticos mediante la inhibición de la actividad de PP1 y PP2A (Nishiwaki-Matsushima et al., 1992; Ohta et al., 1994).

Por tanto, no hay que desdeñar el potencial del AO para producir daños en otras regiones diferentes a su tejido diana más habitual (el intestino). Serán necesarios más estudios en cuanto a los efectos patológicos en otros tejidos, empleando tiempos más largos de exposición. Dado que la mayor parte de la toxina sigue en el organismo, no se puede descartar que el AO produzca daños a medio o a largo plazo. Ensayos *in vivo* empleando varios campos de actuación (molecular e histológico) parecen ser útiles y válidos para estudiar los efectos de este tipo de toxinas.

Por lo que se refiere al DOM, hay numerosos estudios experimentales *in vivo*, a los que hay que sumar los estudios de los animales intoxicados de forma natural y de las autopsias de las personas

fallecidas a causa de la intoxicación con esta ficotoxina. No obstante, quedan incógnitas que aún están por resolver, algunas de las cuales se han abordado en los dos trabajos que forman parte de la presente tesis.

En primer lugar, a pesar de que las ratas son unos de los animales más empleados en los ensayos *in vivo* (sólo por detrás de los ratones), existe mucha variabilidad en cuanto a las dosis empleadas y a su patología. Centrándonos en la vía de administración empleada en nuestras dos publicaciones, la vía *i.p.*, vemos que los primeros estudios realizados por Tryphonas y colaboradores establecían que una dosis de 2 mg/kg sólo producía lesiones en el 25% de los ejemplares tratados, siendo necesarias dosis más elevadas (4 mg/kg o 7,5 mg/kg) para que el daño fuese constante en todos los ejemplares (Tryphonas et al., 1990b). En contraposición, Sobotka y colaboradores observaron la muerte del 25% de los ejemplares con una dosis de 1,32 mg/kg, viendo lesiones en el 33% de los ejemplares analizados (Sobotka et al., 1996). En un estudio más reciente dosis de 2,2 mg/kg e incluso de 4,4 mg/kg tampoco produjeron la muerte de ningún ejemplar en las dos primeras horas tras la administración de la toxina (Scallet et al., 2004). La discrepancia en cuanto a las dosis letales se puede achacar a diferencias en la pureza de la toxina. Por este hecho, se realizó el análisis por HPLC, para tener la certeza de que la dosis administrada es la real.

La disparidad de resultados se mantiene también en los estudios histopatológicos: nuestros resultados coinciden con los de muchos investigadores, que han señalado que las lesiones más severas se producen en el hipocampo (Bruni et al., 1991; Debonnel et al., 1990; Nakajima and Potvin, 1992; Peng et al., 1994; Petrie et al., 1992; Pulido, 2008; Qiu and Curras-Collazo, 2006; Scallet et al., 1993; Scallet et al., 2004; Sobotka et al., 1996; Strain and Tasker, 1991; Sutherland et al., 1990); mientras que existen ensayos que señalan otras áreas cerebrales como las más afectadas por el DOM, como el bulbo olfatorio, el córtex piriforme o el tálamo (Tiedeken et al. 2013).

Esta variabilidad impulsó la realización de los ensayos con esta toxina. De las concentraciones empleadas en nuestra primera publicación con el DOM, comprobamos que las dosis de 1,5 mg/kg o 2 mg/kg únicamente producen síntomas menores (rascados, hipoactividad) sin causar la muerte de ningún espécimen, mientras que la dosis de 3,5 mg/kg produjo una rápida muerte de los ejemplares, en un tiempo inferior a 10 minutos.

Fue la dosis de 2,5 mg/kg la efectiva en nuestro ensayo ya que, aunque no se puede considerar subletal al producir la muerte de dos ejemplares, es la concentración que causó la sintomatología típica de la intoxicación por DOM (rascados, convulsiones, movimientos espasmódicos de la cabeza) así como daños al realizar el análisis histológico. Las regiones afectadas por el DOM forman parte del sistema límbico: hipocampo, amígdala, corteza piriforme, septo lateral y algunos núcleos del tálamo. Las lesiones en estas áreas concuerdan con la bibliografía (Carpenter, 1990; Cendes et al., 1995; Dakshinamurti et al., 1991; Schmued et al., 1995; Scholin et al., 2000; Silvagni et al., 2005; Sobotka et al., 1996; Tryphonas et al., 1990a, b). El daño observado es de dos tipos: por un lado observamos que las neuronas sufren una serie de cambios morfológicos (un volumen reducido, hipercromatismo), que son más abundantes en los campos CA1 y CA3 del hipocampo; por otra parte también se observaron extensas zonas de necrosis. Esta necrosis se produjo principalmente en la corteza piriforme y en la amígdala, aunque también en menor medida en el hipocampo.

En relación con el daño observado se encuentra la astrocitosis detectada en los especímenes de 5 y 54 días post-tratamiento, que fue observada empleando ensayos inmunohistoquímicos para detectar la proteína gliofibrilar ácida (*Glial fibrillary acidic protein*, GFAP), proteína constituyente de los filamentos intermedios del citoesqueleto de células gliales como los astrocitos. La astrocitosis está fuertemente ligada a la presencia de lesiones degenerativas o daños cerebrales de diversa índole, habiendo sido previamente descrita como uno de los procesos desencadenados por el DOM (Ananth et al., 2003b; Appel et al., 1997; Nakajima and Potvin, 1992; Sobotka et al., 1996).

Estas lesiones únicamente se observaron en la dosis de 2,5 mg/kg, no pudiendo ser apreciadas en las dosis inferiores a esta concentración, ni en las concentraciones superiores. Sin embargo, además del factor de la concentración administrada, es necesario tener en cuenta el tiempo de actuación de la toxina. A pesar de haber sido intoxicadas con la misma dosis, no se observaron lesiones en los animales sacrificados tras 6, 10 o 24 horas postinoculación, mientras que sí estaban presente en los ejemplares analizados tras 5 días y a 54 días postinoculación. Por tanto, parece ser necesario que transcurra cierto tiempo para que la toxina cause sus características lesiones.

La detección del DOM por medio de un anticuerpo monoclonal es uno de los hechos más relevantes del trabajo realizado, ya que no se habían realizado ensayos inmunohistoquímicos para detectar la toxina anteriormente. El marcaje con el anticuerpo se detectó únicamente en el hipocampo, siendo en el campo CA3 donde se observó con mayor intensidad. Este hecho es consecuente con las propiedades descritas para esta ficotoxina, que posee una gran afinidad por los receptores AMPA y KA, que se encuentran en gran concentración en el hipocampo y sobre todo en el campo CA3 (Chittakallu et al., 1999; Jeffery et al., 2004; Lomeli et al., 1992; Wisden and Seeburg, 1993). La toxina fue detectada a las 6 y 10 horas, no pudiendo detectarse posteriormente a este tiempo. Es de suponer que el DOM, o al menos la mayor parte del mismo, es eliminado del organismo en las primeras 24 horas, probablemente vía renal (Suzuki and Hierlihy, 1993; Truelove and Iverson, 1994). Dado que las lesiones sólo se observaron a largo plazo, podemos correlacionar ambos hechos (la patología y la detección de la toxina), suponiendo que el DOM desencadena una serie de cambios en las células que se prolongarán a lo largo del tiempo, a pesar de que la toxina ya haya sido eliminada del organismo. Entre estos efectos tenemos la llamada “muerte neuronal retardada” (*delayed neuronal death*) que consiste en una desintegración gradual de las neuronas producida probablemente por estrés oxidativo (Erin and Billingsley, 2004; Giordano et al., 2007; Giordano et al., 2008b; Kirino et al., 1984; Tsunekawa et al. 2013).

Los ensayos inmunohistoquímicos también mostraron un aumento en la expresión de la enzima NOS en los especímenes analizados a los 5 y 54 días postinoculación, con un mayor marcaje en el período de tiempo más largo. La NOS es una familia de proteínas responsable de catalizar la producción de óxido nítrico (*nitric oxide*, NO) a partir del aminoácido L-arginina. Existen tres isoformas diferentes, diferenciadas por su localización y función: la NOS neuronal (nNOS), que se encuentra en el SNC y produce NO que interviene en la comunicación celular como neurotransmisor; la NOS endotelial (eNOS), que se encuentra en las células del endotelio donde produce NO, que posee actividad vasodilatadora; y la NOS inducible (iNOS), producida por células del sistema inmune y que produce NO como agente citotóxico.

En nuestro ensayo empleamos un anticuerpo que detectaba las tres isoformas, relacionando la presencia de NOS a los 5 días tanto con la nNOS producida por las neuronas aún viables como por la iNOS, producida por los astrocitos presentes. Sin embargo el mayor marcaje obtenido a los 54 días probablemente se deba en su mayor parte a la isoforma iNOS, debido a la pérdida de neuronas y a la mayor presencia de los astrocitos. Estas observaciones descritas coinciden con los experimentos previos realizados por Ananth y colaboradores en los que relatan que, 3 meses después de la intoxicación, la expresión de nNOS se reduce por la muerte neuronal y la iNOS se mantiene debido a la presencia de células de la microglía (Ananth et al., 2003a, 2003b, 2003c).

La inducción de la expresión de NOS se debe a la actuación de la toxina. El DOM, como se ha descrito, es capaz de producir un aumento del Ca^{+2} , activando la expresión de NOS, que a su vez aumentará la concentración de NO (Fig. 26). El NO producido puede ser en parte responsable de la excitotoxicidad que, en último término, puede llevar a la muerte de las células por varios mecanismos como el estrés oxidativo o la alteración del metabolismo energético (Jeffery et al., 2004; Mayer and

Hemmens, 1997; Mayer et al., 1990; Sasaki et al., 2004; Szabó, 1996; Tripp and Tepperman, 1996; Zhang et al., 2014).

Espacio extracelular

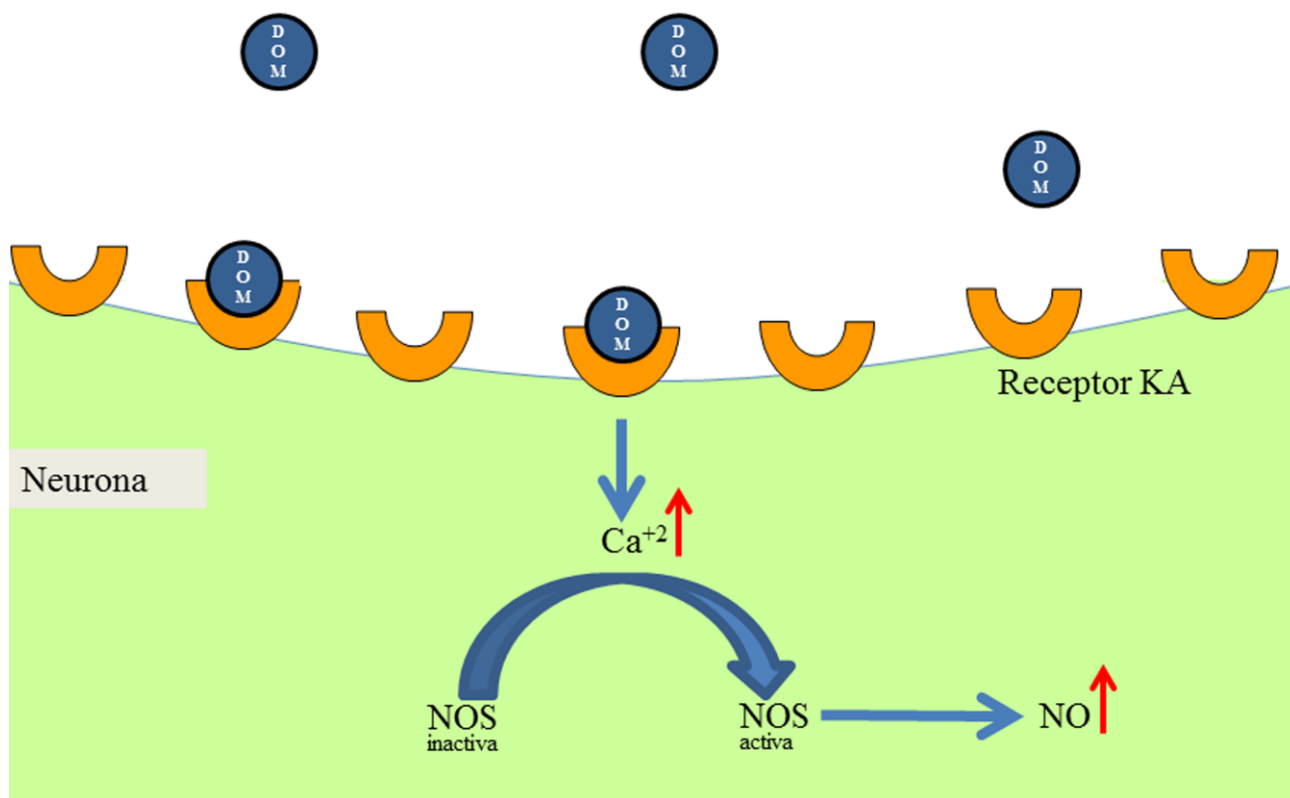


Fig. 26. Esquema de la actividad de NOS. La unión del DOM a los receptores por los que siente afinidad en las neuronas produce un aumento de la síntesis de Ca^{+2} , que activará a la NOS, lo que conllevará a un aumento del NO. Este contribuirá a la muerte celular retardada.

Como se mencionó con anterioridad, la bibliografía describe una letalidad muy variable en los ensayos *in vivo*, lo que se demuestra en las diferentes DL_{50} establecidas por algunos investigadores a lo largo del tiempo. Debido a ello, en nuestro estudio se realizaron administraciones de diferentes dosis en ratones para obtener, al igual que en el caso de la rata, una dosis efectiva (aquella que, sin llegar a la DL_{50} , producía lesiones). Antes de comenzar la administración se realizó la medición por HPLC de los viales comerciales que se emplearon para determinar la pureza de la toxina, obteniendo unos resultados sorprendentes: aproximadamente un 45% más de la cantidad esperada. Por tanto, la inexactitud en ciertos

viales comerciales, sumado a una mejoría técnica en la purificación de las toxinas así como a la variabilidad intrínseca de los ensayos *in vivo*, podrían explicar la toxicidad tan heterogénea descrita hasta el momento.

Las características comunes a ambas especies de roedores se concentraron en la sintomatología, ya que una vez inoculada la dosis efectiva para cada especie se observó la aparición de pelo erizado, rascado, espasmos y convulsiones; además estos signos comenzaron tras tiempos de actuación similares. Otra característica común fue la detección del DOM presente en el hígado, donde no se presentaron lesiones pero sí presenta un claro marcaje. Dado el papel detoxificador de este órgano y el poco tiempo de exposición transcurrido hasta el análisis inmunohistoquímico, el marcaje en hígado no es sorprendente. En los análisis histopatológicos iniciales, realizados con monos, ya se sospechaba que el hígado poseía un papel importante en la detoxificación de esta toxina (Tryphonas et al. 1990a).

Lefebvre y colaboradores, estudiando la distribución del DOM en salmones del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*), observaron que esta toxina estaba presente en el hígado después de su administración intracelómica (Lefebvre et al. 2007). No obstante, los niveles de toxina encontrados son muy bajos comparados con los hallados en el riñón, lo que vuelve a señalar que el DOM es principalmente eliminado por vía renal. Asimismo, la concentración de DOM en el cerebro era muy baja comparada con los resultados observados en riñón o en el mismo hígado (Lefebvre et al. 2007). Los experimentos más recientes realizados en peces (concretamente la dorada, *Sparus aurata*) también muestran una importante concentración de esta toxina en el hígado a las pocas horas de su administración (Nogueira et al., 2010). Posteriormente Mazmanci y Çavaş observaron una alteración de ciertas enzimas hepáticas como la CAT y la glutatión peroxidasa al exponer a tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) a diferentes administraciones i.p. de la toxina (Mazmanci and Çavaş 2010). En ningún caso se observaron lesiones en este órgano, por lo que podemos afirmar que la presencia de la ficotoxina en este órgano

probablemente es debido a la función que desarrolla en el organismo, más que a una posible afinidad del DOM por este órgano.

Las diferencias entre ambas especies de roedores se observaron en un primer momento en la letalidad, siendo necesarias dosis tan elevadas como 8 mg/kg para producir la muerte en ratones, mientras que en ratas la dosis de 2,5 mg/kg ya causa la muerte de algún ejemplar y la dosis de 3,5 mg/kg causaba un 100% de letalidad. Por tanto, las ratas se mostraron mucho más susceptibles que los ratones a los efectos del DOM, observaciones coincidentes con los resultados de investigaciones previas (Iverson et al., 1989).

También se encontraron diferencias en lo que respecta a las lesiones observadas. Mediante las técnicas histológicas empleadas no se pudo observar alteraciones en ratones en los lugares del encéfalo donde aparecían en ratas. Tampoco mediante técnicas inmunohistoquímicas se pudo observar marcaje del DOM en el hipocampo de los ratones.

Finalmente, es destacable el marcaje detectado en la hipófisis de ambas especies mediante técnicas inmunohistoquímicas, una región a la que la bibliografía especializada no había hecho referencia. No obstante, no se observaron lesiones, si bien no son descartables a largo plazo.

La hipófisis (o glándula pituitaria) es una glándula endocrina encargada de almacenar y segregar hormonas que regulan la homeostasis u otras regiones del sistema endocrino, como las glándulas suprarrenales o la glándula tiroides. Está interconectada con el hipotálamo a través del sistema porta-hipofisario, el conjunto de vasos sanguíneos que conecta el hipotálamo con la hipófisis, en concreto con su parte anterior. Por estos vasos circulan las hormonas hipotalámicas que estimulan a la parte anterior de la hipófisis a la secreción de hormonas.

La hipófisis de los roedores consiste en dos regiones con diferente origen y composición celular: la región glandular (la adenohipófisis) y la región neural (la neurohipófisis). La adenohipófisis es la región hipofisaria compuesta por tres partes: la *pars distalis* (que ocupa la mayor parte de la adenohipófisis), la *pars tuberalis* y la *pars intermedia* (Fig. 27). Contiene células que poseen en su superficie iGluRs y, en menor medida, mGluRs (Demeneix et al., 1984; Giovannucci and Stuenkel, 1995; Kocsis et al., 2010; Le Tissier et al., 2012; Lindström and Ohlsson, 1992; Noda et al., 2003; Villalobos et al., 1996). La neurohipófisis está conformada por los axones provenientes de las células neurosecretoras del hipotálamo y por los pituicitos, un tipo de células de soporte de la neuroglía, que asimismo poseen GluRs en su superficie (Meeker et al., 1994).

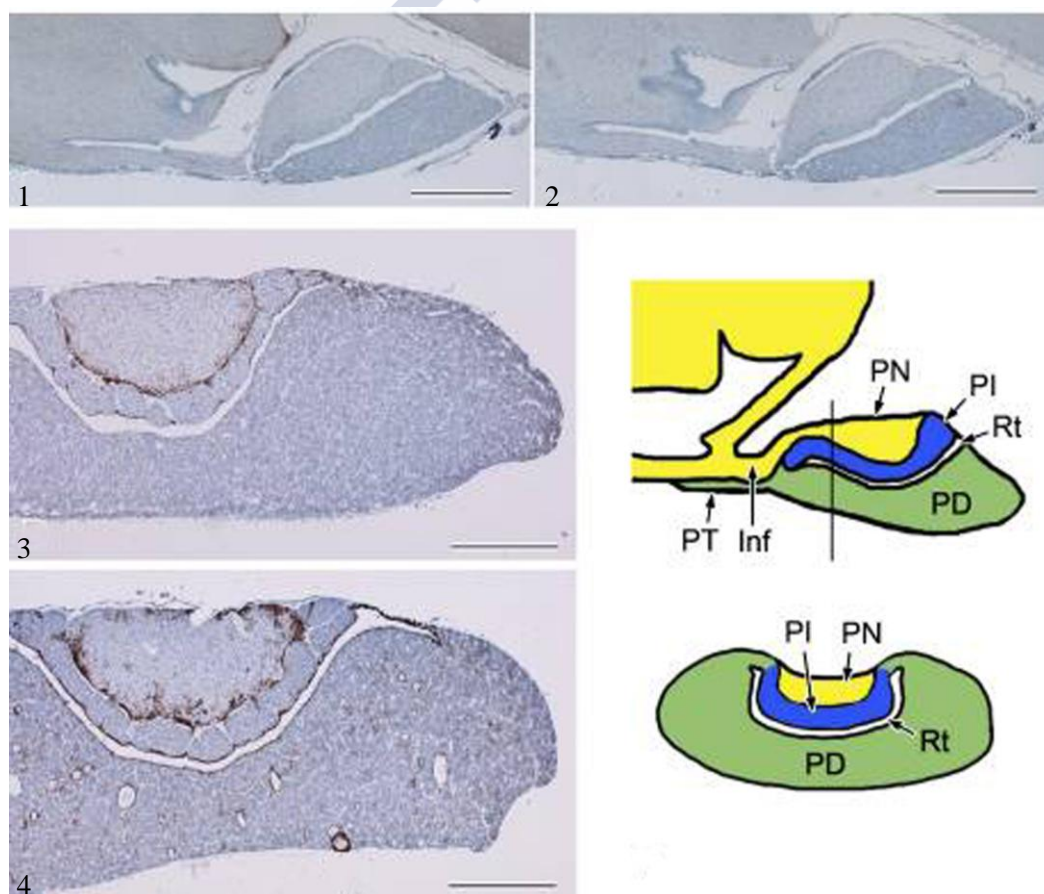


Fig. 27. Partes de la hipófisis de un roedor. El esquema superior muestra una descripción de la sección sagital y el esquema superior muestra una descripción de la sección coronal. Inf, infundíbulo; PN, *pars nervosa*; PT, *pars tuberalis*; PD, *pars distalis*; PI, *pars intermedia*; Rt, Bolsa de Rathke. Escalas =1 mm (1 - 2); 500 μ m (3 - 4). Adaptado de Matsuzaki et al, 2011.

Los GluRs están presentes en ambas regiones de la hipófisis, por lo que el DOM tendría capacidad de unirse tanto a la adenohipófisis como a la neurohipófisis. La ausencia de detección en la *pars intermedia*, así como el mayor y más evidente marcaje de la adenohipófisis podría explicarse por su diferente composición celular, si bien son necesarios estudios más profundos que arrojen luz sobre esta cuestión.

Pocos estudios se han realizado hasta el momento que relacionen esta formación anatómica con alteraciones causadas por el DOM, únicamente cabría mencionar que en estudios realizados en leones marinos (*Zalophus californianus*) intoxicados se relatan alteraciones de la corticotropina (hormona producida por la hipófisis que estimula a las glándulas suprarrenales) sin que se describan lesiones visibles (Gulland et al., 2012). Sin embargo, experimentos realizados en ratas no mostraron alteraciones de dicha hormona tras la administración i.p. de la toxina (Perry, 2004).

Otros estudios realizados con ratas mostraron que tras la administración i.p. del DOM se produce una alteración en las hormonas tiroideas, especialmente la triyodotironina (T3), la tiroxina (T4) y la tirotrópina (TSH) (Alfonso et al., 2000; Arufe et al., 1995). La adenohipófisis es la región responsable de la síntesis y secreción de la TSH, que a su vez estimulará a la glándula tiroides a producir las hormonas T4 y T3.

Por tanto, los resultados relacionados con esta formación son muy novedosos, ya que aunque existen informes previos de que la hipófisis pueda verse afectada, es la primera vez que se muestra que el DOM tiene cierta afinidad por ella. Son necesarios más estudios para determinar los tipos de células que se ven afectados y, mediante estudios de toxicidad a largo plazo, determinar si se produce cualquier tipo de lesión. La importancia de esta interacción del DOM con la hipófisis es grande, ya que el DOM es endémico en las costas gallegas, y su aportación crónica en la dieta a dosis legalmente permitidas podría estar causando efectos endocrinos totalmente desconocidos.





CONCLUSIONES



5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1.- La administración oral a ratones de ácido okadaico indica que, a pesar de los efectos diarreicos de esta toxina, tras 24 horas la mayor parte sigue en el interior del organismo, especialmente en el hígado y en el riñón. En el hígado se altera la expresión de enzimas detoxificantes, e histológicamente hay una importante necrosis. El ácido okadaico es por tanto potencialmente hepatotóxico y puede causar severos daños a corto plazo.

2.- El ácido domoico se detecta en el hipocampo poco después de su administración intraperitoneal a ratas. Las lesiones son visibles sólo con tiempos de actuación largos, y consisten en una importante necrosis y astrocitosis en el hipocampo y en otras regiones del sistema límbico. La elevación de la óxido nítrico sintasa implica al óxido nítrico en la patología observada.

3.- La dosis letal intraperitoneal de DOM es mucho menor en ratas que en ratones. El área afectada en ratas es el lóbulo límbico, especialmente el hipocampo, en ratones sin embargo no se observaron ni marcaje ni lesiones aparentes en esta región.

4.- Es la primera vez que se describe la presencia de DOM en la hipófisis. Aunque no se apreciaron lesiones, su presencia en la hipófisis sugiere posibles efectos endocrinos.





BIBLIOGRAFÍA



6 BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso A, de la Rosa L, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM. 2003. Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 65:193-208.
- Alfonso M, Duran R, Arufe MC. 2000. Effect of excitatory amino acids on serum TSH and thyroid hormone levels in freely moving rats. *Horm Res* 54:78-83.
- Alfonso A, Fernandez-Araujo A, Alfonso C, Carames B, Tobio A, Louzao MC, Vieytes MR, Botana LM. 2012. Palytoxin detection and quantification using the fluorescence polarization technique, *Anal Biochem* 424: 64-70.
- Alonso R, Pisa D, Marina AI, Morato E, Rabano A, Carrasco L. 2014. Fungal Infection in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*.
- Amaral, D and Lavenex P. 2006. Ch 3. Hippocampal Neuroanatomy. In Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T and O'Keefe J. eds. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- Amaral DG and Witter MP. 1995. Hippocampal Formation. In: George Paxinos ed. *The rat nervous system, Second Edition*, pp. 443-493. Academic Press, San Diego, California.
- Amaral, DG; Ishikuza, N and Clairborne, B. 1990. Neurons, numbers and the hippocampal network. In Storm-Mathisen J., Zimmer J. and Ottersen OP. eds. *Progress in Brain Research: Understanding the Brain through the Hippocampus: The Hippocampal Region as a Model for Studying Structure and Function*, pp.1-11.
- Amunts K, Kedo O, Kindler M, Pieperhoff P, Mohlberg H, Shah NJ, Habel U, Schneider F, Zilles K. 2005. Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps. *Anat Embryol (Berl)* 210:343-352.

- An T, Winshell J, Scorzetti G, Fell JW, Rein KS. 2010. Identification of okadaic acid production in the marine dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum* from Florida Bay. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 55:653-657.
- Ananth C, Dheen ST, Gopalakrishnakone P, Kaur C. 2003a. Distribution of NADPH-diaphorase and expression of nNOS, N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1) and non-NMDA glutamate receptor (GlutR2) genes in the neurons of the hippocampus after domoic acid-induced lesions in adult rats. *Hippocampus* 13:260-272.
- Ananth C, Gopalakrishnakone P, Kaur C. 2003b. Protective role of melatonin in domoic acid-induced neuronal damage in the hippocampus of adult rats. *Hippocampus* 13:375-387.
- Ananth C, Gopalakrishnakone P, Kaur C. 2003c. Induction of inducible nitric oxide synthase expression in activated microglia following domoic acid (DA)-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 338:49-52.
- Anderson DM, Glibert PM, Burkholder JM. 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25:704-726.
- Anderson DM, Kulis DM, Sullivan JJ, Shall S. 1990. Toxin composition variations in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Toxicon* 28:885-893.
- Appel NM, Rapoport SI, O'Callaghan JP. 1997. Sequelae of parenteral domoic acid administration in rats: comparison of effects on different anatomical markers in brain. *Synapse* 25:350-358.
- Arias C, Becerra-Garcia F, Arrieta I, Tapia R. 1998. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus in vivo. *Experimental neurology* 153:242-254.
- Arias C, Sharma N, Davies P, Shafit-Zagardo B. 1993. Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 61:673-682.

- Arufe MC, Arias B, Duran R, Alfonso M. 1995. Effects of domoic acid on serum levels of TSH and thyroid hormones. *Endocr Res* 21:671-680.
- Aune T. 2008. Risk assessment of marine toxins. In Botana LM ed. *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. pp. 3-20. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Aune T, Espenes, A., Aasen, J.A., Quilliam, M.A., Hess, P., Larsen, S. 2012. Study of possible combined toxic effects of azaspiracid-1 and okadaic acid in mice via the oral route. *Toxicon* 60:895-906.
- Aune T, Larsen S, Aasen JA, Rehmann N, Satake M, Hess P. 2007. Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice. *Toxicon* 49:1-7.
- Aune T, Sorby R, Yasumoto T, Ramstad H, Landsverk T. 2002. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 40:77-82.
- Aune T., Yndestad M. 1993: Diarrhetic shellfish poisoning. In: Falconer, IR. ed. *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, pp. 87-104. London: Academic Press.
- Baden DG. 1983. Marine food-borne dinoflagellate toxins. *Int Rev Cytol* 82:99-150.
- Baden DG, Bourdelais AJ, Jacocks H, Michelliza S, Naar J. 2005. Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity, and effects. *Environmental health perspectives* 113:621-625.
- Bakke MJ, Hustoft HK, Horsberg TE. 2010. Subclinical effects of saxitoxin and domoic acid on aggressive behaviour and monoaminergic turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology* 99:1-9.
- Balazs R, Bridges RJ, Cotman CW, Cotman CA. 2005. *Excitatory Amino Acid Transmission in Health and Disease*. New York: Oxford University Press.
- Bates SS. 2000. Domoic-acid-producing diatoms: Another genus added! *Journal of Phycology* 36:978-983.

- Bejarano AC, VanDola FM, Gulland FM, Rowles TK, Schwacke LH. 2008. Production and Toxicity of the Marine Biotoxin Domoic Acid and Its Effects on Wildlife: A Review. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 14:544-567.
- Berman FW, LePage KT, Murray TF. 2002. Domoic acid neurotoxicity in cultured cerebellar granule neurons is controlled preferentially by the NMDA receptor Ca(2+) influx pathway. *Brain research* 924:20-29.
- Berven G, Saetre F, Halvorsen K, Seglen PO. 2001. Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionality of rat liver and intestinal cells. *Toxicol* 39:349-362.
- Bhatnagar M, Shukla SD. 2008. Unilateral degeneration in hippocampus of female rat. *Neuroanatomy* 7:1-5.
- Bialojan C, Takai A. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256:283-290.
- Blankson H, Holen I, Seglen PO. 1995. Disruption of the cytokeatin cytoskeleton and inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid. *Exp Cell Res* 218:522-530.
- Boe R, Gjertsen BT, Vintermyr OK, Houge G, Lanotte M, Doskeland SO. 1991. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp Cell Res* 195:237-246.
- Botana LM., Alfonso A, Vale C, Vilariño N, Rubiolo J, Alonso E, Cagide E. 2014. The mechanistic complexities of phycotoxins: toxicology of azaspiracids and yessotoxins In Fishbein JC and Heiman JM. eds. *Advances in Molecular Toxicology* First edition ed. pp 1-33. Elsevier, Oxford.
- Botana LM, Alfonso A, Vieytes MR, Loza MI. 2004a. Therapeutic use of yessotoxins as growth inhibitors of human tumoral cells, In Patent (Compostela, U. o. S. d., Ed.).
- Botana LM, Alfonso A, Vieytes MR, Loza MI. 2004b. Therapeutic use of yessotoxins in the treatment of allergic and ashmatic processes, Patent PCT/ES 2004/000343, PCT/ES 2004/000343

- Botana LM, Alonso E, Vale C. 2011. Use of yessotoxin and analogs and derivatives thereof for treating and/or preventing neurodegenerative diseases linked to tau and beta amyloid. Patent PCT/ES2011/070078, WO 2011/095668 A095661.
- Bourne Y, Radic Z, Aráoz R, Talley TT, Benoit E, Servent D, Taylor P, Molgó J, Marchot P. 2010. Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. *PNAS* 107:6076-6081.
- Bower DJ, Hart RJ, Matthews PA, Howden ME. 1981. Nonprotein neurotoxins. *Clin Toxicol* 18:813-863.
- Bruni JE, Bose R, Pinsky C, Glavin G. 1991. Circumventricular organ origin of domoic acid-induced neuropathology and toxicology. *Brain Res Bull* 26:419-424.
- Buckmaster PS, Wen X, Toyoda I, Gulland FM, Van Bonn W. 2014. Hippocampal neuropathology of domoic acid-induced epilepsy in California sea lions (*Zalophus californianus*). *J Comp Neurol* 522:1691-1706.
- Burkholder JM, Glibert PM, Skelton HM. 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8:77-93.
- Caillet-Boudin ML, Delacourte A. 1996. Induction of a specific tau Alzheimer epitope in SY-5Y neuroblastoma cells. *Neuroreport* 8:307-310.
- Candeo P, Favaron M, Lengyel I, Manev RM, Rimland JM, Manev H. 1992. Pathological phosphorylation causes neuronal death: effect of okadaic acid in primary culture of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 59:1558-1561.
- Carpenter S. 1990. The human neuropathology of encephalopathic mussel toxin poisoning. *Can Dis Wkly Rep* 16 Suppl 1E:73-74.
- Cembella AD, Lewis NI, Quilliam MA. 2000. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia* 39:67-74

- Cendes F, Andermann F, Carpenter S, Zatorre RJ, Cashman NR. 1995. Temporal lobe epilepsy caused by domoic acid intoxication: evidence for glutamate receptor-mediated excitotoxicity in humans. *Ann Neurol* 37:123-126.
- Chen T, Xu X, Wei J, Chen J, Miu R, Huang L, Zhou X, Fu Y, Yan R, Wang Z, Liu B, He F. 2013. Food-borne disease outbreak of diarrhetic shellfish poisoning due to toxic mussel consumption: the first recorded outbreak in china. *PLoS ONE* 8:e65049.
- Cheung TH, Cardinal RN. 2005. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neurosci* 13:36.
- Chevallier OP, Graham SF, Alonso E, Duffy C, Silke J, Campbell K, Botana LM, Elliott CT. 2015. New insights into the causes of human illness due to consumption of azaspiracid contaminated shellfish. *Sci Rep* 5:9818.
- Chiamulera C, Costa S, Valerio E, Reggiani A. 1992. Domoic acid toxicity in rats and mice after intracerebroventricular administration: comparison with excitatory amino acid agonists. *Pharmacol Toxicol* 70:115-120.
- Chittajallu R, Braithwaite SP, Clarke VR, Henley JM. 1999. Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci* 20:26-35.
- Clayton EC, Peng YG, Means LW, Ramsdell JS. 1999. Working memory deficits induced by single but not repeated exposures to domoic acid. *Toxicol* 37:1025-1039.
- Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y. 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* 15:98-102.
- Colman JR, Nowocin KJ, Switzer RC, Trusk TC, Ramsdell JS. 2005. Mapping and reconstruction of domoic acid-induced neurodegeneration in the mouse brain. *Neurotoxicol Teratol* 27:753-767.
- Conn PJ, Pin JP. 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.

- Cook P, Reichmuth C, Gulland F. 2011. Rapid behavioural diagnosis of domoic acid toxicosis in California sea lions. *Biol Lett* 7:536-538.
- Cooke SF, Bliss TV. 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129:1659-1673.
- Costa AP, Tramontina AC, Biasibetti R, Batassini C, Lopes MW, Wartchow KM, Bernardi C, Tortorelli LS, Leal RB, Goncalves CA. 2012. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behav Brain Res* 226:420-427.
- Costa L, Giordano, G., Faustman, EM. 2010. Domoic acid as a developmental neurotoxin. *Neurotoxicology* 31:409-423.
- Costa PR, Rodrigues SM, Botelho MJ, Sampayo MA. 2003. A potential vector of domoic acid: the swimming crab *Polydora henslowii* Leach (Decapoda-brachyura). *Toxicon* 42:135-141.
- Costa PR, Rosa R, Duarte-Silva A, Brotas V, Sampayo MA. 2005. Accumulation, transformation and tissue distribution of domoic acid, the amnesic shellfish poisoning toxin, in the common cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquatic toxicology* 74:82-91.
- Cuypers E, Abdel-Mottaleb Y, Kopljar I, Rainier JD, Raes AL, Snyders DJ, Tytgat J. 2008. Gambierol, a toxin produced by the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*, is a potent blocker of voltage-gated potassium channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 51:974-983.
- Dakshinamurti K, Sharma SK, Sundaram M. 1991. Domoic acid induced seizure activity in rats. *Neurosci Lett* 127:193-197.
- Dakshinamurti K, Sharma SK, Sundaram M, Watanabe T. 1993. Hippocampal changes in developing postnatal mice following intrauterine exposure to domoic acid. *J Neurosci* 13:4486-4495.
- Daranas AH, Norte M, Fernandez JJ. 2001. Toxic marine microalgae. *Toxicon* 39:1101-1132.
- de la Riva GT, Johnson CK, Gulland FM, Langlois GW, Heyning JE, Rowles TK, Mazet JA. 2009. Association of an unusual marine mammal mortality event with *Pseudo-nitzschia* spp. Blooms along the southern California coastline. *J Wildl Dis* 45:109-121.

- Debonnel G, Weiss M, de Montigny C. 1990. Neurotoxic effect of domoic acid: mediation by kainate receptor electrophysiological studies in the rat. *Can Dis Wkly Rep* 16 Suppl 1E:59-68.
- Dechraoui MY, Naar J, Pauillac S, Legrand AM. 1999. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 37:125-143.
- Dell'Ovo V, Bandi E, Coslovich T, Florio C, Sciancalepore M, Decorti G, Sosa S, Lorenzon P, Yasumoto T, Tubaro A. 2008. In vitro effects of yessotoxin on a primary culture of rat cardiomyocytes. *Toxicol Sci* 106:392-399.
- Demeneix BA, Desaulles E, Feltz P, Loeffler JP. 1984. Dual population of GABAA and GABAB receptors in rat pars intermedia demonstrated by release of alpha MSH caused by barium ions. *Br J Pharmacol* 82:183-190.
- Dickey RW, Bobzin SC, Faulkner DJ, Bencsath FA, Andrzejewski D. 1990. Identification of okadaic acid from a Caribbean dinoflagellate, *Prorocentrum concavum*. *Toxicon* 28:371-377.
- Dickey RW, Plakas SM. 2010. Ciguatera: a public health perspective. *Toxicon* 56:123-136.
- Dominguez HJ, Paz B, Daranas AH, Norte M, Franco JM, Fernandez JJ. 2010. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicon* 56:191-217.
- Draisici R, Lucentini L, Giannetti L, Boria P, Poletti R. 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 34:923-935.
- Drews P, Jr., Colares R, Machado P, de Faria M, Detoni AI, Tavano Vn. 2013. Microalgae classification using semi-supervised and active learning based on Gaussian mixture models. *Journal of the Brazilian Computer Society* 19:411-422.
- Edebo L, Lange S, Li XP, Allenmark S. 1988. Toxic mussels and okadaic acid induce rapid hypersecretion in the rat small intestine. *APMIS* 96:1029-1035.

- EFSA. 2008a. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish- Yessotoxin group. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), The EFSA Journal 907, 1-62.
- EFSA. 2008b. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues. The EFSA Journal 589:1-62.
- EFSA. 2009a. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish- Domoic acid. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), The EFSA Journal 1181:1-61.
- EFSA. 2009b. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish- Palytoxin group. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), The EFSA Journal 7, 1393-1431
- EFSA. 2010. 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 8, 1628-1667).
- Elgarch A, Vale P, Rifai S, Fassouane A. 2008. Detection of diarrhetic shellfish poisoning and azaspiracid toxins in Moroccan mussels: comparison of the LC-MS method with the commercial immunoassay kit. *Marine drugs* 6:587-594.
- Eriksson JE, Brautigan DL, Vallee R, Olmsted J, Fujiki H, Goldman RD. 1992. Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11093-11097.
- Erin N, Billingsley ML. 2004. Domoic acid enhances Bcl-2-calcineurin-inositol-1,4,5-trisphosphate receptor interactions and delayed neuronal death in rat brain slices. *Brain Res* 1014:45-52.
- Espiña B, Cagide E, Louzao MC, Fernandez MM, Vieytes MR, Katikou P, Villar A, Jaen D, Maman L, Botana LM. 2009. Specific and dynamic detection of palytoxins by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells. *Biosci Rep* 29:13-23.
- Espiña B, Louzao MC, Ares IR, Fonfría ES, Vilariño N, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM. 2010a. Impact of the pectenotoxin C-43 oxidation degree on its cytotoxic effect on rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 23:504-515.

- Espiña B, Louzao MC, Cagide E, Alfonso A, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM. 2010b. The methyl ester of okadaic acid is more potent than okadaic acid in disrupting the actin cytoskeleton and metabolism of primary cultured hepatocytes. *Br J Pharmacol* 159:337-344.
- Espiña B, Otero P, Louzao MC, Alfonso A, Botana LM. 2011. 13-Desmethyl spirolide-c and 13,19-didesmethyl spirolide-c trans-epithelial permeabilities: human intestinal permeability modelling. *Toxicology* 287:69-75.
- Espiña B, Rubiolo JA. 2008. Marine toxins and the cytoskeleton: pectenotoxins, unusual macrolides that disrupt actin. *The FEBS journal* 275:6082-6088.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2004. Marine Biotoxins. In FAO Food and Nutrition; Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 80. Rome, Italy.
- Faust MA, Whittaker S. Microfotografía de *Lingulodinium polyedrum*. Smithsonian Institution.
- Ferdin ME, Kvitek RG, Bretz CK, Powell CL, Doucette GJ, Lefebvre KA, Coale S, Silver MW. 2002. *Emerita analoga* (Stimpson)--possible new indicator species for the phycotoxin domoic acid in California coastal waters. *Toxicon* 40:1259-1265.
- Fernandez DA, Louzao MC, Vilarino N, Espina B, Fraga M, Vieytes MR, Roman A, Poli M, Botana LM. 2013. The kinetic, mechanistic and cytomorphological effects of palytoxin in human intestinal cells (Caco-2) explain its lower-than-parenteral oral toxicity. *FEBS J* 280:3906-3919.
- Fernández-Araujo A, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. 2015. Key role of phosphodiesterase 4A (PDE4A) in autophagy triggered by yessotoxin. *Toxicology* 329:60-72.
- Ferreira M, Lago J, Vieites JM, Cabado AG. 2014. World production of bivalve mollusks and socioeconomic facts related to the impact of marine toxins. In Botana LM ed. *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. 3rd edition. pp 291-312. CRC Press (Taylor and Francys Group), Boca Raton, FL.

- Fire SE, Wang Z, Byrd M, Whitehead HR, Paternoster J, Morton SL. 2011. Co-occurrence of multiple classes of harmful algal toxins in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) stranding during an unusual mortality event in Texas, USA. *Harmful Algae* 10:330-336.
- Fletcher, TF, Beitz AJ. 2013. The Brain. Chapter 18 in *Miller's Anatomy of the Dog*, fourth edition; edited by Evans, H. and deLahunta A. Elsevier (Saunders), Philadelphia.
- Florida Fish and Wildlife Conservation Commission. Microfotografía de *Karenia brevis*.
- Fontal OI, Vieytes MR, Baptista de Sousa JM, Louzao MC, Botana LM. 1999. A fluorescent microplate assay for microcystin-LR. *Anal Biochem* 269:289-296.
- Franchini A, Marchesini E, Poletti R, Ottaviani E. 2005. Swiss mice CD1 fed on mussels contaminated by okadaic acid and yessotoxins: effects on thymus and spleen. *Eur J Histochem* 49:179-188.
- Friedberg EB, Ross DT. 1993. Degeneration of rat thalamic reticular neurons following intrathalamic domoic acid injection. *Neurosci Lett* 151:115-119.
- Friedman MA, Arena P, Levin B, Fleming L, Fernandez M, Weisman R, Bernstein J, Schrank K, Blythe D, Backer L, Reich A. 2007. Neuropsychological study of ciguatera fish poisoning: a longitudinal case-control study. *Arch Clin Neuropsychol* 22:545-553.
- Friedman MA, Fleming LE, Fernandez M, Bienfang P, Schrank K, Dickey R, Bottein MY, Backer L, Ayyar R, Weisman R, Watkins S, Granade R, Reich A. 2008. Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Marine drugs* 6:456-479.
- Friedman MA, Levin BE. 2005. Neurobehavioral effects of harmful algal bloom (HAB) toxins: a critical review. *J Int Neuropsychol Soc* 11:331-338.
- Fritz L, Quilliam MA, Wright JLC, Beale AM, Work TM. 1992. An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *pseudonitzschia australis*. *Journal of Phycology* 28:439-442.
- Fujiki H, Suganuma M. 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Advances in cancer research* 61:143-194.

- Fujiki H, Suganuma M, Nishiwaki S, Yoshizawa S, Yatsunami J, Matsushima R, Furuya H, Okabe S, Matsunaga S, Sugimura T. 1992. Specific mechanistic aspects of animal tumor promoters: the okadaic acid pathway. *Prog Clin Biol Res* 374:337-350.
- Fujiki H, Suganuma M, Yoshizawa S, Nishiwaki S, Winyar B, Sugimura T. 1991. Mechanisms of action of okadaic acid class tumor promoters on mouse skin. *Environ Health Perspect* 93:211-214.
- Fujiki H, Sugimura T, George Klein and Sidney W. 1987. New Classes of Tumor Promoters: Teleocidin, Aplysiatoxin, and Palytoxin. In: *Advances in Cancer Research: Academic Press*. p 223-264.
- Fukuyo Y, Takayama H. Microfotografía de *Gymnodinium catenatum*. WESTPAC-HAB.
- Funk JA, Janech MG, Dillon JC, Bissler JJ, Siroky BJ, Bell PD. 2014. Characterization of renal toxicity in mice administered the marine biotoxin domoic acid. *J Am Soc Nephrol* 25:1187-1197.
- Fuquay JM, Muha N, Pennington PL, Ramsdell JS. 2012. Domoic acid induced status epilepticus promotes aggressive behavior in rats. *Physiol Behav* 105:315-320.
- Garcia C, del Carmen Bravo M, Lagos M, Lagos N. 2004. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon* 149-158.
- Garcia C, Lagos M, Truan D, Lattes K, Vejar O, Chamorro B, Iglesias V, Andrinolo D, Lagos N. 2005. Human intoxication with paralytic shellfish toxins: clinical parameters and toxin analysis in plasma and urine. *Biol Res* 38:197-205.
- Gill S, Murphy M, Clausen J, Richard D, Quilliam M, MacKinnon S, LaBlanc P, Mueller R, Pulido O. 2003. Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides: a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis. *Neurotoxicology* 24:593-604.
- Gill S, Veinot J, Kavanagh M, Pulido O. 2007. Human heart glutamate receptors - implications for toxicology, food safety, and drug discovery. *Toxicol Pathol.* 35:411-417.
- Gill SS, Pulido OM. 2001. Glutamate receptors in peripheral tissues: current knowledge, future research, and implications for toxicology. *Toxicol Pathol* 29:208-223.

- Giordano G, Kavanagh TJ, Costa LG. 2008a. Neurotoxicity of a polybrominated diphenyl ether mixture (DE-71) in mouse neurons and astrocytes is modulated by intracellular glutathione levels. *Toxicol Appl Pharmacol* 232:161-168.
- Giordano G, Klintworth HM, Kavanagh TJ, Costa LG. 2008b. Apoptosis induced by domoic acid in mouse cerebellar granule neurons involves activation of p38 and JNK MAP kinases. *Neurochem Int* 52:1100-1105.
- Giordano G, White CC, McConnachie LA, Fernandez C, Kavanagh TJ, Costa LG. 2006. Neurotoxicity of domoic Acid in cerebellar granule neurons in a genetic model of glutathione deficiency. *Mol Pharmacol*.70:2116-2126.
- Giordano G, White CC, Mohar I, Kavanagh TJ, Costa LG. 2007. Glutathione levels modulate domoic acid induced apoptosis in mouse cerebellar granule cells. *Toxicol Sci* 100:433-444.
- Giovannucci DR, Stuenkel EL. 1995. Glutamate receptor agonists modulate $[Ca^{2+}]_i$ in isolated rat melanotropes. *Neuroendocrinology* 62:111-122.
- Godfrey M. Photography of a Red algal bloom, near Cape Rodney. Science Education Resource Center Carleton. Microbial Life, Educational Resources.
- Goldstein T, Mazet JA, Zabka TS, Langlois G, Colegrove KM, Silver M, Bargu S, Van Dolah F, Leighfield T, Conrad PA, Barakos J, Williams DC, Dennison S, Haulena M, Gulland FM. 2008. Novel symptomatology and changing epidemiology of domoic acid toxicosis in California sea lions (*Zalophus californianus*): an increasing risk to marine mammal health. *Proc Biol Sci* 275:267-276.
- Goldstein T, Zabka TS, Delong RL, Wheeler EA, Ylitalo G, Bargu S, Silver M, Leighfield T, Van Dolah F, Langlois G, Sidor I, Dunn JL, Gulland FM. 2009. The role of domoic acid in abortion and premature parturition of California sea lions (*Zalophus californianus*) on San Miguel Island, California. *J Wildl Dis* 45:91-108.

- Gómez F. 2005. A list of free-living dinoflagellate species in the world's oceans. *Acta Botanica Croatica* 64.
- Grimmelt B, Nijjar MS, Brown J, Macnair N, Wagner S, Johnson GR, Amend JF. 1990. Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and toxicity in mice. *Toxicon* 28:501-508.
- Gulland FMD. 2000. Domoic acid toxicity in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, May-October 1998. Report to the National Marine Fisheries Service Working Group on Unusual Marine Mammal Mortality Events.
- Gulland FM, Hall AJ, Greig DJ, Frame ER, Colegrove KM, Booth RK, Wasser SK, Scott-Moncrieff JC. 2012. Evaluation of circulating eosinophil count and adrenal gland function in California sea lions naturally exposed to domoic acid. *J Am Vet Med Assoc* 241: 943-949.
- Hallegraeff GM. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32:79-99.
- Hallegraeff GM. 1995. 1. Harmful algal blooms: a global overview. In Hallegraeff, GM. et al. eds. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, pp. 1-22. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.
- Hansen KF, Sakamoto K, Wayman GA, Impey S, Obrietan K. 2010. Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory. *PLoS One* 5: e15497
- Hansen G. 2009. Microfotografía de *Dinophysis caudata*. *World Register of Marine Species*.
- Hansen R. 2011. Microfotografía de *Pseudo-nitzschia pungens*. *Nordic microalgae and aquatic protozoa*.
- He J, Yamada K, Zou LB, Nabeshima T. 2001. Spatial memory deficit and neurodegeneration induced by the direct injection of okadaic acid into the hippocampus in rats. *J Neural Transm* 108:1435-1443.
- He J, Yang Y, Xu H, Zhang X, Li XM. 2005. Olanzapine attenuates the okadaic acid-induced spatial memory impairment and hippocampal cell death in rats. *Neuropsychopharmacology* 30:1511-1520.

- Hesp BR, Clarkson AN, Sawant PM, Kerr DS. 2007. Domoic acid preconditioning and seizure induction in young and aged rats. *Epilepsy Res* 76:103-112.
- Hilgemann DW. 2003. From a pump to a pore: How palytoxin opens the gates. *PNAS* 100:501-5.
- Hoagland P, Scatista S. 2006. The Economic Effects of Harmful Algal Blooms. In Granéli E, Turner J, eds. *Ecology of Harmful Algae*: Springer Berlin Heidelberg. p 391-402.
- Holland PT, Selwood AI, Mountfort DO, Wilkins AL, McNabb P, Rhodes LL, Doucette GJ, Mikulski CM, King KL. 2005. Isodomoic acid C, an unusual amnesic shellfish poisoning toxin from *Pseudo-nitzschia australis*. *Chem Res Toxicol* 18:814-816.
- Howard MDA, Mary Silver M, Kudela RM. 2008. Yessotoxin detected in mussel (*Mytilus californicus*) and phytoplankton samples from the U.S. west coast. *Harmful Algae* 7:646-652.
- Hu T, Curtis JM, Walter JA, Wright JLC. 1995. Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 5:597-599.
- Immenschuh S, Hinke V, Katz N, Kietzmann T. 2000. Transcriptional induction of heme oxygenase-1 gene expression by okadaic acid in primary rat hepatocyte cultures. *Mol Pharmacol* 57: 610-618.
- Inomata M, Saijo N, Kawashima K, Kaneko A, Fujiwara Y, Kunikane H, Tanaka Y. 1995. Induction of apoptosis in cultured retinoblastoma cells by the protein phosphatase inhibitor, okadaic acid. *J Cancer Res Clin Oncol* 121:729-738.
- Ito E, Satake M, Ofuji K, Higashi M, Harigaya K, McMahan T, Yasumoto T. 2002a. Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon* 40:193-203.
- Ito E, Satake M, Ofuji K, Kurita N, McMahan T, James K, Yasumoto T. 2000. Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon* 38:917-930.

- Ito E, Suzuki T, Oshima Y, Yasumoto T. 2008. Studies of diarrhetic activity on pectenotoxin-6 in the mouse and rat. *Toxicon* 51:707-716.
- Ito E, Terao K. 1994. Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds. *Nat Toxins* 2:371-377.
- Ito E, Yasumoto T, Takai A, Imanishi S, Harada K. 2002b. Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method. *Toxicon* 40:159-165.
- Iverson F, Truelove J, Nera E, Tryphonas L, Campbell J, Lok E. 1989. Domoic acid poisoning and mussel-associated intoxication: preliminary investigations into the response of mice and rats to toxic mussel extract. *Food Chem Toxicol* 27:377-384.
- James KJ, Bishop AG, Healy BM, Roden C, Sherlock IR, Twohig M, Draisci R, Giannetti L, Lucentini L. 1999. Efficient isolation of the rare diarrhoeic shellfish toxin, dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton. *Toxicon* 37:343-357.
- James KJ, Carey B, O'Halloran J, van Pelt FN, Skrabakova Z. 2010. Shellfish toxicity: human health implications of marine algal toxins. *Epidemiol Infect* 138:927-940.
- Jane DE, Lodge D, Collingridge GL. 2009. Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology* 56:90-113.
- Jayaraj R, Gupta N, Rao PV. 2009. Multiple signal transduction pathways in okadaic acid induced apoptosis in HeLa cells. *Toxicology* 256:118-127.
- Jeffery B, Barlow T, Moizer K, Paul S, Boyle C. 2004. Amnesic shellfish poison. *Food Chem Toxicol* 42:545-557.
- Jones TO, Whyte JN, Ginther NG, Townsend LD, Iwama GK. 1995. Haemocyte changes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, caused by exposure to domoic acid in the diatom *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseries*. *Toxicon* 33:347-353.
- Kamat PK, Rai S, Nath C. 2013. Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *Neurotoxicology* 37:163-172.

- Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Nath C. 2014. Mechanism of synapse redox stress in Okadaic acid (ICV) induced memory impairment: Role of NMDA receptor. *Neurochem Int* 76:32-41
- Kamat PK, Tota S, Saxena G, Shukla R, Nath C. 2010. Okadaic acid (ICV) induced memory impairment in rats: a suitable experimental model to test anti-dementia activity. *Brain Res* 1309:66-74.
- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 47:1304-1309.
- Kat M. 1983. Diarrhetic mussel poisoning in the Netherlands related to the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49:417-427.
- Kat, M. 1985. *Dinophysis acuminata* blooms, the distinct cause of Dutch mussel poisoning. In Anderson, DM., White, AW. & Baden, DG. eds. *Toxic Dinoflagellates*. pp. 73-77. Elsevier/North Holland, New York.
- Kerr DS, Razak A, Crawford N. 2002. Age-related changes in tolerance to the marine algal excitotoxin domoic acid. *Neuropharmacology* 43:357-366.
- Khookhor O Umegaki H. 2013. The cholinergic stimulation of the hippocampus induced the activation of the sympathetic nervous system. *Neuro Endocrinol Lett* 34:58-61.
- Kim B, van Golen CM, Feldman EL. 2003. Degradation and dephosphorylation of focal adhesion kinase during okadaic acid-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neoplasia* 5:405-416.
- Kim D, Su J, Cotman CW. 1999. Sequence of neurodegeneration and accumulation of phosphorylated tau in cultured neurons after okadaic acid treatment. *Brain Res* 839:253-262.
- Kirino T, Tamura A, Sano K. 1984. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 64:139-147.
- Kocsis ZS, Molnár CS, Watanabe M, Daneels G, Moechars D, Liposits Z, Hrabovszky E. 2010. Demonstration of vesicular glutamate transporter-1 in corticotroph cells in the anterior pituitary of the rat. *Neurochem Int* 56:479-486.

- Kodama M, Ogata T, Sato S. 1988. Bacterial Production of Saxitoxin (Microbiology & Fermentation Industry). *Agric Biol Chem* 52:1075-1077.
- Kotaki Y, Furio EF, Satake M, Lundholm N, Katayama T, Koike K, Fulgueras VP, Bajarias FA, Takata Y, Kobayashi K, Sato S, Fukuyo Y, Kodama M. 2005. Production of isodomoic acids A and B as major toxin components of a pennate diatom *Nitzschia navis-varingica*. *Toxicon* 46:946-953.
- Kreuder C, Miller MA, Lowenstine LJ, Conrad PA, Carpenter TE, Jessup DA, Mazet JA. 2005. Evaluation of cardiac lesions and risk factors associated with myocarditis and dilated cardiomyopathy in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Am J Vet Res* 66:289-299.
- Kumagai M, Yanagi T, Murata M, Yasumoto T, Kat M, Lassus P, Rodriguez-Vazquez JA. 1986. Okadaic Acid as the Causative Toxin of Diarrhetic Shellfish Poisoning in Europe. *Agric Biol Chem* 50:2853-2857.
- Legrand AM, Galonnier M, Bagnis R. 1982. Studies on the mode of action of ciguateric toxins. *Toxicon* 20:311-315.
- Le Hégarat L, Jacquin AG, Bazin E, Fessard V. 2006. Genotoxicity of the marine toxin okadaic acid, in human Caco-2 cells and in mice gut cells. *Environ Toxicol.* 21:55-64.
- Ledo A, Frade, J., Barbosa, RM., Laranjinha, J. 2004. Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. *Mol Aspects Med.* 25(1-2):75-89.
- Lee J-S, Igarashi T, Fraga S, Dahl E, Hovgaard P, Yasumoto T. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J Appl Phycol*:147-152.
- Lefebvre K, Dovel SL, Silver MW. 2001. Tissue distribution and neurotoxic effects of domoic acid in a prominent vector species, the northern anchovy *Engraulis mordax*. *Marine Biology* 138:693-700.
- Lefebvre KA, Noren DP, Schultz IR, Bogard SM, Wilson J, Eberhart BT. 2007. Uptake, tissue distribution and excretion of domoic acid after oral exposure in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquat Toxicol.* 81:266-274

- Lefebvre K, Powell CL, Busman M, Doucette GJ, Moeller PD, Silver JB, Miller PE, Hughes MP, Singaram S, Silver MW, Tjeerdema RS. 1999. Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event. *Nat Toxins* 7:85-92.
- Lefebvre K, Robertson, A. 2010. Domoic acid and human exposure risks: a review. *Toxicon* 56:218-230.
- Lefebvre K, Silver M, Coale S, Tjeerdema R. 2002. Domoic acid in planktivorous fish in relation to toxic *Pseudo-nitzschia* cell densities. *Marine Biology* 140:625-631.
- Lehane L. 1999. Ciguatera fish poisoning: a review in a risk assessment framework. National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry-Australia, Canberra.
- Lehane L, Lewis RJ. 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int J Food Microbiol* 61:91-125.
- Leira F, Alvarez C, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM. 2001a. Study of cytoskeletal changes induced by okadaic acid in BE(2)-M17 cells by means of a quantitative fluorimetric microplate assay. *Toxicol In Vitro* 15:277-282.
- Leira F, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM. 2001b. Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicol In Vitro* 15:199-208.
- Le Tissier PR, Hodson DJ, Lafont C, Fontanaud P, Schaeffer M, Mollard P. 2012. Anterior pituitary cell networks. *Front Neuroendocrinol* 33:252-266.
- Levin ED, Pizarro K, Pang WG, Harrison J, Ramsdell JS. 2005. Persisting behavioral consequences of prenatal domoic acid exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol* 27:719-725.
- Levin M, Leibrecht H, Ryan J, Van Dolah F, De Guise S. 2008. Immunomodulatory effects of domoic acid differ between in vivo and in vitro exposure in mice. *Mar Drugs* 6:636-659.
- Lewis, N. Microfotografía de *Alexandrium ostenfeldii*. National Research Council of Canada.
- Lindahl, O. 1998. Occurrence and Monitoring of harmful algae in the marine environment. In Miraglia M, Van Egmond H, Brera C, Gilbert J eds. *Mycotoxins and phycotoxins - developments in*

- chemistry, toxicology and food safety. Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. pp. 409-423. Fort Collins, Colorado, Alaken Press.
- Lindström P, Ohlsson L. 1992. Effect of N-methyl-D,L-aspartate on isolated rat somatotrophs. *Endocrinology* 131:1903-1907.
- Lomeli H, Wisden W, Kohler M, Keinanen K, Sommer B, Seeburg PH. 1992. High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS Lett* 307:139-143.
- Louzao MC, Ares IR, Cagide E, Espina B, Vilarino N, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. 2011. Palytoxins and cytoskeleton: An overview. *Toxicon* 57:460-469.
- Llewellyn LE. 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat Prod Rep* 23:200-222.
- Luisa Fernández M, Reguera B, González-Gil S, Míguez A. 2006. Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain). *Toxicon* 48:477-490.
- MacKenzie L, Holland P, McNabb P, Beuzenberg V, Selwood A, Suzuki T. 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* 40:1321-1330.
- Madl JE, Duncan CG, Stanhill JE, Tai PY, Spraker TR, Gulland FM. 2014. Oxidative stress and redistribution of glutamine synthetase in California sea lions (*Zalophus californianus*) with domoic acid toxicosis. *J Comp Pathol* 150:306-315.
- Malchiodi-Albedi F, Petrucci TC, Picconi B, Iosi F, Falchi M. 1997. Protein phosphatase inhibitors induce modification of synapse structure and tau hyperphosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 48:425-438.
- Matias WG, Traore A, Creppy EE. 1999. Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome. *Hum Exp Toxicol* 18:345-50.

- Matsuzaki T, Inahata Y, Sawai N, Yang CY, Kobayashi M, Takata K, Ozawa H. 2011. Immunohistochemical Localization of the Water Channels AQP4 and AQP5 in the Rat Pituitary Gland. *Acta Histochem Cytochem* 44:259-266.
- Maucher JM, Ramsdell JS. 2007. Maternal-fetal transfer of domoic acid in rats at two gestational time points. *Environ Health Perspect* 115:1743-1746.
- Mayer B, Hemmens B. 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22:477-481.
- Mayer B, John M, Böhme E. 1990. Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* 277:215-219.
- Mazmanci B, Çavaş T. 2010. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and gill tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following in vivo exposure to domoic acid. *Toxicon* 55:734-738.
- McCarron P, Emteborg H, Hess P. 2007. Freeze-drying for the stabilisation of shellfish toxins in mussel tissue (*Mytilus edulis*) reference materials. *Anal Bioanal Chem* 387:2475-2486.
- McMahon T, Silke J. 1996. Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News* 14:2.
- Meeker RB, Greenwood RS, Hayward JN. 1994. Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 134:621-629.
- Meda M, Kodama T, Tanaka T, Yoshizumi H, Takemoto T, Nomoto K, Fujita T. 1986. Structures of isodomoic acids A, B and C, novel insecticidal amino acids from the red alga *Chondria armata*. *Chem. Pharm. Bull* 34:4892-4895.
- Miles CO, Wilkins AL, Munday R, Dines MH, Hawkes AD, Briggs LR, Sandvik M, Jensen DJ, Cooney JM, Holland PT, Quilliam MA, MacKenzie AL, Beuzenberg V, Towers NR. 2004. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon* 43:1-9.

- Mons MN, Van Egmond HP, Speijers GJA. 1998. Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005.
- Moore RE, Scheuer PJ. 1971. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* 172:495-498.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
- Morris PD, Campbell DS, Taylor TJ, Freeman JI. 1991. Clinical and epidemiological features of neurotoxic shellfish poisoning in North Carolina. *Am J Public Health* 81:471-474.
- Moser EI. 2011. The multi-laned hippocampus. *Nat Neurosci* 14:407-408.
- Munday R. 2013. Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic Acid in animals? *Toxins* 5:267-285.
- Munday R. 2014. Toxicology of seafood toxins: a critical review. In Botana, LM ed. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. 3rd ed., pp 197-290, CRC Press, Boca Raton.
- Munday R, Holland PT, McNabb P, Selwood AI, Rhodes LL. 2008. Comparative toxicity to mice of domoic acid and isodomoic acids A, B and C. *Toxicon* 52:954-956.
- Munday R, Reeve J. 2013. Risk assessment of shellfish toxins. *Toxins* 5:2109-2137.
- Murakami Y, Oshima Y, Yasumoto T. 1982. Identification of Okadaic Acid As a Toxic Component of a Marine Dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 48:69-72.
- Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T. 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Letters* 28:5869-5872.
- Murata M, Shimatani M, Sugitani H, Oshima Y, Yasumoto T. 1982. Isolation and Structural Elucidation of the Causative Toxin of the Diarrhetic Shellfish Poisoning. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 48:549-552.

- Nagai H, Mikami Y, Yazawa K, Gono T, Yasumoto T. 1993. Biological activities of novel polyether antifungals, gambieric acids A and B from a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J Antibiot (Tokyo)* 46:520-522.
- Nagai H, Murata M, Torigoe K, Satake M, Yasumoto T. 1992. Gambieric acids, new potent antifungal substances with unprecedented polyether structures from a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Org. Chem* 57:5448-5453.
- Nakajima S, Potvin JL. 1992. Neural and behavioural effects of domoic acid, an amnesic shellfish toxin, in the rat. *Can J Psychol* 46:569-581.
- Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael W, Fujiki H. 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol* 118:420-424.
- Noda T, Kikuchi M, Kaidzu S, Yashiro T. 2003. Rat anterior pituitary cells in vitro can partly reconstruct in vivo topographic affinities. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 272:548-555.
- Nogueira I, Lobo-da-Cunha A, Afonso A, Rivera S, Azevedo J, Monteiro R, Cervantes R, Gago-Martinez A, Vasconcelos V. 2010. Toxic effects of domoic acid in the seabream *Sparus aurata*. *Mar Drugs* 8:2721-2732.
- Norton TA, Melkonian M, Andersen RA. 1996. Algal biodiversity. *Phycologia* 35:353-65.
- Ogino H, Kumagai M, Yasumoto T. 1997. Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat Toxins* 5:255-259.
- Ohta T, Sueoka E, Iida N, Komori A, Suganuma M, Nishiwaki R, Tatematsu M, Kim SJ, Carmichael WW, Fujiki H. 1994. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Res* 54:6402-6406.
- Oikawa T, Suganuma M, Ashino-Fuse H, Shimamura M. 1992. Okadaic acid is a potent angiogenesis inducer. *Jpn J Cancer Res* 83:6-9.
- Olney JW, Rhee V, Gubareff TD. 1977. Neurotoxic effects of glutamate on mouse area postrema. *Brain Res* 120: 151-157.

- Opsahl JA, Ljostveit S, Solstad T, Risa K, Roepstorff P, Fladmark KE. 2013. Identification of dynamic changes in proteins associated with the cellular cytoskeleton after exposure to okadaic acid. *Marine drugs* 11:1763-1782.
- Orozco J, Medlin LK. 2013. Review: advances in electrochemical genosensors-based methods for monitoring blooms of toxic algae. *Environmental science and pollution research international* 20:6838-6850.
- Otero P, Alfonso A, Rodríguez P, Rubiolo JA, Cifuentes JM, Bermúdez R, Vieytes MR, Botana LM. 2012. Pharmacokinetic and toxicological data of spirulides after oral and intraperitoneal administration. *Food Chem Toxicol* 50:232-237.
- Palmada M, Centelles JJ. 1998. Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. *Front Biosci* 3:d701-718.
- Pan Y, Subba Rao DV, Mann KH, Brown RG, Pocklington R. 1996. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. I. Batch culture studies. *Marine Ecology Progress Series* 131:225-233.
- Pavela-Vrancic M, Mestrovic V, Marasovic I, Gillman M, Furey A, James KK. 2001. The occurrence of 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid in the coastal waters of the central Adriatic (Kastela Bay). *Toxicon* 39:771-779.
- Paz B, Daranas AH, Norte M, Riobó P, Franco JM, Fernández JJ. 2008. Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Mar Drugs* 6:73-102.
- Peng YG, Taylor TB, Finch RE, Moeller PD, Ramsdell JS. 1995. Neuroexcitatory actions of ciguatoxin on brain regions associated with thermoregulation. *Neuroreport* 6:305-309.
- Peng YG, Taylor TB, Finch RE, Switzer RC, Ramsdell JS. 1994. Neuroexcitatory and neurotoxic actions of the amnesic shellfish poison, domoic acid. *Neuroreport* 5:981-985.

- Perl TM, Bédard, L., Kosatsky, T., Hockin, JC., Todd, EC., Remis, RS. 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *N Engl J Med.* 322(25):1775-1780.
- Perry MA. 2004. The effects of perinata excitatory aminoacids on neuroendocrine function in the rat. Thesis.
- Petrie BF, Pinsky C, Standish NM, Bose R, Glavin GB. 1992. Parenteral domoic acid impairs spatial learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 41:211-214.
- Pin JP, Acher F. 2002. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:297-317.
- Platt SR. 2007. The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. *Vet J* 173:278-286.
- Poli MA, Musser SM, Dickey RW, Eilers PP, Hall S. 2000. Neurotoxic shellfish poisoning and brevetoxin metabolites: a case study from Florida. *Toxicon* 38:981-993.
- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology* 66:1499-1503.
- Pshenichkin SP, Wise BC. 1995. Okadaic acid increases nerve growth factor secretion, mRNA stability, and gene transcription in primary cultures of cortical astrocytes. *J Biol Chem* 270:5994-5999.
- Pulido OM. 2008. Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Mar Drugs* 6:180-219.
- Qiu S, Curras-Collazo MC. 2006. Histopathological and molecular changes produced by hippocampal microinjection of domoic acid. *Neurotoxicol Teratol* 28:354-362.
- Quod JP, Turquet J. 1996. Ciguatera in Réunion Island (SW Indian Ocean): epidemiology and clinical patterns. *Toxicon* 34:779-785.
- Ramirez-Munguia N, Vera G, Tapia R. 2003. Epilepsy, neurodegeneration, and extracellular glutamate in the hippocampus of awake and anesthetized rats treated with okadaic acid. *Neurochem Res* 28:1517-1524.

- Ramos V, Vasconcelos V. 2010. Palytoxin and analogs: biological and ecological effects. *Mar Drugs* 8:2021-37.
- Ramsdell J S. 2007. Domoic acid, *The Molecular and Integrative Basis to Domoic Acid Toxicity*, In: Botana LM ed. *Phytotoxins, chemistry and Biochemistry*. pp 223-250. Blackwell Publishing, Ames, Iowa
- Ramsdell JS, Zabka TS. 2008. In utero domoic acid toxicity: a fetal basis to adult disease in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Mar Drugs* 6:262-290.
- Rajasekar N, Dwivedi S, Tota SK, Kamat PK, Hanif K, Nath C, Shukla R. 2013. Neuroprotective effect of curcumin on okadaic acid induced memory impairment in mice. *Eur J Pharmacol* 715:381-394.
- Reaven E, Tsai L, Maffe B, Azhar S. 1993. Effect of okadaic acid on hepatocyte structure and function. *Cell Mol Biol Res* 39:275-288.
- Reguera, B. 2002. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. En: *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*; Sar E.A.; Ferrario M.; Reguera B. (eds.). Instituto Español de Oceanografía, Madrid, España.
- Reguera B, Riobo P, Rodriguez F, Diaz PA, Pizarro G, Paz B, Franco JM, Blanco J. 2014. Dinophysis toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Mar drugs* 12:394-461.
- Riedel G, Platt B, Micheau J. 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140:1-47.
- Role LW, Berg DK. 1996. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16:1077-1085.
- Rubiolo JA, Botana LM, López H. 2012. Use of yessotoxin and its derivatives for the treatment of gliomas, In Patent (Compostela, U. o. S. d., Ed.), Spain.
- Rubiolo JA, Botana LM, López H. 2011a. Use of yessotoxin and its derivatives for the treatment and/or prevention of metabolic diseases, Patent, PCT/ES2010/070634.

- Rubiolo JA, López-Alonso H, Martínez P, Millán A, Cagide E, Vieytes MR, Vega FV, Botana LM. 2013. Yessotoxin Induces Er-Stress Followed By Autophagic Cell Death In Glioma Cells Mediated By mTOR and BNIP3. *Cell Signal* 26:419-432.
- Rubiolo JA, Lopez-Alonso H, Vega FV, Vieytes MR, Botana LM. 2011b. Okadaic acid and dinophysis toxin 2 have differential toxicological effects in hepatic cell lines inducing cell cycle arrest, at G0/G1 or G2/M with aberrant mitosis depending on the cell line. *Arch Toxicol* 85:1541-1550.
- Ryan CL, Robbins MA, Smith MT, Gallant IC, Adams-Marriott AL, Doucette TA. 2011. Altered social interaction in adult rats following neonatal treatment with domoic acid. *Physiol Behav* 102:291-295.
- Sasaki T, Hamada J, Shibata M, Gotoh J, Araki N, Fukuuchi Y. 2004. FK506 abrogates delayed neuronal death via suppression of nitric oxide production in rats. *Brain Res* 1009:34-39.
- Satake M, Ofuji K, Naoki H, James K, Furey A, McMahon T, Silke J, Yasumoto T. 1998. Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *J Amer Chem Soc.* 120:9967-9968.
- Satake M, Murata M, Yasumoto T. 1993. Gambierol: a new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc* 115:361-362.
- Sautière PE, Caillet-Boudin ML, Watez A, Buee-Scherrer V, Delacourte A. 1993. [Detection of Alzheimer type pathological epitopes on Tau proteins of neuroblastoma cells after treatment with okadaic acid]. *C R Acad Sci III* 316:533-535.
- Sawant PM, Holland PT, Mountfort DO, Kerr DS. 2008. In vivo seizure induction and pharmacological preconditioning by domoic acid and isodomoic acids A, B and C. *Neuropharmacology* 55:1412-1418.
- Scallet AC, Binienda Z, Caputo FA, Hall S, Paule MG, Rountree RL, Schmued L, Sobotka T, Slikker W, Jr. 1993. Domoic acid-treated cynomolgus monkeys (*M. fascicularis*): effects of dose on hippocampal neuronal and terminal degeneration. *Brain Res* 627:307-313.

- Scallet AC, Kowalke PK, Rountree RL, Thorn BT, Binienda ZK. 2004. Electroencephalographic, behavioral, and c-fos responses to acute domoic acid exposure. *Neurotoxicol Teratol* 26:331-342.
- Schmued LC, Scallet AC, Slikker W, Jr. 1995. Domoic acid-induced neuronal degeneration in the primate forebrain revealed by degeneration specific histochemistry. *Brain Res* 695:64-70.
- Scholin CA, Gulland F, Doucette GJ, Benson S, Busman M, Chavez FP, Cordaro J, DeLong R, De Vogelaere A, Harvey J, Haulena M, Lefebvre K, Lipscomb T, Loscutoff S, Lowenstine LJ, Marin R, 3rd, Miller PE, McLellan WA, Moeller PD, Powell CL, Rowles T, Silvagni P, Silver M, Spraker T, Trainer V, Van Dolah FM. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 403:80-84.
- Schultz IR, Skillman A, Sloan-Evans S, Woodruff D. 2013. Domoic acid toxicokinetics in Dungeness crabs: new insights into mechanisms that regulate bioaccumulation. *Aquat Toxicol* 140-141:77-88.
- Schwarz M, Jandova K, Struk I, Maresova D, Pokorny J, Riljak V. 2014. Low dose domoic acid influences spontaneous behavior in adult rats. *Physiol Res*.
- Shibata S, Ishida Y, Kitano H, Ohizumi Y, Habon J, Tsukitani Y, Kikuchi H. 1982. Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of Ca deficiency. *J Pharmacol Exp Ther* 223:135-143.
- Sierra Beltran A, Palafox-Urbe M, Grajales-Montiel J, Cruz-Villacorta A, Ochoa JL. 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35:447-453.
- Silva M, Pratheepa VK, Botana LM, Vasconcelos V. 2015. Emergent Toxins in North Atlantic Temperate Waters: A Challenge for Monitoring Programs and Legislation. *Toxins (Basel)*7:859-885.
- Silvagni PA, Lowenstine LJ, Spraker T, Lipscomb TP, Gulland FM. 2005. Pathology of domoic acid toxicity in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet Pathol* 42:184-191.

- Silver MW, Bargu S, Coale SL, Benitez-Nelson CR, Garcia AC, Roberts KJ, Sekula-Wood E, Bruland KW, Coale KH. 2010. Toxic diatoms and domoic acid in natural and iron enriched waters of the oceanic Pacific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20762-20767.
- Smayda T. 1997. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol Oceanogr* 42:1137-1153.
- Sobotka TJ, Brown R, Quander DY, Jackson R, Smith M, Long SA, Barton CN, Rountree RL, Hall S, Eilers P, Johannessen JN, Scallet AC. 1996. Domoic acid: neurobehavioral and neurohistological effects of low-dose exposure in adult rats. *Neurotoxicol Teratol* 18:659-670.
- Song XY, Hu JF, Chu SF, Zhang Z, Xu S, Yuan YH, Han N, Liu Y, Niu F, He X, Chen NH. 2013. Ginsenoside Rg1 attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3beta/tau signaling pathway and the A β formation prevention in rats. *Eur J Pharmacol* 710:29-38.
- Sosa S, Del Favero G, De Bortoli M, Vita F, Soranzo MR, Beltramo D, Ardizzone M, Tubaro A. 2009. Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. *Toxicol Lett* 191:253-259.
- Sosa S, Ardizzone M, Beltramo D, Vita F, Dell'Ovo V, Barreras A, Yasumoto T, Tubaro A. 2013. Repeated oral co-exposure to yessotoxin and okadaic acid: a short term toxicity study in mice. *Toxicol* 76:94-102.
- Strain SM, Tasker RA. 1991. Hippocampal damage produced by systemic injections of domoic acid in mice. *Neuroscience* 44:343-352.
- Suganuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, Ojika M, Wakamatsu K, Yamada K, Sugimura T. 1988. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1768-1771.
- Suganuma M, Suttajit M, Suguri H, Ojika M, Yamada K, Fujiki H. 1989. Specific binding of okadaic acid, a new tumor promoter in mouse skin. *FEBS letters* 250:615-618.

- Suganuma M, Tatematsu M, Yatsunami J, Yoshizawa S, Okabe S, Uemura D, Fujiki H. 1992. An alternative theory of tissue specificity by tumor promotion of okadaic acid in glandular stomach of SD rats. *Carcinogenesis* 13:1841-1845.
- Sutherland RJ, Hoelsing JM, Whishaw IQ. 1990. Domoic acid, an environmental toxin, produces hippocampal damage and severe memory impairment. *Neurosci Lett* 120:221-223.
- Suzuki CA, Hierlihy SL. 1993. Renal clearance of domoic acid in the rat. *Food Chem Toxicol* 31:701-706.
- Suzuki T, Mackenzie L, Stirling D, Adamson J. 2001. Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussel, *Perna canaliculus*. *Toxicon* 39:507-514.
- Swenson RS. 2006. Review of Clinical and Functional Neuroscience. Chapter 9. Online version.
- Szabó C. 1996. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull* 41:131-141.
- Tachibana K, Scheuer PJ, Tsukitani Y, Kikuchi H, Van Engen D, Clardy J, Gopichand Y, Schmitz FJ. 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc* 103:2469-2471.
- Takai A, Murata M, Torigoe K, Isobe M, Mieskes G, Yasumoto T. 1992. Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship. *The Biochemical journal* 284 (Pt 2):539-544.
- Takemoto T, Daigo K. 1958. Constituents of *Chondria armata*. *Chem. Pharm. Bull.* 6:578-580.
- Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J. 2009. Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. *J Toxicol Sci* 34 Suppl 2:SP279-286.
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ. 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401:63-69.

- Tapia R, Pena F, Arias C. 1999. Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *Neurochem Res* 24:1423-1430.
- Tasker RA, Connell BJ, Strain SM. 1991. Pharmacology of systemically administered domoic acid in mice. *Can J Physiol Pharmacol* 69:378-382.
- Tatnall FM, Smith HG, Welsby PD, Turnbull PC. 1980. Ciguatera poisoning. *Br Med J* 281:948-949.
- Teitelbaum JS, Zatorre RJ, Carpenter S, Gendron D, Evans AC, Gjedde A, Cashman NR. 1990. Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *N Engl J Med* 322:1781-1787.
- Terao K, Ito E, Yanagi T, Yasumoto T. 1986. 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 : official journal of the International Society on Toxinology* 24:1141-1151.
- Tian Q, Lin ZQ, Wang XC, Chen J, Wang Q, Gong CX, Wang JZ. 2004. Injection of okadaic acid into the meynert nucleus basalis of rat brain induces decreased acetylcholine level and spatial memory deficit. *Neuroscience* 126:277-284.
- Tiedeken JA, Muha N, Ramsdell JS. 2013. A cupric silver histochemical analysis of domoic acid damage to olfactory pathways following status epilepticus in a rat model for chronic recurrent spontaneous seizures and aggressive behavior. *Toxicol Pathol* 41:454-469.
- Tillmann U, Elbrächter M, Krock B, John U, Cembella A. 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology* 44:63-79.
- Tobío A, Fernández-Araujo A, Alfonso A, Botana LM. 2012. 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. *J Cell Biochem* 113:3752-3761.
- Todd EC. 1990. Chronology of the toxic mussels outbreak. *Can Dis Wkly Rep* 16 Suppl 1E:3-4.

- Todd EC. 1993. Domoic Acid and Amnesic Shellfish Poisoning - A Review. *Journal of Food Protection* 56:69-83
- Toyofuku H. 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Mar Pollut Bull* 52:1735-1745.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405-496.
- Tripp MA, Tepperman BL. 1996. Role of calcium in nitric oxide-mediated injury to rat gastric mucosal cells. *Gastroenterology* 111:65-72.
- Tripuraneni J, Koutsouris A, Pestic L, De Lanerolle P, Hecht G. 1997. The toxin of diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology* 112:100-108.
- Truelove J, Iverson F. 1994. Serum domoic acid clearance and clinical observations in the cynomolgus monkey and Sprague-Dawley rat following a single i.v. dose. *Bull Environ Contam Toxicol* 52:479-486.
- Truelove J, Mueller R, Pulido O, Martin L, Fernie S, Iverson F. 1997. 30-day oral toxicity study of domoic acid in cynomolgus monkeys: lack of overt toxicity at doses approaching the acute toxic dose. *Nat Toxins* 5:111-114.
- Tryphonas L, Iverson F. 1990. Neuropathology of excitatory neurotoxins: the domoic acid model. *Toxicol Pathol* 18:165-169.
- Tryphonas L, Truelove J, Iverson F. 1990a. Acute parenteral neurotoxicity of domoic acid in cynomolgus monkeys (*M. fascicularis*). *Toxicol Pathol* 18:297-303.
- Tryphonas L, Truelove J, Nera E, Iverson F. 1990b. Acute neurotoxicity of domoic acid in the rat. *Toxicol Pathol* 18:1-9.

- Tsunekawa K, Kondo F, Okada T, Feng GG, Huang L, Ishikawa N, Okada S. 2013. Enhanced expression of WD repeat-containing protein 35 (WDR35) stimulated by domoic acid in rat hippocampus: involvement of reactive oxygen species generation and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *BMC Neurosci* 14:4.
- Tubaro A, Dell'ovo V, Sosa S, Florio C. 2010. Yessotoxins: a toxicological overview. *Toxicon* 56:163-172.
- Tubaro A, Favero G, Pelin M, Bignami G, Poli M. 2014. Palytoxin and analogues: biological effects and detection. In: Botana LM Ed. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*, Third Edition. pp. 741-772. CRC Press, Boca Ratón
- Tubaro A, Sosa, S., Carbonatto, M., Altinier, G., Vita, F., Melato, M., Satake, M., Yasumoto, T. 2003. Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon* 41:783-792.
- Twiner MJ, Fire S, Schwacke L, Davidson L, Wang Z, Morton S, Roth S, Balmer B, Rowles TK, Wells RS. 2011. Concurrent exposure of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) to multiple algal toxins in Sarasota Bay, Florida, USA. *PLoS One* 6:e17394.
- Tzschentke TM. 2002. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications -- an introduction. *Amino acids* 23:147-152.
- Valdiglesias V, Fernandez-Tajes J, Mendez J, Pasaro E, Laffon B. 2013a. The marine toxin okadaic acid induces alterations in the expression level of cancer-related genes in human neuronal cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 92:303-311.
- Valdiglesias V, Prego-Faraldo MV, Pasaro E, Mendez J, Laffon B. 2013b. Okadaic acid: more than a diarrheic toxin. *Mar Drugs* 11:4328-4349.
- Vale C, Alfonso A, Sunol C, Vieytes MR, Botana LM. 2006. Modulation of calcium entry and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by palytoxin, *J Neurosci Res* 83:1393-1406.

- Vale C, Botana LM. 2008. Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins. The FEBS journal 275:6060-6066.
- Vale C, Gómez-Limia B, Vieytes MR, Botana LM. 2007b. Mitogen-activated protein kinases regulate palytoxin-induced calcium influx and cytotoxicity in cultured neurons. Br J Pharmacol 152:256-266.
- Vale C, Nicolaou KC, Frederick MO, Gómez-Limia B, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. 2007a. Effects of azaspiracid-1, a potent cytotoxic agent, on primary neuronal cultures. A structure-activity relationship study. J Med Chem 50:356-363.
- Vale C, Wandscheer C, Nicolaou KC, Frederick MO, Alfonso C, Vieytes MR, Botana LM. 2008. Cytotoxic effect of azaspiracid-2 and azaspiracid-2-methyl ester in cultured neurons: involvement of the c-Jun N-terminal kinase. J Neurosci Res 86:2952-2962.
- Vale P, de M Sampayo MA. 2002. Pectenotoxin-2 seco acid, 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and pectenotoxin-2 in shellfish and plankton from Portugal. Toxicon 40:979-987.
- Vale-Gonzalez C, Gomez-Limia B, Vieytes M.R, Botana LM. 2007. Effects of the marine phycotoxin palytoxin on neuronal pH in primary cultures of cerebellar granule cells, J Neurosci Res 85:90-98.
- Van Dolah FM. 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. Environ Health Perspect. 108 Suppl 1:133-141.
- Venugopal R, Jaiswal AK. 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene. Proc Natl Acad Sci U S A 93:14960-14965.
- Vilariño N, Ares IR, Cagide E, Louzao MC, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM. 2008. Induction of actin cytoskeleton rearrangement by methyl okadaate--comparison with okadaic acid. FEBS J 275:926-934.
- Villalobos C, Núñez L, Garcia-Sancho J. 1996. Functional glutamate receptors in a subpopulation of anterior pituitary cells. FASEB J 10:654-660.

- Vranyac-Tramoundanas A, Harrison JC, Clarkson AN, Kapoor M, Winburn IC, Kerr DS, Sammut IA. 2008. Domoic acid impairment of cardiac energetics. *Toxicol Sci* 105:395-407.
- Vranyac-Tramoundanas A, Harrison JC, Sawant PM, Kerr DS, Sammut IA. 2011. Ischemic cardiomyopathy following seizure induction by domoic Acid. *Am J Pathol* 179:141-154.
- Walsh GE, Bowers RL. 1971. A review of Hawaiian zoanthids with descriptions of three new species. *Zool J Linn Soc.* 50:161-80.
- Wandscheer CB, Vilariño N, Espiña B, Louzao MC, Botana LM. 2010. Human muscarinic acetylcholine receptors are a target of the marine toxin 13-desmethyl C spirolide. *Chem Res Toxicol* 23:1753-1761.
- Wang DZ. 2008. Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. *Mar drugs* 6:349-371.
- Wang GJ, Schmued LC, Andrews AM, Scallet AC, Slikker W, Jr., Binienda Z. 2000. Systemic administration of domoic acid-induced spinal cord lesions in neonatal rats. *J Spinal Cord Med* 23:31-39.
- Wang J, Tung YC, Wang Y, Li XT, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2001. Hyperphosphorylation and accumulation of neurofilament proteins in Alzheimer disease brain and in okadaic acid-treated SY5Y cells. *FEBS Lett* 507:81-87.
- Wekell JC, Gauglitz EJ Jr, Barnett HJ, Hatfield CL, Simons D, Ayres D. 1994. Occurrence of domoic acid in Washington state razor clams (*Siliqua patula*) during 1991-1993. *Nat Toxins* 2:197-205.
- Willard SS, Koochekpour S. 2013. Glutamate signaling in benign and malignant disorders: current status, future perspectives, and therapeutic implications. *Int J Biol Sci* 9:728-742.
- Wingerd, Joshua S, Vetter, Irina and Lewis, Richard J. 2012. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. In Botana LM and Loza M. eds. *Therapeutic targets: Modulation, Inhibition and Activation*, pp. 63-122. Hoboken NJ, United States: John Wiley and Sons.
- Wisden W, Seeburg PH. 1993. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci* 13: 3582-3598.

- Wozniak DF, Stewart GR, Miller JP, Olney JW. 1991. Age-related sensitivity to kainate neurotoxicity. *Exp Neurol* 114:250-253.
- Wright JL. 1995. Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. *Food Res Int* 28:347-358.
- Wright JL, Bird CJ, de Freitas AS, Hampson D, McDonald J, Quilliam MA. 1990a. Chemistry, biology, and toxicology of domoic acid and its isomers. *Can Dis Wkly Rep* 16 Suppl 1E:21-26.
- Wright JLC, Falk M, McInnes AG, Walter JA. 1990b. Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels. *Can. J. Chem* 68:22-25.
- Wu CH. 2009. Palytoxin: membrane mechanisms of action. *Toxicon* 54:1183-1189.
- Xi D, Peng YG, Ramsdell JS. 1997. Domoic acid is a potent neurotoxin to neonatal rats. *Nat Toxins* 5:74-79.
- Xu R, Tao Y, Wu C, Yi J, Yang Y, Yang R, Hong D. 2008. Domoic acid induced spinal cord lesions in adult mice: evidence for the possible molecular pathways of excitatory amino acids in spinal cord lesions. *Neurotoxicology* 29:700-707.
- Yasumoto T., Murata M., Lee JS., Torigoe K. 1989. Polyeter Toxins Produced by Dinoflagellates. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. eds. *Mycotoxins and Phycotoxins*, pp.375-382. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands.
- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto GK, Clardy J. 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41:1019-1025.
- Yasumoto T, Oshima Y, Sugawara W, Fukuyo Y, Oguri H, Igarashi T, Fujita N. 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the Causative Organism of Diarrhetic Shellfish Poisoning. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 46:1405-1411.
- Yasumoto T, Oshima, Y., Yamaguchi, M. 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 46:1249-1275.

- Yi KD, Covey DF, Simpkins JW. 2009. Mechanism of okadaic acid-induced neuronal death and the effect of estrogens. *J Neurochem* 108:732-740.
- Yoon SY, Choi JE, Kweon HS, Choe H, Kim SW, Hwang O, Lee H, Lee JY, Kim DH. 2008. Okadaic acid increases autophagosomes in rat neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 86:3230-3239.
- Zaman L, Arakawa O, Shimosu A, Onoue Y, Nishio S, Shida Y, Noguchi T. 1997. Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata*. *Toxicon* 35:205-212.
- Zamorano R, Marin M, Cabrera F, Figueroa D, Contreras C, Barriga A, Lagos N, Garcia C. 2013. Determination of the variability of both hydrophilic and lipophilic toxins in endemic wild bivalves and carnivorous gastropods from the southern part of Chile. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 30:1660-1677.
- Zhang B, Crankshaw W, Nesemeier R, Patel J, Nweze I, Lakshmanan J, Harbrecht BG. 2014. Calcium-mediated signaling and calmodulin-dependent kinase regulate hepatocyte-inducible nitric oxide synthase expression. *J Surg Res*
- Zhang Z, Simpkins JW. 2010. An okadaic acid-induced model of tauopathy and cognitive deficiency. *Brain research* 1359:233-246.

