



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DE LOS EFECTOS  
DE COMPUESTOS MARINOS EN CANALES  
IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE Y  
PLASTICIDAD SINÁPTICA NEURONAL**

**Fdo.**

**Víctor Martín Vázquez**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**LUGO**

**2014**

Prof. Dr. D. **Luis M. Botana López**, Catedrático de Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela, como Director de la tesis titulada: “Estudio electrofisiológico de los efectos de compuestos marinos en canales iónicos dependientes de voltaje y plasticidad sináptica neuronal”

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis doctoral presentada por Don **Víctor Martín Vázquez**, cumple las condiciones exigidas para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de *Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el doctorando participó en la investigación, redacción y publicación durante el periodo de tutela.

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

Lugo, a 16 de diciembre de 2014.

Luis M Botana López  
Doctor en Farmacia  
Codirector de tesis

Víctor Martín Vázquez

Dra. Dña. **María del Carmen Vale González**, como Directora de la tesis titulada: “Estudio electrofisiológico de los efectos de compuestos marinos en canales iónicos dependientes de voltaje y plasticidad sináptica neuronal”

Por la presente **DECLARO:**

Que la tesis doctoral presentada por Don **Víctor Martín Vázquez**, cumple las condiciones exigidas para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de *Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el doctorando participó en la investigación, redacción y publicación durante el periodo de tutela.

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

Lugo, a 16 de diciembre de 2014.

M<sup>a</sup> del Carmen Vale González  
Doctora en Farmacia  
Codirectora de tesis

Víctor Martín Vázquez



## **AGRADECIMIENTOS**

En general, gracias a todos aquellos que bien directa o indirectamente han hecho posible la realización de esta Tesis.

A todos los profesores de los Departamentos de Fisiología y Farmacología por haberme acogido y tratado como uno más desde el principio.

Muy en particular a Mercedes Vieytes, principal responsable de todo esto, por su cercanía y consejo, por haberme dado la llave de acceso a este mundo que antes desconocía.

A Luis Botana por su flexibilidad hacia mí, por haberme consentido hacer una Tesis acorde a mis inquietudes, por escucharme, guiarme y confiar en mí.

A Carmen Vale, por dejarme claro que la ciencia no es una novela. Por enseñarme a desconfiar, por darme autonomía, por hacerme ser trabajador, riguroso y crítico. Por demostrar tener un gran corazón.

A Katrina Kampbell y Chris Elliot por su trato impecable. A Marga, Caroline, Diana, Ling, Brett y Alexandros por hacer tan agradable mi estancia en Belfast.

A Juan y Henar por enseñarme a trabajar en un laboratorio y restar importancia a mis pifias de novato.

A mis compañeros de Tesis: Andrés, Diego, Eva, Marta, Paz, Paula, Ara, Sara, Andrea, Silvia, Álvaro, Merce, María Fraga y María Roel por su buen rollo fuera y dentro del Departamento.

A mis buenos amigos por todo lo vivido y reído (dale, fima, caballo, cabeza, etc.), que sigamos así. En especial a Jon, por haber tirado de mí en momentos difíciles, por haber llegado hasta aquí juntos, porque pase lo que pase siempre está ahí. A Tania por hacerme sonreír en las etapas más duras de la tesis, por apoyarme en todo momento y por pensar siempre en lo mejor para mí.

A mis padres y hermano, por apoyarme, aconsejarme y haberme dado siempre plena libertad en todo muestra de su confianza en mí. A Pablo, porque todos mis esfuerzos se quedan cortos si se enfrentan a los suyos, por haberme hecho más fuerte y más feliz.



**RESUMEN / SUMMARY**

**RESUMEN**

En el trabajo titulado *Estudio electrofisiológico de los efectos de compuestos marinos en canales iónicos dependientes de voltaje y plasticidad sináptica neuronal*, se describió el efecto de varios compuestos de la esponja marina *Crambe crambe* sobre canales iónicos dependientes de voltaje y se realizó un estudio comparativo del efecto de la ciguatoxina y la maitotoxina, toxinas involucradas en la patología de la ciguatera utilizando como modelo celular las neuronas corticales. Además, se describió el efecto de la ciguatoxina sobre la regulación de la plasticidad sináptica neuronal, aportando nueva información sobre el mecanismo celular implicado en la sintomatología neurológica de la ciguatera. Por otra parte, se demostraron los efectos *in vitro* de los análogos del gambierol en la atenuación de la activación de linfocitos T humanos, lo que convierte a estos compuestos marinos en moléculas de potencial interés para el tratamiento de enfermedades del sistema inmune.

**PALABRAS CLAVE**

Compuestos marinos, canales iónicos dependientes de voltaje, neuronas corticales, ciguatera, plasticidad sináptica, linfocitos T humanos.

**SUMMARY**

In the work entitled *Electrophysiological study of the effects of marine compounds in voltage gated ion channels and neuronal synaptic plasticity*, the effect of several effects produced by the marine sponge *Crambe crambe* on voltage gated ion channels and the comparative effects of ciguatoxin and maitotoxin, involved on the pathology of ciguatera, were described by using cortical neurons as the cellular model. In addition, the effect of ciguatoxin in the regulation of synaptic plasticity was described, leading to new insights into the neurological symptomatology of ciguatera. Apart from that, the *in vitro* effects of two analogs of gambierol leading to the attenuation of human T lymphocytes activation were reported, which mean that these marine compounds are molecules with potential immunotherapeutical interest.

**KEYWORDS**

Marine compounds, voltage gated ion channels, cortical neurons, ciguatera, synaptic plasticity, human T lymphocytes.



## **ABREVIATURAS**

## ***Abreviaturas***

AD: Ácido Domoico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AO: Ácido Ocadaico

ARN: Ácido Ribonucleico

ASP: Toxinas Amnésicas, del inglés *amnesic shellfish poisoning*

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolpropionato

AMPc: Adenosina 3'5'-monofosfato cíclico

A: Amperio

ATPasa: Enzima adenosín trifosfatasa

AZA: Azaspirácidos

4-AP: 4-Aminopiridina

Arc: proteína del citoesqueleto regulada por actividad, del inglés *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*

Ca<sub>v</sub>: Canales de calcio dependientes de voltaje

CaM: Calmodulina

Cm: Capacitancia de membrana

C: Culombio

CDI: Inactivación dependiente de calcio de los canales Ca<sub>v</sub>

CTX: Ciguatoxina

C-CTX: Ciguatoxina del Caribe

CrambA2: Crambescina A2

CrambC1: Crambescina C1

Cramb816: Crambescidina 816

DHP: Dihidropiridina

DTX: Dinofisistoxina

DL<sub>50</sub>: Dosis letal 50

DSP: Toxinas diarreicas, del inglés *diarrheic shellfish poisoning*

Da: Dalton

DIV: Días *in vitro*

dcSTX: Decarbamoilsaxitoxina

dcNeoSTX: Decarbamoilneosaxitoxina

Egr1: Elemento regulador de la proteína 1 de respuesta de crecimiento temprano, del inglés *early growth response 1*

Em: Potencial de membrana

ER: Retículo endoplásmico

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

F-Actina: Actina filamentosa

F: Faradai

g: Conductancia iónica

GTX: Gonyautoxinas

GluR: Subunidad del receptor AMPA

GYM-A: Gimnodimina A

GΩ: Gigaohmio

hERG: human ether-a-go-go-related-gene

HVA: canales de calcio de umbral de activación alto, del inglés *high voltage activated*

I: Corriente

I<sub>A</sub>: Corriente de potasio tipo A o de inactivación rápida

I<sub>D</sub>: Corriente de potasio de inactivación lenta

I<sub>K</sub>: Corriente de potasio

I-CTX: Ciguatoxina del Océano Índico

IFM: Bucle intracelular formado por los residuos isoleucina, fenilalanina y metionina

IL: Interleuquina

IP3: Inositol-1,4,5-trifosfato

KDa: Kilodalton

K<sub>Ca</sub>: Canales de potasio activados por calcio

K<sub>v</sub>: Canales de potasio dependientes de voltaje

K<sub>IR</sub>: Canales de potasio rectificadores de entrada (del inglés *inward-rectifying*)

K<sub>2P</sub>: Canales de potasio de dos poros

LSP: poliéter con forma de escalera, del inglés *ladder-shaped polyether*

LTD: Depresión a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

LVA: canales de calcio de umbral de activación bajo, del inglés *low voltage activated*

mEPSCs: Corrientes postsinápticas excitadoras miniatura

mIPSCs: Corrientes postsinápticas inhibitorias miniatura

MTX: Maitotoxina

NCrambA2: Norcrambescina A2

NMDA: N-metil-D-aspartato

NR: Subunidad del receptor NMDA

NSP: Toxinas neurotóxicas, del inglés *neurotoxin shellfish poisoning*

Na<sub>v</sub>: Canales de sodio dependientes de voltaje

PbTx: Brevetoxina

PKC: Proteína quinasa C

PTX: Pectenotoxina

PLTX: Palitoxina

PP: Fosfatasas de proteína

PSP: Toxinas paralizantes, del inglés *paralytic shellfish poisoning*

P-CTX: Ciguatoxina del Pacífico

R: Resistencia

R<sub>m</sub>: Resistencia de membrana

R<sub>p</sub>: Resistencia de la pipeta

R<sub>f</sub>: Resistencia de fuga

S: Siemens

SNC: Sistema nervioso central

STX: Saxitoxina

S1-S6: Segmentos de las subunidades del canal de sodio

TTX: Tetrodotoxina

TEA: tetraetilamonio

TRAM34: 1-[(2-Clorofenil)difenilmetil]pirazol

V: Voltio

Vm: Potencial de membrana

YTX: Yesotoxina





---

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Ficotoxinas marinas .....	3
Ciguatoxinas.....	6
Gambierol.....	12
Maitotoxina .....	14
Toxinas paralizantes: saxitoxinas.....	16
Tetrodotoxina .....	18
Toxinas diarreicas: ácido ocadaico y dinofisiotoxinas.....	19
Brevetoxinas.....	21
Toxinas amnésicas: ácido dommoico.....	23
Pectenotoxinas.....	24
Yesotoxina.....	25
Azaspirácidos .....	27
Palitoxinas .....	30
Iminas cíclicas .....	31
1.2 Metabolitos de la esponja <i>Crambe crambe</i> : crambescinas y crambescidinas..	33
1.3 Canales iónicos dependientes de voltaje como dianas farmacológicas de compuestos marinos .....	36
1.3.1 Canales de sodio dependientes de voltaje .....	36
1.3.2 Canales de potasio dependientes de voltaje.....	44
1.3.3 Canales de calcio dependientes de voltaje.....	55
1.4 Técnicas electrofisiológicas .....	63
1.5 Neurotransmisión y plasticidad sináptica.....	71
2. OBJETIVO .....	87
3. PUBLICACIONES .....	89
1.1. Differential effects of crambescins and crambescidin 816 in voltage gated sodium, potassium and calcium channels in neurons.....	93

II.1. Differential effects of ciguatoxin and maitotoxin in primary cultures of cortical neurons .....	95
II.2. Synthetic ciguatoxin CTX 3C induces a rapid imbalance of neuronal excitability.....	97
III.1. Potassium currents inhibition by gambierol analogs prevents human T lymphocyte activation .....	157
4. DISCUSIÓN .....	159
5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS .....	170
6. BIBLIOGRAFÍA .....	173



**ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

Tabla 1. Clasificación de las ficotoxinas marinas.....	5
Tabla 2. Propiedades farmacológicas, distribución tisular, funciones fisiológicas y fisiopatología asociadas a los canales de sodio dependientes de voltaje .....	37
Tabla 3. Propiedades electrofisiológicas, farmacológicas, función y enfermedades asociadas a los canales de potasio dependientes de voltaje expresados en el sistema nervioso central. 46	
Tabla 4. Funciones fisiológicas, activadores y bloqueantes de los canales de potasio de linfocitos T humanos.....	54
Tabla 5. Propiedades farmacológicas, electrofisiológicas, funciones fisiológicas y enfermedades asociadas a los canales de calcio.....	57
Tabla 6. Distribución intracelular y extracelular de los principales iones en células animales .....	64
Tabla 7. Parámetros eléctricos de la membrana celular.....	65
Figura 1. Dinoflagelado productor de ciguatoxina, <i>G. toxicus</i> .....	6
Figura 2. Estructura de las ciguatoxinas P-CTX 1B y CTX 3C.....	8
Figura 3. Estructura 2D y química del gambierol.....	12
Figura 4. Estructura 2D y química de la maitotoxina.....	15
Figura 5. Dinoflagelados productores de toxinas PSP y estructura química de la saxitoxina 17	
Figura 6. Dinoflagelado productor de tetrodotoxina y estructura química de la tetrodotoxina .....	19
Figura 7. Dinoflagelados productores de las toxinas diarreicas y estructura química del ácido ocadaico y de las dinofisistoxinas 1 y 2 .....	20
Figura 8. Dinoflagelado productor de las brevetoxinas y estructura química de las brevetoxinas A y B.....	22
Figura 9. Diatomea del género <i>Pseudonitzschia</i> productora de AD y estructura química del ácido domoico.....	23
Figura 10. Dinoflagelados del género <i>Dinophysis</i> productores de pectenotoxinas y estructura química de la pectenotoxina 1.....	25
Figura 11. Principales dinoflagelados productores de yesotoxina y estructura química de la yesotoxina .....	27

---

Figura 12. Dinoflagelado <i>Azadinium spinosum</i> productor de AZAs y estructura química de los AZAs .....	29
Figura 13. Principales organismos productores de palitoxina y estructura química de la palitoxina.....	31
Figura 14. Dinoflagelados productores de iminas cíclicas y estructura química de 13 desmetil espirólido C y de la gimnodimina .....	32
Figura 15. Esponja <i>Crambe crambe</i> y estructura química de los alcaloides guanidina Norcrambescina A2, Crambescina A2, Crambescina C1 y Crambescidina 816.....	34
Figura 16. Representación esquemática de la estructura de la subunidad $\alpha$ de los canales de sodio dependientes de voltaje e identificación de las áreas de unión de neurotoxinas .....	39
Figura 17. Representación esquemática del funcionamiento del canal de sodio dependiente de voltaje y su influencia en la generación de potenciales de acción.....	41
Figura 18. Dependencia de voltaje de las corrientes de sodio .....	43
Figura 19. Representación esquemática de la estructura de las subunidades $\alpha$ de los distintos subtipos de canales de potasio y estructura del poro de los canales $K_v$ .....	48
Figura 20. Representación esquemática de un canal de potasio dependiente de voltaje indicando los tres estados principales del canal.....	49
Figura 21. Corrientes de potasio dependientes de voltaje.....	50
Figura 22. Canales de potasio $K_v1.3$ y $KCa3.1$ y señalización de calcio durante la activación de células T .....	52
Figura 23. Estructura de los canales de calcio dependientes de voltaje.....	59
Figura 24. Esquema de las distintas corrientes de calcio activadas por voltaje alto .....	60
Figura 25. Propiedades electrofisiológicas de la CDI en canales de calcio dependientes de voltaje.....	62
Figura 26. Esquema de un circuito electrofisiológico.....	66
Figura 27. Ruptura de la membrana en el modo célula entera y evolución de la resistencia de la membrana.....	67
Figura 28. Configuraciones de patch clamp.....	69
Figura 29. Experimento de patch clamp en el modo de célula entera.....	70
Figura 30. Estructura del receptor NMDA, moléculas que lo regulan y flujo de iones. ....	74
Figura 31. Estructura del receptor AMPA, moléculas que lo regulan y flujo de iones.....	75

Figura 32. Estructura del receptor GABA<sub>A</sub>, moléculas que lo regulan y flujo de iones..... 76

Figura 33. Regulación homeostática del equilibrio entre excitación e inhibición en redes neuronales ..... 79

Figura 34. Cambios en la acumulación de receptores AMPA ..... 80

Figura 35. Los cambios en la actividad neuronal modulan la fuerza sináptica en neuronas corticales ..... 82

Figura 36. Contribución de los receptores AMPA y NMDA a la actividad sináptica ..... 82

Figura 37. Corriente fásica y tónica inducidas por la activación del receptor GABA<sub>A</sub> ..... 84

Figura 38. Imagen de microscopía confocal de neuronas corticales ..... 86





## **1. INTRODUCCIÓN**

## Generalidades

El océano ocupa más del 70% de la superficie de la tierra y acoge a cerca de un millón de organismos multicelulares (plantas y animales) y un billón de organismos unicelulares (Burgess, 2012). Muchos de estos organismos han desarrollado y perfeccionado técnicas de defensa mediante la producción de compuestos químicos para su supervivencia en un ambiente altamente competitivo. La diversidad genética y biológica que proporciona el ambiente marino, ha permanecido desconocida durante años, por lo tanto, la investigación farmacológica y química de estos organismos ha sido escasa hasta hace pocas décadas. Los avances recientes en el conocimiento de la química de productos naturales, la creación de bancos genómicos y el desarrollo de bioensayos, han propiciado la identificación de nuevas biomoléculas marinas. En los últimos años, la elevada actividad biológica de los metabolitos de origen marino ha despertado el interés de la sociedad científica y de la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos fármacos. En torno al 50 % de los fármacos aprobados por la agencia de alimentos y medicamentos estadounidense FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) en las últimas décadas, son productos de origen natural o están diseñados en base a las estructuras de productos naturales (Newman *et al.*, 2007). Entre dichos fármacos, los productos de origen marino presentan mayor relevancia a nivel biofuncional que los productos terrestres. La efectividad que presentan los compuestos marinos a bajas dosis, su mayor selectividad y su relativa poca vulnerabilidad al desarrollo de resistencias, comparado con los compuestos de origen terrestre, hace de las metabolitos marinos, una de las herramientas farmacológicas de mayor interés de los últimos tiempos (Gerwick *et al.*, 2012).

En la actualidad, más del 70 % de los metabolitos marinos se obtienen de esponjas marinas, corales y microorganismos, mientras que la contribución de otros organismos como moluscos, ascidios y algas supone un 30% (Blunt *et al.*, 2007). Muchos de los compuestos producidos por estos organismos son toxinas productoras de intoxicaciones alimentarias con un elevado impacto sobre la sociedad, no solo a nivel económico sino también sobre la seguridad alimentaria y la salud humana. En la siguiente sección se describen las principales características de las ficotoxinas marinas productoras de dichas intoxicaciones así como los principales efectos que producen sobre la salud humana.

## 1.1 Ficotoxinas marinas

Las ficotoxinas marinas son metabolitos secundarios con actividad tóxica, producidos por algunas especies de dinoflagelados (microalgas fitoplanctónicas) presentes en aguas saladas. También se han descrito cianobacterias productoras de saxitoxina (Hackett *et al.*, 2013) y diatomeas productoras de ácido domoico (Lopez-Rivera *et al.*, 2009). Todavía no está claro por qué algunas microalgas producen estas toxinas, si bien este efecto se asocia, en general, a una medida de defensa. Cuando estas algas unicelulares aparecen en el mar en grandes cantidades se puede producir una variación en el color del agua (rojo, amarillo, marrón) dependiendo del tipo de microalga presente y de su concentración. Estos episodios se han denominado mareas rojas debido a que los organismos que aparecen con más frecuencia tiñen el agua de este color. Las condiciones para que se produzcan las mareas rojas no son del todo conocidas, aunque probablemente están influenciadas por las condiciones climáticas e hidrográficas. En este sentido, las mareas rojas suelen aparecer asociadas a cambios en las condiciones del agua como temperatura, transparencia, turbulencia o salinidad. También puede influir la concentración de nutrientes disueltos, el viento o la iluminación de la superficie del agua.

La transferencia y acumulación de las toxinas marinas tiene lugar a través de las redes tróficas. Los principales vectores de transmisión son los moluscos bivalvos (mejillones, vieiras, almejas, berberechos, ostras, etc.), así como algunas especies de peces de zonas tropicales e intertropicales (Shumway, 1995). También, algunos tipos de gasterópodos y crustáceos pueden actuar como vectores (Gerssen *et al.*, 2010). Resulta interesante el hecho de que algunas de estas especies que acumulan toxinas no sufren sus efectos tóxicos, sin embargo, cuando son consumidas por el hombre o por animales dan lugar a importantes intoxicaciones.

En Europa, las floraciones algales y el incremento de los niveles de ficotoxinas marinas producen pérdidas económicas de unos 1000 M€ anuales, de los cuales 720 M€ están relacionados con el ocio y el turismo y 166 M€ están asociados a la industria pesquera (Gerssen *et al.*, 2010). El cambio climático ha influido en gran medida en el aumento de la producción de ficotoxinas marinas en los últimos años (Miraglia *et al.*, 2009). Además, el crecimiento exponencial de la producción

mundial de moluscos bivalvos en las últimas décadas, desde apenas 1 millón de toneladas en 1950 a 14.6 millones de toneladas en 2010 (FAO Fisheries and Aquaculture–Global Statistics Collection, 2012), se asocia a un aumento de episodios tóxicos originados por la presencia de biotoxinas lo que supone un mayor riesgo de intoxicaciones para los consumidores. El impacto de las toxinas marinas sobre la salud de los consumidores se observa regularmente en función de las intoxicaciones agudas que producen, sin embargo, el impacto de la exposición crónica a bajos niveles de ficotoxinas marinas está poco descrito y se contempla como un problema de salud emergente.

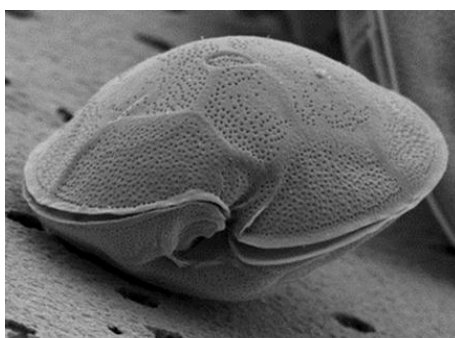
Históricamente, las ficotoxinas marinas se han clasificado en función de los síndromes tóxicos que producían, en función de sus propiedades químicas (toxinas hidrofílicas y toxinas lipofílicas) o en función de su distribución taxonómica y filogenética. Sin embargo, desde el año 2004, expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), recomiendan la clasificación de las toxinas marinas en función de su estructura química ([ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/biotoxin\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/biotoxin_report_en.pdf)). A continuación se realiza una descripción de las principales características de las toxinas marinas que se resumen en la Tabla 1 (Botana *et al.*, 2009).

Grupo	Compuesto de referencia	Mecanismo de acción	Análogos	Organismo productor
<b>Ciguatoxinas</b>	Ciguatoxina-1 (CTX1)	Activa canal sodio dependiente de voltaje (sitio 5)	Ciguatoxinas, Gambiertoxinas, Gambierol	<i>Gambierdiscus toxicus</i>
<b>Maitotoxinas</b>	Maitotoxina (MTX)	Desconocida Activa entrada de calcio	Hasta 2 <sup>99</sup> isómeros posibles	<i>Gambierdiscus toxicus</i>
<b>Toxinas paralizantes (PSP)</b>	Saxitoxina (STX)	Bloquean sitio 1 del canal de sodio dependiente de voltaje	Carbamatos (GTX 1-4, NeoSTX); N-Sulfocarbamoil (C1-4, GTX5-6); Decarbamoil (dcGTX1-4, dcSTX, dcNeo); Benzoatos	<i>Alexandrium Gymnodinium Pyrodinium Cianobacterias</i>
<b>Grupo de la tetrodotoxina</b>	Tetrodotoxina (TTX)	Bloqueo del canal de sodio dependiente de voltaje.	Varios análogos de: EpiTTX, DeoxiTTX, norTTX, OxoTTX y anhidroTTX.	<i>Alexandrium tamarense</i>
<b>Toxinas diarreicas (DSP)</b>	Ácido ocaidaico (AO)	Inhibición de fostasas de proteínas 1 y 2A	Dinofisistoxinas (DTX)1-6	<i>Dynophysis Prorocentrum</i>
<b>Brevetoxinas o toxinas neurotóxicas (NSP)</b>	Brevetoxina B (PbTx2) Brevetoxina A (PbTx1)	Activa canal sodio dependiente de voltaje (sitio 5)	PbTx 3-14 Brevenal	<i>Karenia Chatonella</i>
<b>Ácido domoico o toxinas amnésicas (ASP)</b>	Ácido domoico (AD)	Activa receptores de glutamato (cainato y AMPA)	Ác. Isodomoico A-H; Ác. epidomoico.	<i>Pseudonitzschia</i>
<b>Pectenotoxinas</b>	Pectenotoxina 2 (PTX2)	Citoesqueleto de actina	Pectenotoxinas 1-14; Pectenotoxinas seco ácidos	<i>Dinophysis acuta D. fortii</i>
<b>Yesotoxinas</b>	Yesotoxina (YTX)	Activación de fosfodiesterasas Posiblemente otras dianas	Varios análogos de: HidroxiYTX; CarboxyYTX; HomoYTX; KetoYTX; NoroxoYTX	<i>Protoceratium Lyngulodinium Gonyaulux</i>
<b>Azaspirácidos</b>	Azaspirácido 1 (AZ1)	Desconocido	Azaspirácidos 1-11	<i>Azadinium spinosum</i>
<b>Palitoxinas</b>	Palitoxina (PLTX)	Bloquea ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Hasta 10 <sup>21</sup> isómeros posibles, Ostreocinas, Ovatotoxinas (Ovatoxinas)	<i>Ostreopsis</i>
<b>Iminas cíclicas</b>	Gimnodimina A (GYM-A) Espirólidos	Bloqueo de receptores colinérgicos (muscarínicos/nicotínicos)	Gimnodimina A,B; Espirólido A-G (y desmetilespirólidos); Pinnatoxina A-D; Pteriatoxina A-C; Pinnamina; Prorocentrólido A-B; Spiroprorocentrimina C; Simbioiminas.	<i>Gymnodinium sp./Karenia/ Alexandrium ostenfeldii/ Prorocentrum</i>

Tabla 1. Clasificación de las ficotoxinas marinas. Adaptado de Botana 2009 (Botana *et al.*, 2009).

### Ciguatoxinas

Las ciguatoxinas (CTX) son neurotoxinas liposolubles producidas por ciertas especies de dinoflagelados del género *Gambierdiscus*, principalmente *G. toxicus*, cuya imagen se muestra en la Figura 1. Como la mayoría de ficotoxinas naturales, las ciguatoxinas, pueden sufrir una serie de transformaciones en los organismos generando compuestos de diferente potencia (Lewis, 1992b; Lewis *et al.*, 1993; Satake *et al.*, 1993a). En este sentido, inicialmente, el dinoflagelado *Gambierdiscus* produce toxinas menos polares y menos potentes, denominadas gambiertoxinas (Holmes, 1991), que son biotransformadas en el hígado de peces mediante metabolismo oxidativo y espiroisomerización, generando compuestos cada vez más polares y tóxicos llamados ciguatoxinas y maitotoxinas (Nicholson *et al.*, 2006; Yasumoto *et al.*, 1993). Los peces herbívoros, que acumulan ciguatoxinas al ingerir el dinoflagelado precursor son presa de peces carnívoros superiores, a los que les transmiten la toxina que se acumula principalmente en los músculos. Las ciguatoxinas son resistentes al calor por lo que conservan su toxicidad tras cocinar el alimento (Lewis, 2006). Cuando el hombre ingiere el pescado contaminado con ciguatoxinas se produce el síndrome denominado ciguatera, una enfermedad considerada endémica en zonas tropicales y subtropicales, cuya incidencia mundial está en aumento (Gingold *et al.*, 2014; Llewellyn, 2010) y ya han aparecido casos de intoxicación por ciguatera en Europa incluyendo las costas españolas (Nunez *et al.*, 2012). Se estima que las intoxicaciones por ciguatoxina suponen unos 50.000-200.000 casos anuales (Dickey *et al.*, 2010).



*Gambierdiscus toxicus*

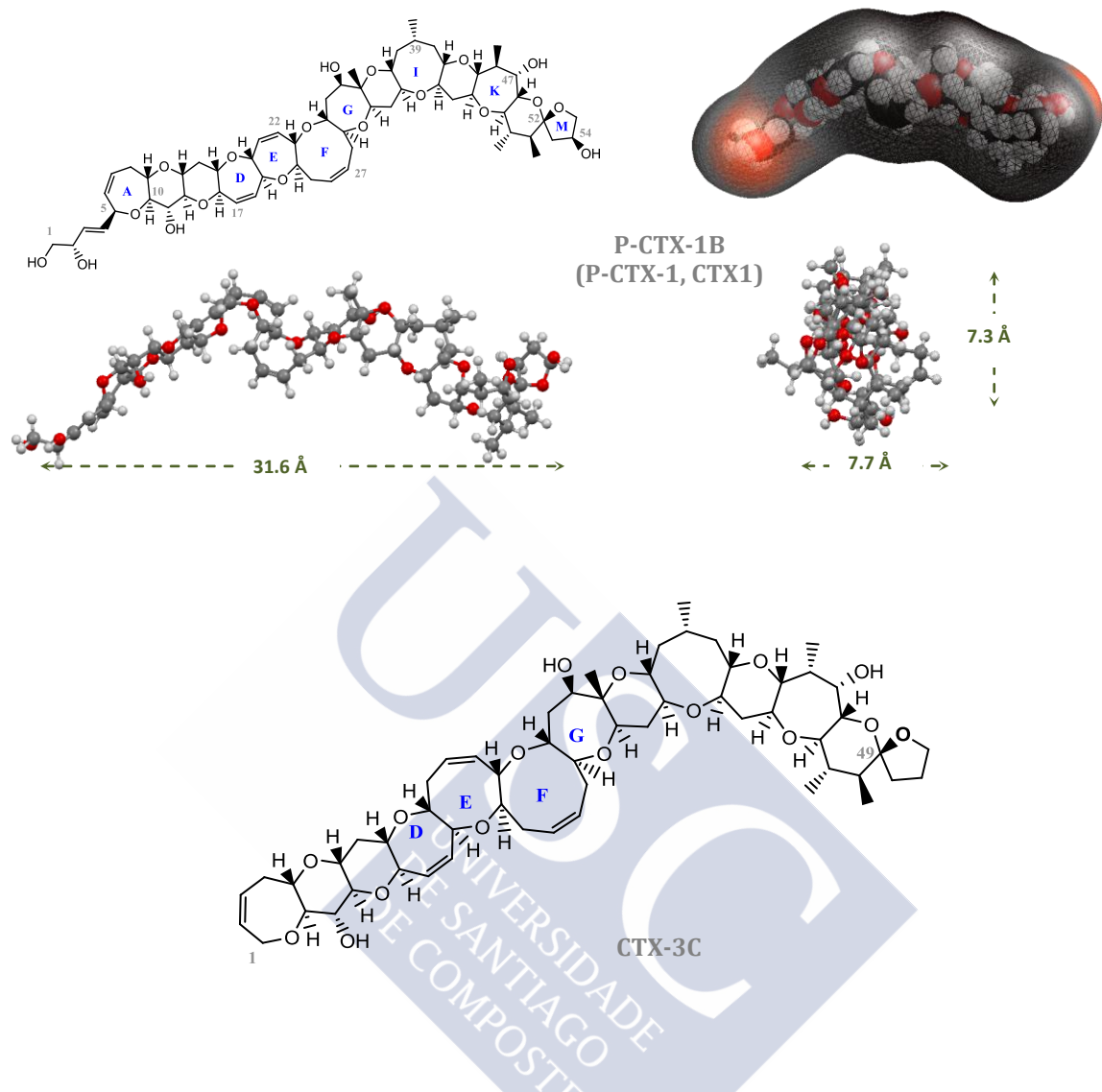
**Figura 1.** Dinoflagelado productor de ciguatoxina, *G. toxicus*.

### *Estructura química de las ciguatoxinas*

Las ciguatoxinas son poliéteres cíclicos liposolubles formados por 13 ó 14 anillos unidos por enlaces éter, muy oxigenados, con pesos moleculares que oscilan entre 1000 y 1150 Da (Hamilton *et al.*, 2002a; Hamilton *et al.*, 2002b; Lewis, 1992a; Pottier *et al.*, 2003; Vale *et al.*, 2014). La característica más notable, común a todas las CTX, es su esqueleto largo de unos 3 nm de longitud, que forma una estructura rígida de tipo escalera denominada LSP (del inglés ladder-shaped polyether).

Se han aislado diferentes ciguatoxinas de detritus biológicos que contienen *G. toxicus*, de cepas tóxicas de dinoflagelado aisladas de diferentes partes del mundo y de diferentes peces (Vetter *et al.*, 2014). En función de su origen se denominan ciguatoxinas del Océano Pacífico (P-CTX), ciguatoxinas del Océano Índico (I-CTX) y ciguatoxinas del Mar Caribe (C-CTX) (Caillaud *et al.*, 2010). Todos los análogos de CTX presentan estructuras parecidas. La primera ciguatoxina aislada fue la ciguatoxina del Pacífico, P-CTX-1B, identificada en 1967 (Scheuer *et al.*, 1967). La P-CTX-1B es la ciguatoxina más tóxica aislada de peces carnívoros en el Pacífico y se considera la principal causante de la intoxicación por ciguatera (Lewis *et al.*, 1993). Posteriormente se detectaron ciguatoxinas en el Mar Caribe, entre ellas, la C-CTX-1 (Lewis *et al.*, 1998) y en el año 2002 se identificaron por primera vez las ciguatoxinas Índicas (I-CTX) siendo la más importante de este último grupo la I-CTX-1 (Hamilton *et al.*, 2002a).

En la Figura 2, se muestra la estructura química de la P-CTX-1B y de la ciguatoxina sintética empleada en la presente tesis doctoral, la CTX 3C, cuya síntesis total fue obtenida en el año 2001 (Hirama *et al.*, 2001).



**Figura 2. Estructura de las ciguatoxinas P-CTX 1B y CTX 3C.** La P-CTX-1B es la estructura mas identificable de toda la familia de las ciguatoxinas. En el modelo 2D de la P-CTX-1B se describe la superficie señalando la lipofilicidad. Esta superficie fue creada utilizando un gradiente de color en el que los colores rojo y negro determinan las regiones más lipofílicas y menos lipofílicas, respectivamente. El tamaño de la estructura se muestra en el modelo de barras y esferas. En el panel inferior se muestra la estructura química de la ciguatoxina sintética CTX 3C. Adaptada de Vale et al. 2014 (Vale *et al.*, 2014).

### *Mecanismo de acción de las ciguatoxinas*

Las ciguatoxinas se unen al sitio 5 de los canales de sodio dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v$ ) activando estos canales a potenciales más negativos lo que se traduce en una entrada de iones sodio al interior celular que a su vez genera despolarización de la membrana y potenciales de acción espontáneos (Bidard *et al.*, 1984). Aunque hasta el momento existen pocos estudios comparando el efecto de las diferentes

ciguatoxinas sobre canales de potasio dependientes de voltaje, algunos miembros del grupo inhiben estos canales, un efecto que contribuye a aumentar la despolarización celular (Hidalgo *et al.*, 2002; Schlumberger *et al.*, 2010). La ciguatoxina CTX 3C, empleada en la presente tesis doctoral, bloquea los canales de potasio en neuronas cerebelares (Perez *et al.*, 2011) mientras que en otras preparaciones, como las células gustativas, no produce dicho efecto (Ghiaroni *et al.*, 2006). También se ha descrito que la P-CTX-1 produce un incremento de la concentración de calcio intracelular en células de neuroblastoma diferenciado, sin embargo, cuando los canales de sodio están bloqueados no se produce dicha entrada de calcio (Molgo *et al.*, 1993). En sinaptosomas colinérgicos, la misma toxina produce un incremento de calcio intracelular a través del intercambiador sodio-calcio y, como consecuencia, produce la liberación de neurotransmisor (Molgo *et al.*, 1990). Las ciguatoxinas también ejercen efectos importantes en la transmisión sináptica. En la unión neuromuscular, la P-CTX-1 y la C-CTX-1 incrementan la frecuencia de los potenciales espontáneos por aumento de la liberación espontánea de acetilcolina (Meunier *et al.*, 2009). Además, el aumento de la concentración de sodio intracelular en las terminales nerviosas motoras, producido por ciguatoxina, induce la movilización de calcio de las reservas intracelulares (Molgo *et al.*, 1993), lo que activa la liberación de neurotransmisor alterando el proceso de reciclaje de vesículas sinápticas esencial para el mantenimiento de la funcionalidad neuronal (Vetter *et al.*, 2014).

#### *Intoxicación alimentaria por ciguatera*

La sintomatología de la ciguatera en humanos comprende principalmente alteraciones gastrointestinales y neurológicas y en menor medida, alteraciones cardiovasculares (Lewis, 2001). En general, las primeras manifestaciones clínicas son de carácter gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal) y comienzan entre 0.5–12 h tras la ingestión de pescado contaminado con ciguatoxinas. Durante esta fase aguda pueden aparecer también alteraciones cardiovasculares como bradicardia e hipotensión. Habitualmente, los problemas gastrointestinales ocasionados por la ciguatera remiten en 1 o 2 días y las alteraciones cardiovasculares en 2 o 3 días (Hokama, 1988). Sin embargo, la recuperación de las alteraciones neurológicas es más larga y de difícil predicción, pudiendo persistir entre 1 semana y

6 meses e incluso, en algunas ocasiones, se mantienen durante años (Butera *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 1992; Poon-King *et al.*, 2004). Una edad avanzada y el sobrepeso son factores predisponentes para la persistencia de los síntomas neurológicos de la ciguatera (Dickey *et al.*, 2010).

El primer documento donde se describen los efectos neurológicos producidos por ciguatoxina data del año 1776, cuando el cirujano de la embarcación del capitán James Cook, William Anderson, describe las alteraciones sufridas por los tripulantes de la embarcación tras la ingesta de pescado en el sur del océano del Pacífico (Anderson, 1776). En sus anotaciones, Anderson describió las características neurológicas de la intoxicación tanto en los marineros como en los perros que habían sido alimentados con las sobras del pescado. Entre las alteraciones neurológicas, las parestesias (entumecimiento y hormigueo de la zona perioral y extremidades) y la alteración de la sensación térmica son considerados síntomas patognomónicos de la intoxicación por ciguatera (Dickey, 2008). Algunas de las alteraciones neurológicas tales como la disestesia de temperatura paradójica (lo frío parece estar caliente y viceversa), el prurito intenso y el aumento de la nocicepción como resultado de la neuropatía periférica, pueden durar largos periodos de tiempo y el paciente puede sufrir dichas alteraciones durante meses o incluso años tras la ingestión del pescado contaminado con ciguatoxina (Pearn, 2001). Otros síntomas característicos de la ciguatera son el sabor metálico, artralgias, mialgias (principalmente en las piernas) y dolor dental (en ocasiones sensación de que los dientes se mueven). También pueden estar presentes temblores y dolor de cabeza. Mientras que las alteraciones en las fibras nerviosas periféricas parecen ser las responsables de la mayoría de los síntomas neurológicos, algunos autores sostienen que la parálisis, la ataxia, el estupor y la confusión que aparecen en la mayoría de las intoxicaciones severas por ciguatoxina son indicativos de alteraciones en el sistema nervioso central (Dickey *et al.*, 2010).

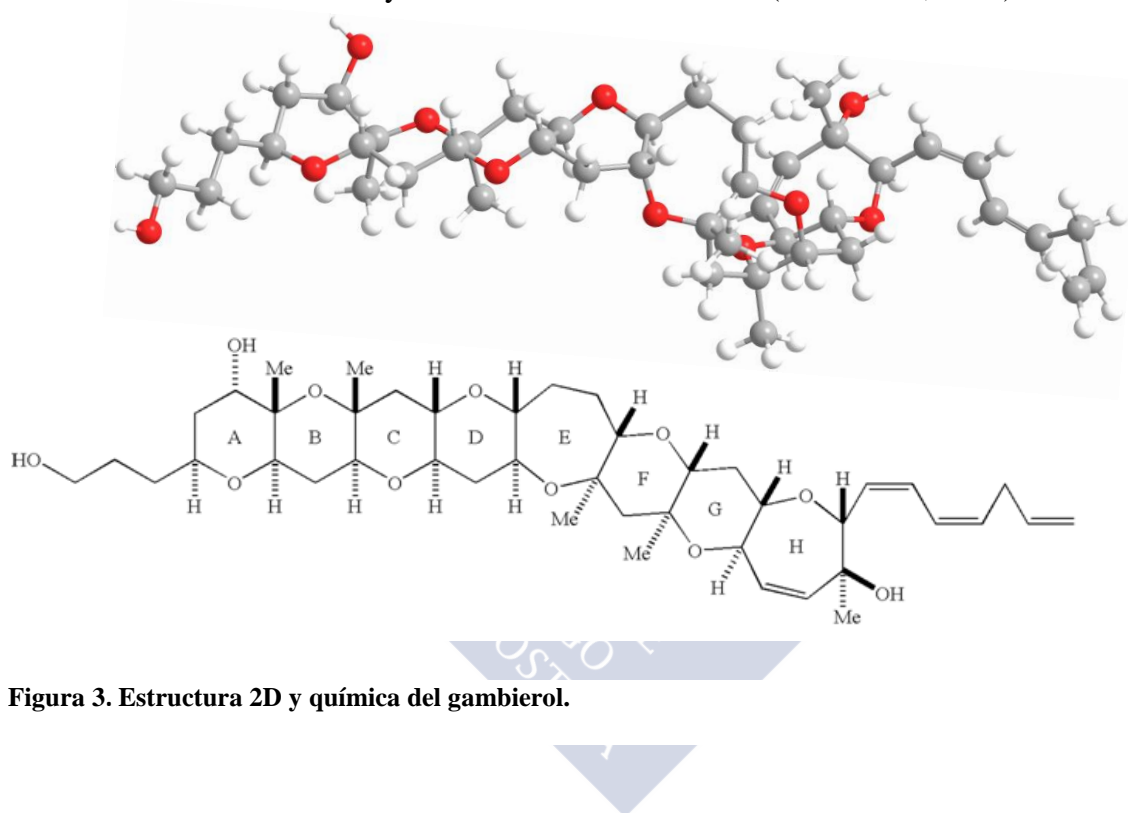
Se han descrito diferencias en la sintomatología de la intoxicación por ciguatera en las distintas regiones donde esta enfermedad presenta mayor prevalencia. Así, en el Caribe, la sintomatología gastrointestinal es característica en la fase aguda, seguida de alteraciones neurológicas periféricas, mientras que en las regiones del Pacífico e Índico los síntomas neurológicos se producen en la fase aguda

(Achaibar *et al.*, 2007; Pottier *et al.*, 2001; Wang, 2008). En las intoxicaciones humanas con ciguatoxinas del Pacífico se han descrito casos con una rápida progresión hasta el fallo respiratorio, el coma y ocasionalmente la muerte del individuo (DeFusco *et al.*, 1993; Dickey *et al.*, 2010; Habermehl *et al.*, 1994; Lange, 1987). Aunque inicialmente la sintomatología neurológica de la ciguatera se ha considerado una consecuencia directa de la interacción de la CTX con los canales de sodio dependientes de voltaje (Holmes *et al.*, 2001), el mecanismo exacto por el que se producen las secuelas neurológicas a largo plazo está aún por identificar. En este sentido, el síntoma patognomónico de ciguatera, la alodinia al frío, no es inducida por otros activadores de los canales de sodio como la veratridina y la batracotoxina (Zimmermann *et al.*, 2013). Además, la limitada eficacia de los inhibidores de canales de sodio para revertir la alodinia al frío *in vivo* sugiere que este síntoma de ciguatera podría ser la consecuencia de un mecanismo distinto a la activación de los canales de sodio (Zimmermann *et al.*, 2013). Recientemente, la alodinia al frío ha sido atribuido a la entrada de calcio dependiente del receptor de potencial transitorio A1 (TRPA1, del inglés *transient receptor potential cation channel, member A1*) activada tras la apertura de canales de sodio por P-CTX-1 (Vetter *et al.*, 2012).

Pese a los avances en la comprensión de la fisiopatología de esta enfermedad, por el momento, el único tratamiento eficaz para pacientes que sufren una intoxicación aguda por ciguatera es el D-manitol hiperosmótico por vía intravenosa (Friedman *et al.*, 2008). Se cree que este tratamiento es beneficioso ya que inhibe tanto el aumento de tamaño celular de las células nerviosas como la activación de los canales  $\text{Na}_v$  por ciguatoxina (Mattei *et al.*, 1999). Recientemente, se ha indicado que la colestiramina, resina secuestradora de ácidos biliares favorece la eliminación de la toxina y disminuye la duración de la sintomatología en los pacientes intoxicados por ciguatoxina (Shoemaker *et al.*, 2010).

### Gambierol

El gambierol se aisló por primera vez en 1993 a partir de cultivos del dinoflagelado causante de ciguatera, *Gambierdiscus toxicus* (Satake *et al.*, 1993b). Las características estructurales de este producto natural (Figura 3) incluyen un esqueleto poliéter octacíclico en forma de escalera y una cadena lateral que contiene un grupo trieno parcialmente conjugado (Morohashi *et al.*, 1999). Los elementos estructurales que le confieren al gambierol su carácter tóxico son el doble enlace entre los carbonos C28=C29 y su cadena lateral insaturada (Fuwa *et al.*, 2004).



**Figura 3. Estructura 2D y química del gambierol.**

Pese a que los estudios biológicos, incluyendo el estudio del mecanismo de acción del gambierol han sido lentos, en parte debido a la escasez de toxina procedente de fuentes naturales (Sasaki *et al.*, 2007), la síntesis química del compuesto ha permitido avanzar en el estudio de su actividad biológica (Fuwa *et al.*, 2002a; Fuwa *et al.*, 2002b; Johnson *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006). Los primeros estudios sobre el mecanismo de acción del gambierol demostraron que este compuesto inhibía la unión de la brevetoxina, PbTx3, al sitio 5 de los canales  $\text{Na}_v$ , lo que llevó a sugerir que este sitio de unión era común para ambas toxinas (Inoue *et al.*, 2003). Posteriormente se describió que el gambierol actuaba como agonista

parcial de canales de sodio dependientes de voltaje en células de neuroblastoma humano y aumentaba la concentración de calcio citosólico (Louzao *et al.*, 2006). Si bien, posteriormente se demostró que el principal efecto del gambierol es el bloqueo de los canales de potasio dependientes de voltaje (Ghiaroni *et al.*, 2005) estabilizando el canal en su estado cerrado (Kopljár *et al.*, 2009).

En la presente tesis doctoral se emplearon los análogos heptacíclico y tetracíclico del gambierol. Estos compuestos contienen los elementos estructurales del gambierol que le confieren un carácter tóxico que son los anillos B-H (análogo heptacíclico) y los anillos E-H (análogo tetracíclico) del compuesto parental, el doble enlace C28=C29 y la cadena lateral insaturada (Fuwa *et al.*, 2004). Sin embargo, estos análogos sintéticos carecen de los grupos hidroxilo en los carbonos C1 y C6 del gambierol, los cuales no son esenciales para la toxicidad del compuesto (Fuwa *et al.*, 2004). Se ha descrito que los análogos heptacíclico y tetracíclico del gambierol inhiben las corrientes de potasio dependientes de voltaje a concentraciones nanomolares y también producen oscilaciones sincrónicas de la concentración de calcio citosólico en neuronas cerebelares con una potencia similar a la del gambierol (Alonso *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2012). Además, en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer, estos compuestos bloquean las corrientes de potasio dependientes de voltaje y disminuyen los niveles de dos proteínas implicadas en dicha enfermedad, el péptido  $\beta$ -amiloide y la proteína tau hiperfosforilada (Alonso *et al.*, 2012).

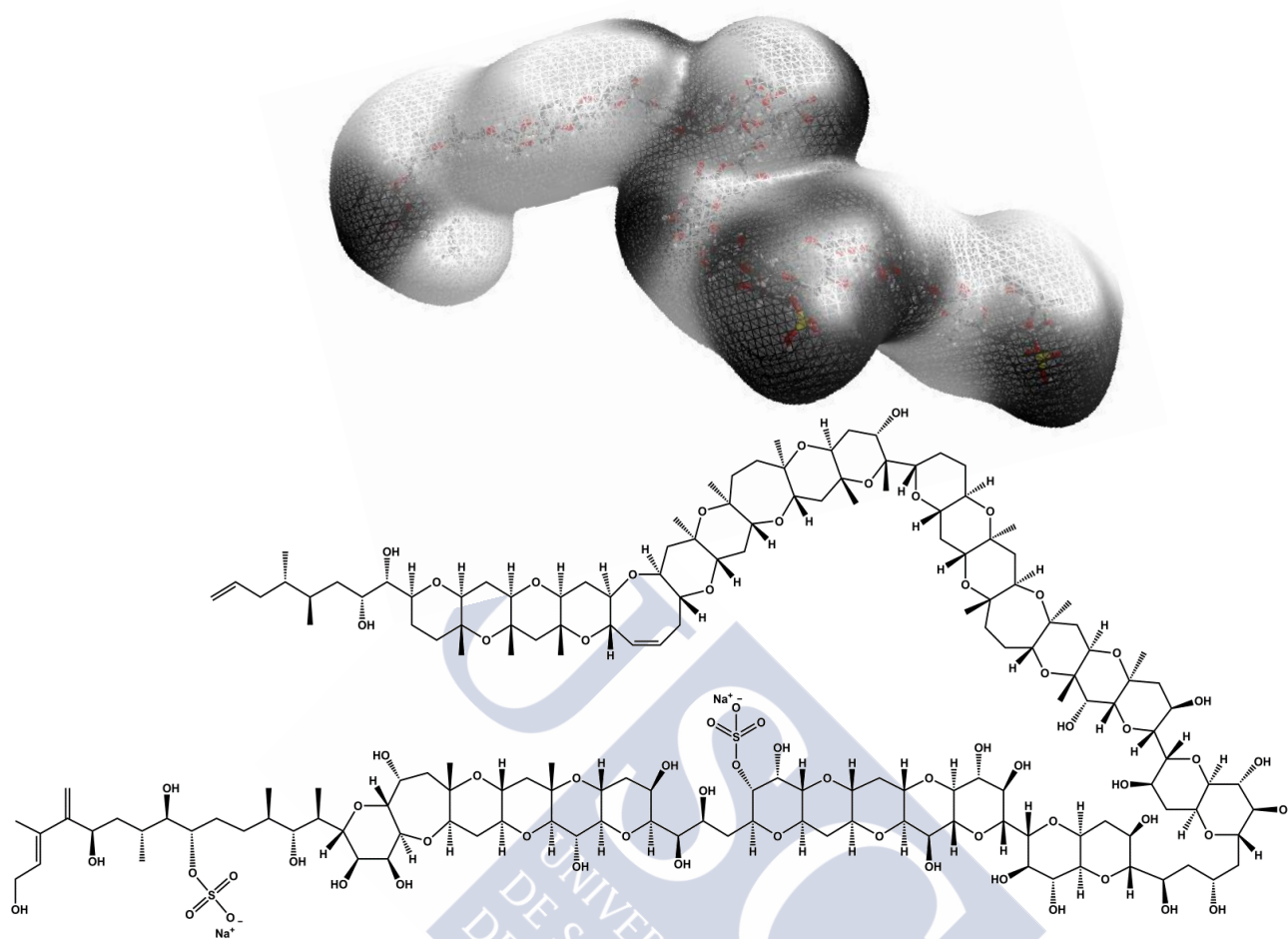
Los síntomas producidos por el gambierol son muy parecidos a los producidos por las ciguatoxinas, incluyendo en un primer momento problemas gastrointestinales (nauseas, vómitos y diarrea) y más tarde alteraciones neurológicas y cardiovasculares, lo que ha llevado a sugerir que este compuesto está también implicado en la intoxicación alimentaria por ciguatera (Lewis, 2001).

### **Maitotoxina**

Al igual que la ciguatoxina y el gambierol, la maitotoxina, también está producida por el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* (Holmes *et al.*, 1994). El descubrimiento de la maitotoxina (MTX) está asociado a la caracterización de la intoxicación alimentaria por ciguatera. Así, la MTX fue vez extraída por primera del pez *Ctenochaetus striatus*, denominado en tahitiano “maito”, de ahí el nombre de la toxina (Satake, 2007).

La MTX tiene un peso molecular de 3422 Da (3 veces mayor que el de las ciguatoxinas), lo que la convierte en uno de los productos no poliméricos más grandes de la naturaleza (Murata *et al.*, 2000; Nicolaou *et al.*, 2007). Además, la MTX presenta una elevada bioactividad lo que la convierte en una de las toxinas no proteináceas más potentes que se conocen, con una letalidad tras la administración por vía intraperitoneal de 50 ng/kg en ratón (Yasumoto, 2001).

Estructuralmente, la MTX es un poliéter de estructura plana y muy polar debido a la presencia de grupos sulfato e hidroxilo. Se han aislado tres análogos diferentes de diversas cepas de *G. toxicus* denominados MTX-1 o MTX, MTX-2, cuya estructura no se ha determinado por completo, y MTX-3, que posee dos ésteres sulfato (Murata *et al.*, 2000). Como se observa en la Figura 4, el esqueleto de la MTX es anfifílico y se puede dividir en dos regiones: una hidrofóbica, que carece de suficientes unidades estructurales polares, y otra hidrofílica que presenta unidades sulfato e hidroxilo. Mientras que la región más lipofílica de la MTX esta formada por nueve anillos y presenta una conformación rígida, la región hidrofílica de la molécula presenta una orientación flexible y está compuesta por grupos polihidroxilados (Murata *et al.*, 2000). A diferencia de las ciguatoxinas, que son liposolubles, las maitotoxinas son solubles en agua (Lewis, 2006).



**Figura 4. Estructura 2D y química de la maitotoxina.** Figura adaptada de Martín et al. 2014 (Martín *et al.*, 2014).

En cuanto a su mecanismo de acción, la MTX produce un incremento de los niveles de calcio citosólico en diferentes modelos celulares pero no produce liberación de calcio de los reservorios intracelulares (de la Rosa *et al.*, 2001; Morales-Tlalpan *et al.*, 2002). La inducción de la entrada de calcio es rápida y sostenida. Además, la toxina produce la entrada de sodio y como consecuencia una fuerte despolarización (Trevino *et al.*, 2008). Un trabajo reciente demostró que un poliéter artificial heptacíclico con forma de escalera es capaz de inhibir la entrada de calcio mediada por MTX en células de glioma (Oishi *et al.*, 2012), lo cual sugiere un lugar de unión específico para la MTX en estas células. Sin embargo, existe cierta controversia respecto al mecanismo mediante el cual la MTX induce la entrada de calcio al interior celular. Algunos autores sostienen que este efecto está relacionado

con la activación de canales catiónicos permeables a calcio no selectivos y no activados por voltaje (Trevino *et al.*, 2008) mientras que otros, afirman que la entrada de calcio producida por MTX en células híbridas neuroblastoma-glioma es bloqueada por bloqueantes selectivos de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Gusovsky *et al.*, 1990), lo cuál no sucede en otras preparaciones (Sladeczek *et al.*, 1988; Ueda *et al.*, 1986). También se ha descrito que el intercambiador sodio-hidrógeno desempeña un papel importante en la entrada de calcio y la neurotoxicidad inducida por MTX (Wang *et al.*, 2009). En modelos *in vivo*, una administración de MTX intraperitoneal en ratón produce disminución de la temperatura corporal, piloerección, disnea, parálisis progresiva, convulsiones y muerte (Yasumoto, 2001).

### **Toxinas paralizantes: saxitoxinas**

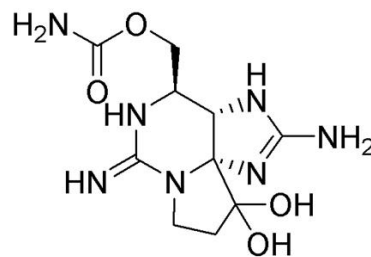
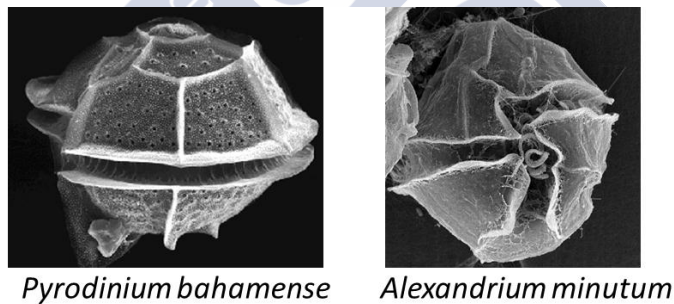
El grupo de las saxitoxinas es el principal causante del síndrome PSP (del inglés *paralytic shellfish poisoning*), una de las intoxicaciones alimentarias más peligrosas y extendidas a nivel mundial. Las toxinas PSP se encuentran en gran parte del continente americano y europeo, Sudáfrica, India, Marruecos y la costa este de Asia (Vale, 2014b). Son producidas por diferentes géneros de dinoflagelados, entre los que destacan los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium*, mostrados en la Figura 5 (Shumway, 1990; Shumway *et al.*, 1994) y cianobacterias (Deeds *et al.*, 2008). La intoxicación por toxinas PSP se produce por el consumo de bivalvos portadores aunque, en ocasiones, también puede darse por el consumo de gasterópodos, crustáceos y en menor medida por el consumo de determinados peces (Oshima *et al.*, 1984; Shumway *et al.*, 1994). Debido a su elevada estabilidad, su potencia y a la ausencia de antídoto, las toxinas PSP, representan un grave problema para la salud humana (Wiese *et al.*, 2010).

Desde un punto de vista estructural, las toxinas PSP son guanidinas heterocíclicas que poseen un único anillo tricíclico 3,4,6-trialquil tetrahidropurina (Figura 5). En función de los grupos químicos (hidroxilo y sulfato) presentes en el radical en posición 4, las toxinas PSP se clasifican en toxinas carbamato (las más tóxicas), decarbamoil (con una potencia intermedia), sulfocarbamoil y deoxidecarbamoil que presentan una toxicidad similar y menor que las anteriores

(Oshima, 1995; Sullivan, 1993). Estas toxinas son solubles en agua y no se inactivan por calor, sin embargo, su estabilidad varía notablemente en función del tipo de toxina y del pH, siendo más estables en un medio ácido (Shimizu, 2000).

Todos los análogos de PSP comparten el mismo mecanismo de acción que consiste en la unión específica y reversible al sitio 1 de los canales de sodio dependientes de voltaje lo cual produce el bloqueo del flujo de iones sodio al interior celular impidiendo así la propagación de los potenciales de acción en células excitables (Cestele *et al.*, 2000).

En casos leves o moderados de intoxicación por PSPs se produce una sensación de hormigueo y entumecimiento facial, prurito en los dedos de las extremidades, cefaleas, náuseas y vómitos. Posteriormente, los pacientes pueden presentar dificultad para respirar y pulso acelerado. En los casos más severos se puede producir parálisis muscular, parada respiratoria, shock cardiovascular e incluso muerte. Los síntomas se manifiestan entre 30 minutos y 24 horas tras la ingesta del alimento contaminado (Etheridge, 2010; Hurley *et al.*, 2014).



Saxitoxina

**Figura 5. Dinoflagelados productores de toxinas PSP y estructura química de la saxitoxina.**

## Tetrodotoxina

La tetrodotoxina (TTX) es una potente neurotoxina que se encuentra principalmente en las vísceras de muchas especies de peces tetraodóntidos y dióntidos, como el pez globo. Tradicionalmente la TTX ha sido asociada exclusivamente con el pez globo aunque también se ha detectado en una amplia variedad de especies de artrópodos, equinodermos, moluscos, gusanos (platelmintos y nemertinos), tritones y ranas (Noguchi *et al.*, 2008). Además, la TTX se ha aislado en dinoflagelados de la especie *Alexandrium tamarense* (Kodama *et al.*, 1996) y en algunas cianobacterias de agua dulce (Codd, 1984). Posteriormente se descubrió que ciertas especies de bacterias marinas aisladas de organismos que contenían TTX (peces globo, estrellas de mar, cangrejos y algas) producían esta toxina como mecanismo de defensa (Campbell *et al.*, 2009; Noguchi *et al.*, 1986). La mayoría de los casos de intoxicación alimentaria por TTX se observan en el suroeste asiático, principalmente en Japón (Asakawa *et al.*, 2003) donde el consumo de pez globo es elevado. También se han descrito intoxicaciones alimentarias por TTX en Tailandia, Bangladesh, Malasia, Hong Kong, Singapur, Australia, Madagascar, México y Estados Unidos (Hwang *et al.*, 2007). En los últimos años se ha descrito la llegada de TTX a las costas de Europa como resultado de migraciones de especies vectoras, posiblemente condicionadas por el cambio climático (Katikou *et al.*, 2009). En 2010 se describió el primer caso de intoxicación por tetrodotoxina en Europa, concretamente en Portugal (Fernandez-Ortega *et al.*, 2010).

Al igual que las STXs, las TTXs actúan bloqueando los canales de sodio responsables de la excitabilidad muscular y nerviosa (Bane *et al.*, 2014). Los síntomas de la intoxicación por TTX incluyen entumecimiento de la lengua y los labios, parestesia de la cara y de las extremidades, seguido de mareos, cefalea, dolor de estómago, náuseas, diarrea y vómitos. En casos severos puede ocurrir parálisis respiratoria y fallo cardíaco (How *et al.*, 2003). Por el momento no existe un tratamiento específico ni antídoto para la intoxicación por TTX (Bane *et al.*, 2014).

Como se muestra en la Figura 6, la TTX presenta una estructura heterocíclica rígida que contiene diversos hidroxilos y un grupo guanidinio. Hasta la fecha se han descrito 30 análogos estructurales (Bane *et al.*, 2014).

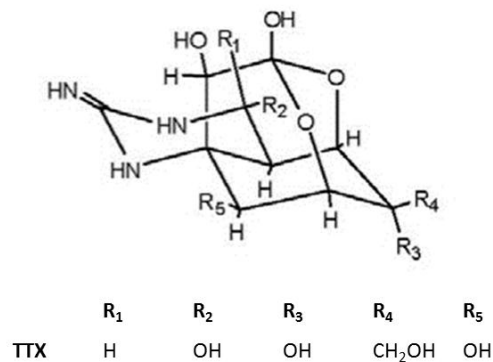
*A. tamarense*

Figura 6. Dinoflagelado productor de tetrodotoxina y estructura química de la tetrodotoxina.

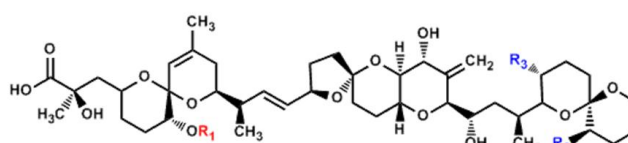
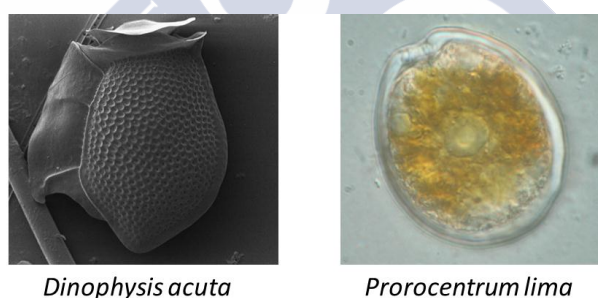
### Toxinas diarreicas: ácido ocadaico y dinofisiotoxinas

El ácido ocadaico (AO) y sus análogos, las dinofisiotoxinas (DTXs), son toxinas marinas lipofílicas producidas principalmente por los dinoflagelados *Dinophysis* y *Prorocentrum*, que se muestran en la Figura 7 (Hallegraeff, 1995; Viviani, 1992). Aunque presentan una distribución mundial, estas toxinas se encuentran principalmente en Europa, Japón y Sudamérica (Reguera *et al.*, 2012). La proliferación de estas toxinas es estacional, apareciendo en las costas europeas en los meses de verano y otoño cuando las condiciones de pH, temperatura y salinidad del agua son las adecuadas (Mountfort *et al.*, 2001).

Estas toxinas son las responsables de la intoxicación diarreica por marisco (DSP, del inglés *diarrheic shellfish poisoning*). Las toxinas DSP se acumulan principalmente en moluscos bivalvos filtradores, especialmente mejillones y ostras,

aunque también pueden encontrarse en almejas, vieiras, navajas y cangrejos. Las toxinas DSP se describieron por primera vez en Japón en 1976 tras aparecer casos de intoxicaciones por consumo de mejillones y vieiras en el Norte de Japón (Yasumoto *et al.*, 1978). El cocinado, congelado y salazón de los alimentos no impiden la intoxicación por toxinas DPS y además estas toxinas no alteran las propiedades organolépticas de los alimentos contaminados, lo que hace muy difícil su detección por parte del consumidor (McCarron *et al.*, 2008).

La estructura química del AO y de las DTXs se describió por primera vez en 1982 (Murata *et al.*, 1982), aunque el AO se había identificado previamente en la esponja marina *Halichonrira okadaei*, a partir de la cual se nombró el compuesto (McNabb, 2008). El grupo de las DSP comprende toxinas poliéteres liposolubles formados por 38 carbonos con un grupo carboxilo en el C1 y un grupo hidroxilo en el C7 y se diferencian entre sí en la posición de grupos metilo tal como se muestra en la Figura 7. Dado que son moléculas lipofílicas, tienden a acumularse principalmente en las partes grasas del organismo.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
AO	H	H	CH <sub>3</sub>
DTX1	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
DTX2	H	CH <sub>3</sub>	H

**Figura 7. Dinoflagelados productores de las toxinas diarreas y estructura química del ácido ocadaico y de las dinofisistoxinas 1 y 2.**

El mecanismo de acción de las toxinas DSP es la inhibición de las fosfatasa de proteína. En un primer momento se describió que el AO inhibía las fosfatasa de proteína tipo 1 (PP1) y tipo 2A (PP2A) (Bialojan *et al.*, 1988) y más tarde se descubrió que el AO también inhibe otros tipos de fosfatasa de proteína incluyendo los tipos 4, 5 y 2B (Louzao *et al.*, 2005). Tanto el AO como la DTX-1 y la DTX-2 inhiben en mayor o menor medida la PP1 y la PP2A presentando una mayor afinidad por la PP2A (Dounay *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 1992).

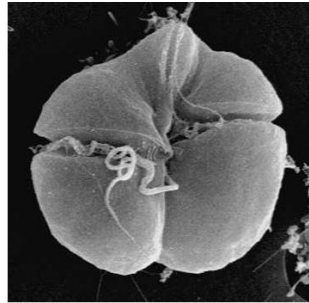
La intoxicación por DSP provoca trastornos gastrointestinales como diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal que aparecen entre los 30 minutos y las 4 horas tras la ingesta de moluscos y se manifiestan durante un máximo de 3 días (James *et al.*, 2002a). Aunque no existe evidencia en la literatura de los efectos del AO en humanos, los estudios *in vitro* e *in vivo* indican que una exposición crónica a toxinas DSP está asociada a la formación de tumores en el aparato digestivo, genotoxicidad, neurotoxicidad y afectación del desarrollo embrionario (Valdiglesias *et al.*, 2013).

### **Brevetoxinas**

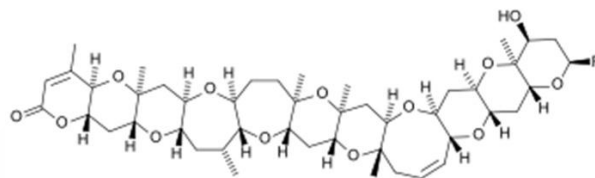
Las brevetoxinas (PbTXs) causan la intoxicación neurotóxica por consumo de molusco conocida como NSP (del inglés *neurotoxic shellfish poisoning*). Son producidas por el dinoflagelado marino *Karenia brevis* (Furey *et al.*, 2004), cuya imagen se muestra en la Figura 8 y por otras especies de algas incluyendo *Chatonella* (Bourdelaís *et al.*, 2002). Inicialmente las brevetoxinas se encontraron en el Golfo de Méjico, sin embargo, desde principios de los 90 se han encontrado diferentes PbTXs en regiones tan diversas como Florida, Nueva Zelanda, Asia, Sudáfrica, Norte América y Europa (Furey *et al.*, 2004).

En la Figura 8 también se muestra la estructura de las PbTXs, que consta de un esqueleto formado por diez u once anillos éter distribuidos en forma de escalera con una lactona en uno de sus extremos. En función de los sistemas de anillos de la zona central del esqueleto, estas toxinas liposolubles se clasifican en dos tipos, A y B. Las PbTXs de tipo A poseen un esqueleto flexible de 10 anillos poliéter e incluyen los análogos 1, 7 y 10, mientras que las PbTXs de tipo B están compuestas por un esqueleto rígido de 11 anillos poliéter fusionados e incluyen los análogos 2, 3,

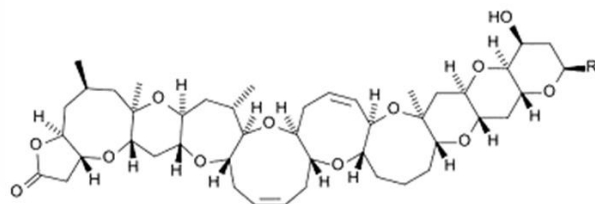
5, 6, 8 y 9. Las PbTXs de tipo B son las brevetoxinas más abundantes en la naturaleza, sin embargo, las de tipo A presentan mayor potencia (Baden *et al.*, 2005).



*Karenia brevis*



Brevetoxina tipo A



Brevetoxina tipo B

**Figura 8. Dinoflagelado productor de las brevetoxinas y estructura química de las brevetoxinas A y B.**

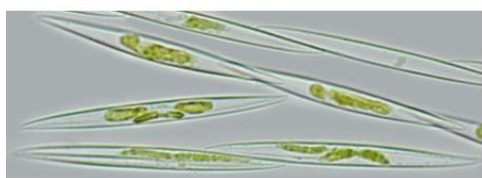
Las PbTXs, al igual que las ciguatoxinas, se unen al sitio 5 de canales de sodio dependientes de voltaje, donde inhiben su inactivación favoreciendo el flujo de iones  $\text{Na}^+$  hacia el interior celular (Lombet *et al.*, 1987). Como consecuencia, los canales  $\text{Na}_v$  permanecen abiertos a potenciales de reposo induciendo potenciales de acción continuos en células neuronales. La brevetoxina induce un aumento de la liberación de neurotransmisor en la unión neuromuscular (Meunier *et al.*, 2009). La sintomatología desencadenada por las PbTXs se inicia entre 1-3 horas después de la ingestión de la toxina e incluye náuseas, sensación de hormigueo, pérdida del control motor y dolor muscular severo. La recuperación tiene lugar a los 2 o 3 días y no existe un tratamiento específico (Baden *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 1991). Además de la intoxicación por ingestión, la inhalación de aerosoles marinos con presencia de

PbTXs puede causar problemas respiratorios como asma (Cheng *et al.*, 2005; Kirkpatrick *et al.*, 2011). Pese a que no se han descrito casos de muerte por NSP en humanos, la brevetoxina se asocia con episodios de mortalidad masiva de peces, aves y mamíferos marinos (Kirkpatrick *et al.*, 2004).

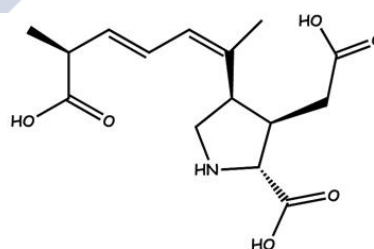
### Toxinas amnésicas: ácido dommoico

Las toxinas del grupo del ácido domoico (AD) causan la intoxicación de tipo amnésico (ASP, del inglés *Amnesic Shellfish Poisoning*). El primer episodio de esta intoxicación se describió en 1987 en Canadá, cuando 107 personas se intoxicaron debido al consumo de mejillones de la especie *Mytilus edulis*, y presentaron alteraciones gastrointestinales y desórdenes en el sistema nervioso central. La toxina responsable de este episodio tóxico fue el AD (Quilliam *et al.*, 1989), que está producido por microalgas diatomeas del género *Pseudonitzschia* cuya imagen se muestra en la Figura 9 (Wright *et al.*, 1995). Además de Canadá, el AD se ha detectado en Estados Unidos y Europa (Vale, 2014a).

El AD cuya estructura química se muestra en la Figura 9, es un aminoácido tricarbóxico cristalino, de naturaleza polar, soluble en agua e insoluble en disolventes orgánicos. Se han identificado varios análogos, presentes en las diatomeas y en algunos moluscos, denominados ácidos isodomoicos A, B, C, D, E, F y el diastereoisómero C5' (Vale, 2014a).



*Pseudonitzschia*



Ácido domoico

Figura 9. Diatomea del género *Pseudonitzschia* productora de AD y estructura química del ácido domoico.

El mecanismo de acción del AD consiste en la activación de los receptores de glutamato en el sistema nervioso central. El AD presenta una gran afinidad por el receptor AMPA  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato y por los receptores de cainato (Ramsdell, 2007). La interacción del AD con estos receptores provoca despolarización de la célula seguida de muerte celular (Jeffery *et al.*, 2004). Los síntomas de la intoxicación por AD incluyen trastornos gastrointestinales (náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea) seguidos de alteraciones del sistema nervioso central (cefalea, desorientación, amnesia, temblores y coma). Estos síntomas aparecen después de 3-5 horas de la ingestión del alimento (Jeffery *et al.*, 2004).

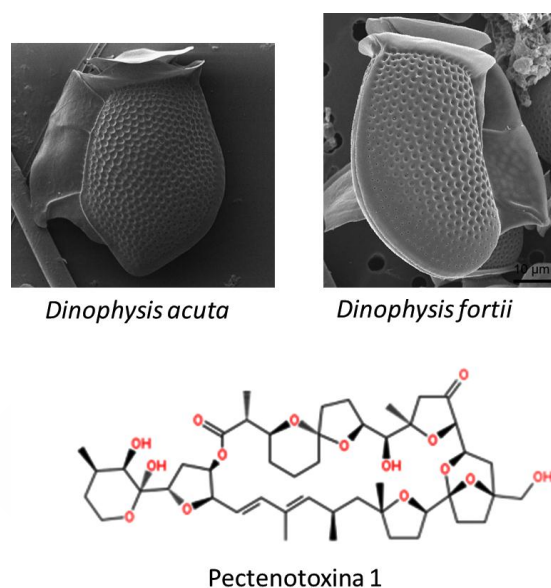
### **Pectenotoxinas**

Las pectenotoxinas (PTXs), al igual que el AO y DTXs, son sintetizadas por distintos dinoflagelados del género *Dinophysis* (Figura 10), por lo que es frecuente que las PTXs coexistan con los derivados del AO en moluscos contaminados. Debido a la asociación con el AO y las DTXs, las PTXs han sido tradicionalmente incluidas en el grupo de las toxinas diarreicas, sin embargo, se ha demostrado que los síntomas gastrointestinales se debían a la presencia de AO en los extractos de marisco donde se aislaron también PTXs ya que estas no producían diarrea (Munday, 2014). Por ese motivo y porque poseen una estructura química diferente a la del AO, las PTXs se clasifican como un grupo independiente. Este tipo de toxinas fue aislado por primera vez en Japón de las glándulas digestivas de las vieiras *Patinopecten yessoensis* (Yasumoto *et al.*, 1984; Yasumoto *et al.*, 1985). Desde entonces, las PTXs se han detectado en Italia, Irlanda, Portugal, Japón, Nueva Zelanda, Australia, España y Rusia (Draisci *et al.*, 2000; Fernandez, 2006; James *et al.*, 1999; Lee, 1989; Madigan, 2006; Vale, 2004; Vershinin, 2006).

Las PTX son lactonas poliéter similares al AO. Sin embargo, a diferencia de éste, el grupo carboxilo en muchas pectenotoxinas forma parte de una lactona macrocíclica (Figura 10). Se han descrito más de 20 análogos, algunos de los cuales son sintetizados por microalgas, otros se forman a través del metabolismo en los tejidos de los moluscos y otros aparecen como artefactos producidos durante los

procesos de extracción (Munday, 2014).

La principal diana celular de las PTXs parece ser el citoesqueleto de actina (Espina *et al.*, 2008). Sin embargo, si la interacción de la toxina con la actina está involucrada en la toxicidad de las PTXs *in vivo* y las vías mediante las cuales dichas interacciones podrían causar daño tisular o muerte se desconocen por el momento (Munday, 2014).



**Figura 10.** Dinoflagelados del género *Dinophysis* productores de pectenotoxinas y estructura química de la pectenotoxina 1.

### Yesotoxina

La yesotoxina (YTX) es un metabolito producido por los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum* (Satake *et al.*, 1997a), *Lingulodinium polyedrum* (Draisci *et al.*, 1999) y *Gonyaulax spinifera* (Mori *et al.*, 2003), cuyas imágenes se muestran en la Figura 11. Esta ficotoxina se aisló por primera vez en 1986, en la Bahía Mutsu (Japón), a partir de las glándulas digestivas de la vieira *Pactinopecten yessoensis* en el transcurso de una marea roja de tipo diarreico (Murata *et al.*, 1987). Desde entonces se han identificado YTXs en diferentes moluscos de las costas de Italia (Ciminiello *et al.*, 1997), Noruega, Nueva Zelanda, Canadá (Finch *et al.*, 2005), España y Estados Unidos (Paz *et al.*, 2007).

Como se muestra en la Figura 11, la estructura de la YTX presenta una forma característica en escalera formada por 11 anillos éter adyacentes de diferentes tamaños y una cadena terminal unilateral acíclica e insaturada consistente en 9 carbonos y 2 éteres sulfato (Draisci *et al.*, 2000). Mientras que el esqueleto carbonado es liposoluble los dos grupos sulfato confieren a la molécula características anfifílicas, lo que convierte a la YTX en la más polar de las toxinas lipofílicas (Yasumoto *et al.*, 1997). Se han identificado numerosos análogos de YTX en diferentes microalgas y moluscos. Las diferencias químicas de los análogos de la YTX incluyen la adición de una unidad metileno asociada a un grupo sulfato, como ocurre en la homoyesotoxina (Satake *et al.*, 1997b) y cambios más o menos extensos en el C9 de la cadena terminal.

Al igual que las PTXs, inicialmente la YTX y sus análogos se clasificaron en el grupo de las toxinas diarreas porque eran extraídas de los moluscos junto con el AO y las DTXs (Murata *et al.*, 1987). Sin embargo, se ha demostrado que la YTX no causa diarrea (Ogino *et al.*, 1997; Tubaro *et al.*, 2003), no inhibe fosfatasa de proteína (Ogino *et al.*, 1997) y no es letal para el ratón tras su administración oral (Aune *et al.*, 2002; Ogino *et al.*, 1997; Tubaro *et al.*, 2003). Sin embargo, la YTX es altamente tóxica, principalmente cardiotóxica cuando es administrada intraperitonealmente al ratón, mientras que su toxicidad oral es 10 veces menor (Aune *et al.*, 2002). Aunque el mecanismo de acción de la YTX no se conoce por completo, se sabe que es un potente activador de fosfodiesterasas (Alfonso *et al.*, 2003). Además, recientemente se ha descrito que la YTX disminuye la proliferación celular de líneas celulares tumorales (Rubiolo *et al.*, 2013; Rubiolo *et al.*, 2014a). Las consecuencias de una intoxicación por YTX en humanos se desconocen ya que no hay constancia de haberse producido (Paz *et al.*, 2008).

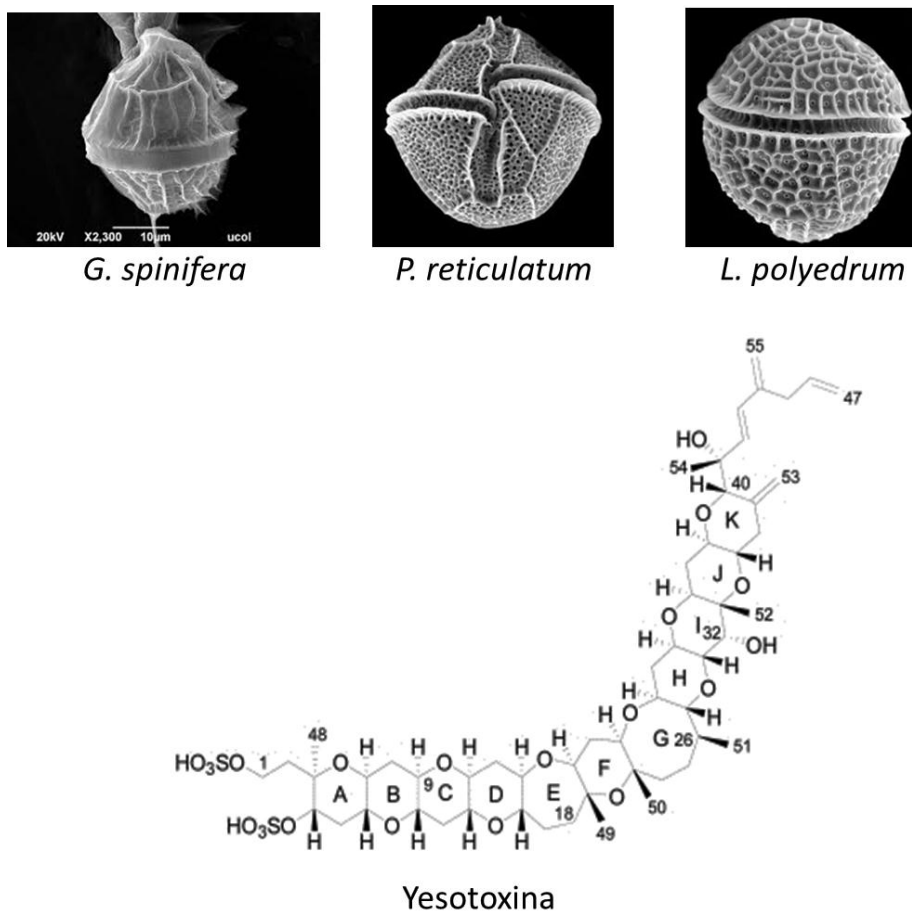


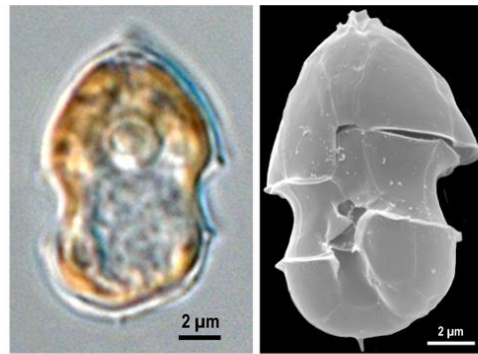
Figura 11. Principales dinoflagelados productores de yesotoxina y estructura química de la yesotoxina.

### Azaspirácidos

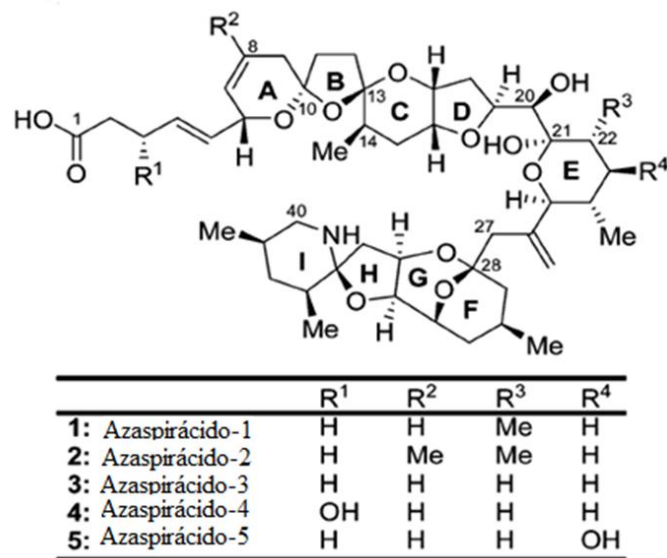
Los azaspirácidos (AZAs) son producidos por el dinoflagelado *Azadinium spinosum* cuya imagen se muestra en la Figura 12. Las primeras intoxicaciones en humanos atribuidas a los AZAs sucedieron en 1995 en Holanda por consumo de mejillones *Mytilus edulis* procedentes de Irlanda (McMahon *et al.*, 1995; Satake, 1999). Los síntomas producidos eran similares a los cuadros clínicos producidos por DSP. Posteriormente se ha detectado la presencia de AZAs en moluscos (mejillones, almejas, berberechos y navajas) de varios países europeos incluyendo Irlanda, Italia, Francia, Inglaterra, Noruega y España (James *et al.*, 2002b; Magdalena *et al.*, 2003; Satake, 1999).

Los AZAs son moléculas lipofílicas con un peso molecular de 800 Da, que presentan tres uniones entre anillos de tipo espiro, un grupo amino y un grupo carboxilo (Figura 12). Se han identificado en torno a una docena de análogos de la molécula en función de los sustituyentes presentes en los radicales R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub> (James *et al.*, 2003; Oufji *et al.*, 1999). A nivel molecular, el azaspirácido-1 (AZA-1) afecta al citoesqueleto celular disminuyendo la concentración de actina filamentosa e incrementa los niveles de Ca<sup>+2</sup> citosólico y de AMPc (Alfonso *et al.*, 2005; Roman *et al.*, 2002; Roman *et al.*, 2004; Vale *et al.*, 2008). Sin embargo, en varias líneas celulares el AZA-1 es citotóxico en el rango nanomolar y a tiempos de incubación largos (Twiner *et al.*, 2005). Además, el AZA-1 y AZA-2 son citotóxicos en células neuronales donde también disminuyen los niveles de actina a concentraciones mayores que las necesarias para producir citotoxicidad por lo que su efecto sobre el citoesqueleto podría ser consecuencia de su potente acción citotóxica (Vale *et al.*, 2007b). Recientemente se describió que los AZAs presentan actividad cardiotoxica asociada a los canales de potasio hERG (del inglés *human ether-a-go-go-related gene*), bloqueando el canal con una potencia baja (Twiner *et al.*, 2012) y que el AZA-2 produce arritmia en ratas y aumenta el nivel de expresión de los canales hERG (Ferreiro *et al.*, 2014a; Ferreiro *et al.*, 2014b).

Los síntomas de la intoxicación causados por azaspirácidos en humanos son similares a los producidos por DSP y por enterotoxinas de bacterias e incluyen náuseas, vómitos, diarrea, dolores estomacales y cefalea. Estos síntomas aparecen entre las 3 y las 18 horas tras la ingestión del marisco contaminado y su recuperación se produce a los 2-5 días (Vilariño, 2007).



*Azadinium spinosum*

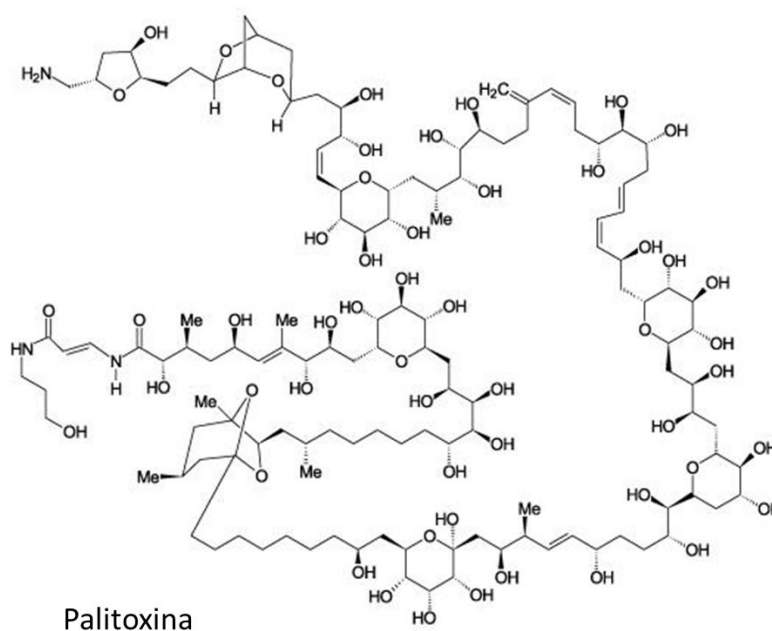
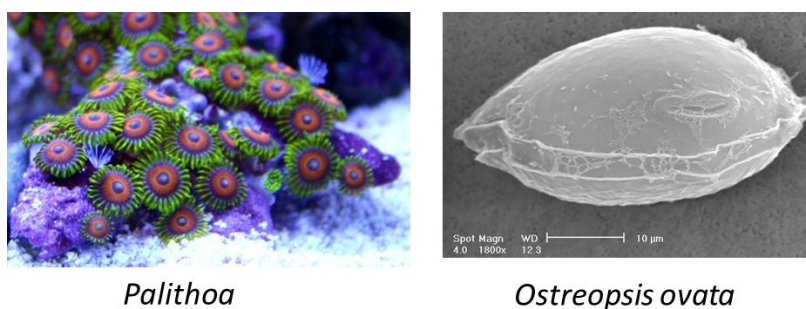


**Figura 12.** Dinoflagelado *Azadinium spinosum* productor de AZAs y estructura química de los AZAs. Adaptado de Vale *et al.*, 2007 (Vale *et al.*, 2007b).

## Palitoxinas

La palitoxina (PLTX) es uno de los compuestos naturales no proteicos más potentes conocidos hasta la fecha. La PLTX y sus congéneres, son producidos por corales del género *Palythoa* encontrados principalmente en Japón, Madagascar y Hawaii, así como por varias especies de dinoflagelados del género *Ostreopsis* (Figura 13). La PLTX se ha encontrado en los océanos Pacífico, Índico y Atlántico así como en el Mar de China, en el Golfo de Méjico y en el mar Mediterráneo (Katikou *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2010). Las PLTX se acumulan también en otros organismos como esponjas, peces, crustáceos y mejillones (Ciminiello *et al.*, 2006).

Como se muestra en la Figura 13, la PLTX es una molécula de gran tamaño con regiones lipofílicas e hidrofílicas y contiene la cadena de átomos de carbono continuos (115 de los 129 carbonos totales) más larga existente en un producto natural (Katikou *et al.*, 2014). Entre los análogos de la PLTX se encuentran la ostreocina-D, la homoPLTX, la bis-homoPLTX y la deoxiPLTX (Faust, 1999; Faust *et al.*, 1996). El mecanismo de acción de la PLTX consiste en su unión a la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , a la que convierte en un canal iónico inespecífico lo cual altera la permeabilidad iónica de la membrana celular y de esta forma produce la muerte de la célula (Hilgemann, 2003). Uno de los síntomas más característicos de la intoxicación por PLTX es la rhabdomiólisis o ruptura de fibras musculares y liberación del contenido intracelular de los miocitos al plasma sanguíneo (Okano *et al.*, 1998). La intoxicación por PLTX también cursa con náuseas, vómitos, parestesia, bradicardia, fallo renal, fallo respiratorio y en los casos más severos muerte (Ramos *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito que la intoxicación por PLTX produce alteraciones electrolíticas como hipercalcemia e hiperfosfatemia (Wu *et al.*, 2014). Además, la PTX es la uno de los agentes causales del clupeotoxismo, un síndrome tóxico asociado al consumo de peces clupeoides como sardinas, arenques y anchoas, caracterizado por una alta mortalidad (Ramos *et al.*, 2010).



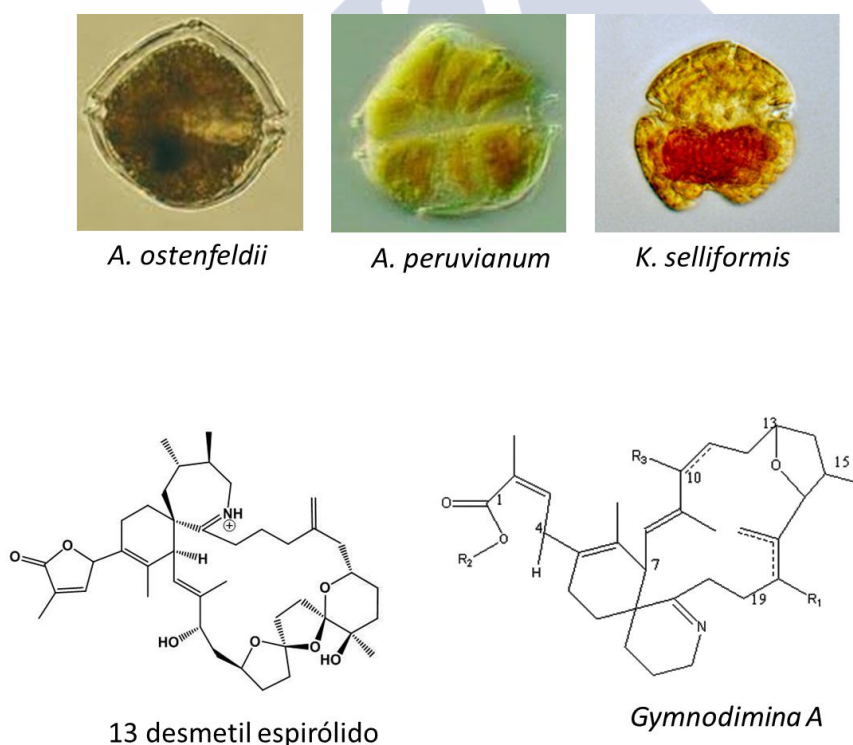
**Figura 13.** Principales organismos productores de palitoxina y estructura química de la palitoxina.

### Iminas cíclicas

El grupo de las iminas cíclicas está constituido por los espirólidos, las gimnodiminas, las pinnatoxinas, las pteriatoxinas, los prorocetrólidos y las espiroprocentriminas. Los espirólidos constituyen el grupo más numeroso dentro de las iminas cíclicas. Estos compuestos se han encontrado en un gran número de especies de moluscos bivalvos de Canadá y América del Norte (Anderson *et al.*, 2005), Chile (Alvarez *et al.*, 2010) y Europa (Gribble, 2003; Villar Gonzalez *et al.*, 2006). Los espirólidos fueron identificados por primera vez en mariscos de Nueva Escocia y

Canada y más tarde se describió que el responsable de la producción de estos compuestos era el dinoflagelado *Alexandrium ostenfeldii* (Cembella *et al.*, 1999) cuya imagen se muestra en la Figura 14. La gimnodimina A fue aislada inicialmente en 1995 a partir del dinoflagelado *Gymnodinium cf. mikimotoi*, aunque posteriormente el dinoflagelado *Karenia selliformis* (Figura 14) fue identificado como el productor real de la toxina (Miles *et al.*, 2003).

Estructuralmente, la característica más representativa de esta clase de ficotoxinas es su región imina, que forma parte de un anillo bicíclico. Este anillo puede ser de tipo hexahidroisoquinolina, en el caso de los proroentrólidos, sin embargo, la mayoría de estas toxinas contienen una unidad cíclica espiroimina, presente en espirólidos, gimnodiminas, pinnatoxinas, pteriatoxinas, y espiroprorocentrinas (Molgo *et al.*, 2014). En la Figura 14 se representan algunas de las especies de dinoflagelados productoras de iminas cíclicas así como las estructuras químicas del 13 desmetil espirólido y la gimnodimina A.



**Figura 14. Dinoflagelados productores de iminas cíclicas y estructura química del 13 desmetil espirólido C y de la gimnodimina.**

La principal diana farmacológica de las iminas cíclicas son los receptores nicotínicos, sobre los que ejercen un fuerte antagonismo (Bourne *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que las iminas cíclicas disminuyen la función de los receptores colinérgicos muscarínicos y modifican el número de receptores presentes en la membrana celular (Wandscheer *et al.*, 2010). Otros autores, en cambio, sostienen que su interacción con receptores muscarínicos es mínima (Hauser *et al.*, 2012). Un estudio reciente describe que el 13-desmetilespirolido C bloquea los potenciales de acción neuromusculares con una potencia 300 veces mayor que la gimnodimina A (Marrouchi *et al.*, 2013).

Las iminas cíclicas son toxinas de acción rápida e inducen una rápida aparición de síntomas neurológicos similares a los descritos para las toxinas PSP, seguidos de muerte entre los 3 y 50 min después de la administración por vía intraperitoneal en ratón (Molgo *et al.*, 2014). Sin embargo, estas toxinas no han sido relacionadas con ningún caso de intoxicación en humanos.

## **1.2 Metabolitos de la esponja *Crambe crambe*: crambescinas y crambescidinas**

Las esponjas marinas son organismos multicelulares primitivos (> 600 millones de años). Dada su larga evolución, estos organismos cuentan con una amplia diversidad genética y suponen una fuente de productos naturales con actividad biológica y potencial interés biomédico.

*Crambe crambe* es una esponja incrustante roja y tóxica (Figura 15), que se encuentra entre 5 y 35 m de profundidad a lo largo del litoral oeste mediterráneo. Esta esponja se ha expandido también hacia regiones del Océano Atlántico como los archipiélagos de Madeira y Canarias, colonización probablemente mediada por actividades humanas (Duran *et al.*, 2004). *Crambe crambe* produce necrosis en los tejidos de otras esponjas con las que está en contacto (Buscema *et al.*, 1985) y se ha descrito que la producción de compuestos bioactivos depende de la competición por el espacio en su medio natural (Becerro *et al.*, 1997). Esta esponja produce dos familias de alcaloides de guanidina, crambescinas y crambescidinas, descritos por primera vez en la década de los 90 (Berlinck *et al.*, 1993; Berlinck *et al.*, 1992). La toxicidad de esta esponja se asocia con la familia de las crambescidinas, mientras que

el papel de las crambescinas en su toxicidad se desconoce.

La estructura química de los compuestos representativos de las familias crambescina y crambescidina, empleados en esta tesis, se muestran en la Figura 15.

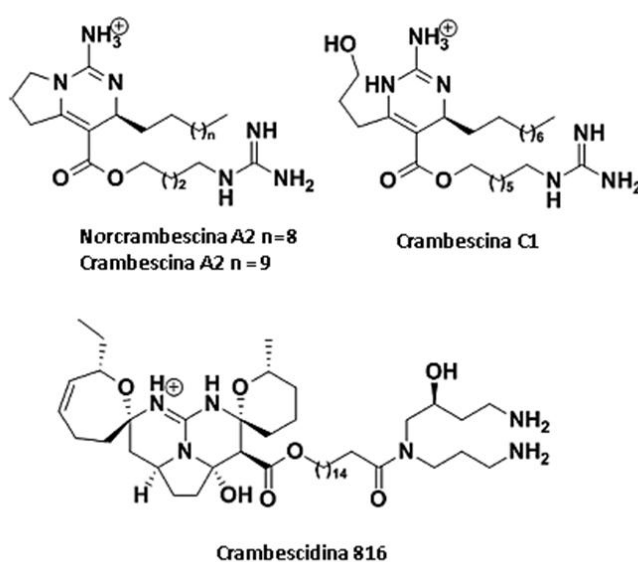


Figura 15. Esponja *Crambe crambe* y estructura química de los alcaloides guanidina Norcrambescina A2, Crambescina A2, Crambescina C1 y Crambescidina 816.

Aunque los compuestos de las dos familias deberían compartir una misma ruta biosintética, las crambescinas son estructuralmente más simples que las crambescidinas. Al igual que las crambescinas, las crambescidinas presentan un grupo guanidino formando parte de un heterociclo (al igual que la guanina, tetrodotoxina y saxitoxina). Mientras que las crambescinas presentan dos grupos guanidina (uno de ellos alifático), la crambescidina 816 sólo presenta uno. Las

crambescinas se clasifican en tres grupos de acuerdo con las características estructurales de la cadena propilo lateral (izquierda) situada en el C8 del núcleo guanidino. La estructura de todas las crambescinas A incluye un anillo pirrolidina y las crambescinas C se caracterizan por una cadena lateral lineal 3-hidroxi-propilo en el C8. Los diferentes análogos surgen en función del número de metilenos presentes en la cadena lateral alquímica superior, en la cadena guanidino-alquímica inferior y en la configuración relativa de los sustituyentes sobre el esqueleto cíclico. La estructura de las crambescidinas presenta una guanidina tricíclica central conectada a una espermidina a través de un ácido graso de cadena larga lineal ( $\omega$ -hidroxiácido).

En la actualidad, existen pocos estudios descriptivos de la actividad biológica de los compuestos producidos por *Crambe crambe*, principalmente debido a la dificultad para la obtención de los mismos. Sin embargo, hay estudios que contemplan la actividad citotóxica de las crambescidinas en células tumorales, lo que ha puesto de manifiesto su potencial como posibles agentes anticancerígenos (Aron *et al.*, 2004; Rubiolo *et al.*, 2014b). En este sentido, la crambescidina 800 induce diferenciación en células de leucemia K562 produciendo la detención en la fase S del ciclo celular (Aoki *et al.*, 2004). Este compuesto también presenta propiedades antivirales y antifúngicas (Aron *et al.*, 2004). Por otra parte, la crambescidina 816 es citotóxica en neuronas corticales (Bondu *et al.*, 2012) y antagoniza los canales de calcio dependientes de voltaje, con mayor potencia que la nifedipina, un conocido antagonista de estos canales (Berlinck *et al.*, 1993). La crambescidina 816 así como la crambescidina 800 tienen potencial para el tratamiento de patologías neurodegenerativas por su papel neuroprotector contra el estrés oxidativo en líneas celulares de hipocampo de ratón (Aoki *et al.*, 2004). A pesar de su potencial terapéutico, aunque se han aislado varios análogos de estos alcaloides guanidina y se han descrito diferentes métodos para su producción (Bondu *et al.*, 2012), la obtención a gran escala de estos alcaloides es, por el momento, poco práctica (Murray *et al.*, 2013).

### **1.3 Canales iónicos dependientes de voltaje como dianas farmacológicas de compuestos marinos**

Los canales iónicos son proteínas transmembrana que constituyen la diana molecular de numerosas toxinas y agentes terapéuticos. Muchos de los procesos fisiológicos que ocurren en los seres vivos, entre los que se encuentran el potencial de acción, la secreción de hormonas y neurotransmisores, el latido cardíaco y la contracción muscular están regulados, en gran medida, por miembros de la superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje. Esta superfamilia proteica, que consta de más de 140 miembros, constituye uno de los mayores grupos de proteínas implicadas en la transducción de señales celulares (Yu *et al.*, 2005). Todas las moléculas de origen marino empleadas en esta tesis interaccionan con canales iónicos dependientes de voltaje afectando así a la función celular. En ese sentido, las ciguatoxinas y el gambierol interaccionan principalmente con canales de sodio y potasio dependientes de voltaje, respectivamente. Además, la crambescidina 816 actúa sobre canales de calcio dependientes de voltaje. Teniendo en cuenta que los principales canales dependientes de voltaje en neuronas son los canales de sodio, los canales de potasio y los canales de calcio y que los linfocitos T humanos presentan canales de potasio, a continuación se revisan las principales propiedades de estos canales y de sus corrientes.

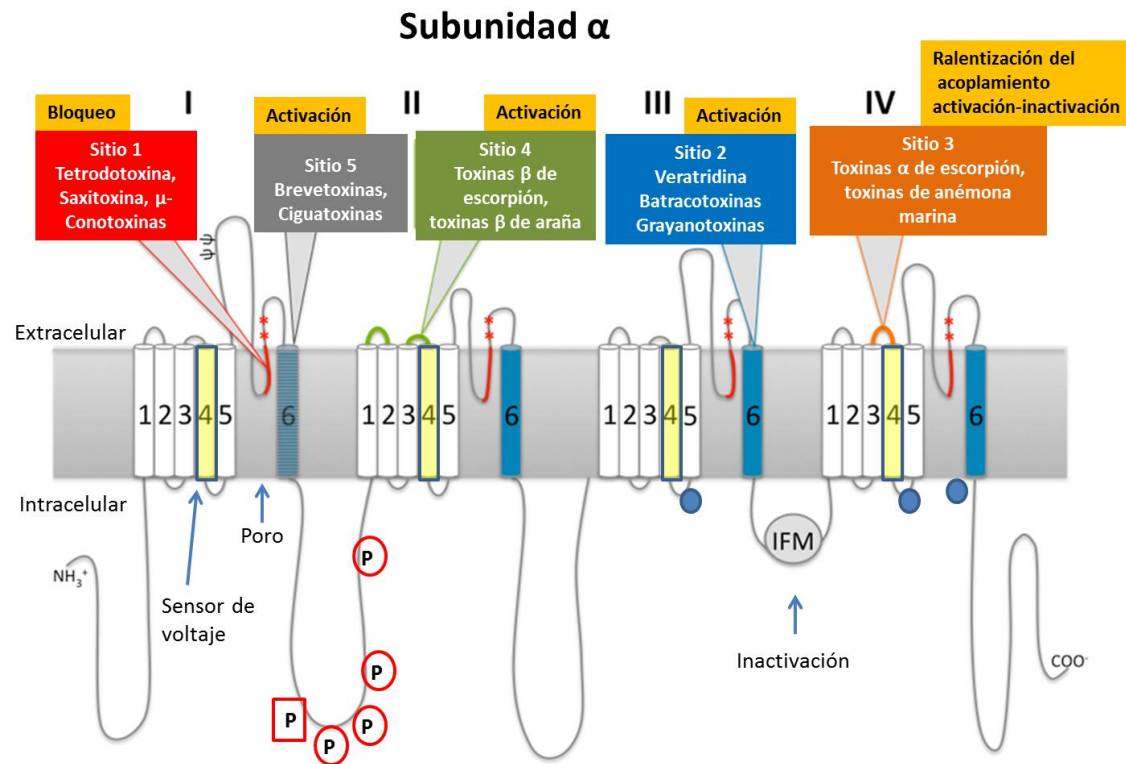
#### **1.3.1 Canales de sodio dependientes de voltaje**

Los canales de sodio dependientes de voltaje son los responsables del inicio del potencial de acción en células excitables. Existen diez genes que codifican las 9 subunidades  $\alpha$  de canales de sodio (Nav1.1-Nav1.9) y otra forma atípica de estos canales denominada Nax (Catterall, 2014; Yu *et al.*, 2004). Mientras que las isoformas Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6 predominan en el sistema nervioso central, las isoformas Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9, son propias del sistema nervioso periférico y las isoformas Nav1.4 y Nav1.5 se encuentran en músculo esquelético y corazón, respectivamente (Vacher *et al.*, 2008). En la Tabla 2 se recogen las principales propiedades farmacológicas, la distribución tisular, las principales funciones fisiológicas y las alteraciones fisiopatológicas de los principales canales Nav (<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=82>).

Canal	Localización	Función	Fisiopatología	Activadores	Bloqueantes de poro
<b>hNav1.1</b>	Neuronas espinales principalmente cuerpos celulares y neuronas cerebrales	Inicio de potenciales de acción y disparo repetitivos	Epilepsia generalizada con convulsiones febriles	Batracotoxina, veratridina	TTX, STX
<b>hNav1.2</b>	Cerebro, axones desmielinizados y axones premielinizados en desarrollo, cuerpos celulares neuronales y dendritas	Conducción del potencial de acción	Encefalopatía epiléptica infantil precoz. Convulsiones neonatales familiares benignas	Toxina $\beta$ de escorpión, batracotoxina, aconitina, veratridina	TTX, STX
<b>hNav1.3</b>	Médula espinal, tálamo, amígdala, cerebelo, corazón y cerebro	Contribución al disparo repetitivo de potenciales de acción	Epilepsia	Batracotoxina, veratridina	TTX, STX
<b>hNav1.4</b>	Músculo esquelético	Inicio y propagación del potencial de acción	Miotonía agravada por potasio	Grayanatoxina, veratridina, batracotoxina, Toxina $\beta$ de escorpión	STX, TTX, conotoxina GIIIA, mexiletina, lidocaína
<b>hNav1.5</b>	Corazón	Inicio y propagación del potencial de acción	Fibrilación atrial familiar, síndrome Brugada, síndrome del QT largo tipo 3, cardiomiopatía dilatada	Aconitina, batracotoxina, veratridina	STX, TTX, lidocaína, amiodarona, quinidina
<b>hNav1.6</b>	Cerebelo, corteza cerebral, hipocampo, células de Purkinje cerebelares, tronco encefálico, astrocitos	Conducción de potenciales de acción, corriente persistente de sodio	Ataxia cerebelar, encefalopatía epiléptica severa	Toxina $\beta$ de escorpión, batracotoxina	TTX, STX
<b>hNav1.7</b>	Neuronas de la raíz dorsal espinal, neuronas de sistema nervioso simpático, células de Schwann y células neuroendocrinas	Dolor neuropático, dolor por calor tras quemaduras	Mutaciones causantes de insensibilidad al dolor (sin patología nerviosa periférica)	Batracotoxina, veratridina	TTX, lidocaína, $\text{Cd}^{+2}$
<b>hNav1.8</b>	Nociceptores y fibras-A mielinizadas, neuronas de la raíz dorsal espinal de diámetro pequeño y mediano	Fase despolarizante de potenciales de acción en neuronas de la raíz dorsal espinal	Sobreexpresado en esclerosis múltiple. Su sobreexpresación produce déficit de la función cerebelar.	Batracotoxina, veratridina	TTX, lidocaína
<b>hNav1.9</b>	Neuronas del plexo mientérico, neuronas de la raíz dorsal espinal tipo-C, neuronas trigeminales	Despolarización, incremento de excitabilidad	Dolor inflamatorio	No descrito	TTX

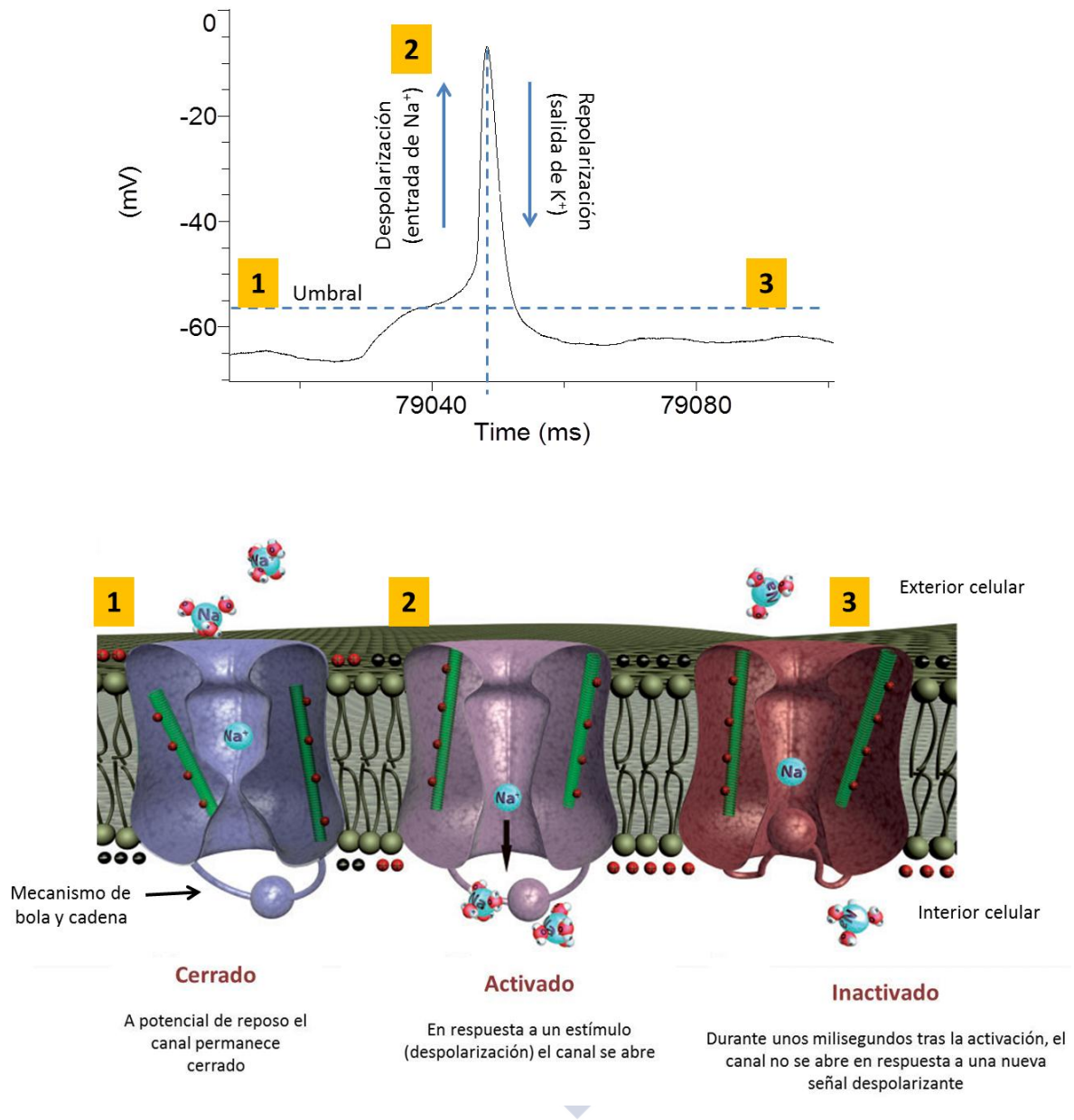
**Tabla 2. Propiedades farmacológicas, distribución tisular, funciones fisiológicas y fisiopatología asociadas a los canales de sodio dependientes de voltaje (<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=82>). TTX es tetrodotoxina y STX es saxitoxina.**

Los canales de sodio dependientes de voltaje, están formados por una subunidad proteica  $\alpha$  de 260 kDa asociada a una o más subunidades  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y/o  $\beta 3$ ) de 33-36 kDa. El clonaje y la secuenciación del ADN complementario que codifica las subunidades  $\alpha$  de los canales de sodio ha demostrado que el ARN mensajero que codifica la subunidad  $\alpha$  es suficiente para la expresión de canales de sodio funcionales (Goldin *et al.*, 1986). Las subunidades  $\alpha$  de los canales de sodio determinan la estructura del canal mientras que las subunidades  $\beta$  modulan la cinética y la dependencia de voltaje de la activación e inactivación del canal y además actúan como moléculas de adhesión celular (Catterall, 2014). Las subunidades  $\beta$  son proteínas transmembrana que contienen un extremo peptídico N-terminal, un dominio inmunoglobulina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular C-terminal. Las subunidades  $\alpha$  están formadas por unos 2000 residuos de aminoácidos organizados en 4 dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales contiene 6 segmentos transmembrana (S1-S6). En cada uno de los dominios de la subunidad  $\alpha$ , existe un sensor de voltaje que se encuentra en el segmento S4, y entre los segmentos 5 y 6 hay un bucle de unión que constituye el filtro de selectividad iónica tal y como se muestra en la Figura 16 (Stevens *et al.*, 2011). La activación del canal de sodio en respuesta a cambios de voltaje se genera por el movimiento hacia afuera del segmento S4 de cada dominio, que contiene residuos cargados como consecuencia de una alteración de cargas eléctricas a través de la membrana. Existen 6 sitios de unión de toxinas en los canales de sodio. Las toxinas que actúan bloqueando el canal se unen al sitio 1 del mismo mientras que la mayoría de las toxinas que se unen a los sitios 2-6 actúan activando estos canales (Eijkelkamp *et al.*, 2012). En la Figura 16 se muestran los sitios de unión de las toxinas que actúan en canales de sodio (salvo el sitio de unión 6, al que se unen algunas conotoxinas, ya que no ha sido completamente caracterizado) así como sus efectos sobre los diferentes sitios del canal (Eijkelkamp *et al.*, 2012). Por otra parte, conviene mencionar que los bloqueantes de canales de sodio se emplean frecuentemente en clínica como anestésicos locales, antiarrítmicos y antiepilépticos (Catterall *et al.*, 2005a).



**Figura 16. Representación esquemática de la estructura de la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio dependientes de voltaje e identificación de las áreas de unión de neurotoxinas.** Figura modificada de Stevens (Stevens *et al.*, 2011). Los números romanos indican los dominios de la subunidad  $\alpha$ ; los segmentos 5 y 6 son los segmentos adyacentes al poro y las hélices S4 (amarillo) constituyen los sensores de voltaje. El bucle intracelular de los dominios III y IV que contiene los residuos isoleucina, fenilalanina, metionina (IFM) ocluye la boca del poro durante el proceso de inactivación; P indica lugar de fosforilación (en los círculos rojos: lugar de fosforilación por cinasa de proteínas A; en cuadrado rojo lugar de fosforilación por cinasa de proteínas C);  $\psi$ , lugar probable de N-glucosilación. Los círculos en los bucles reentrantes de cada dominio representan los aminoácidos que constituyen el filtro de selectividad iónica.

Como se mencionó anteriormente, los canales  $\text{Na}_v$  son los principales responsables del inicio del potencial de acción en células excitables. En la Figura 17 se muestra cómo el funcionamiento de los canales de sodio dependientes de voltaje influye en la generación de potenciales de acción en neuronas. Los canales de sodio dependientes de voltaje experimentan cambios cíclicos entre tres estados funcionales distintos, que incluyen el estado de reposo o cerrado, el estado activado y el estado inactivado. (Denac *et al.*, 2000). En el estado de reposo, el canal está cerrado debido a un cambio conformacional que requiere la repolarización de la membrana. Cuando la membrana celular se despolariza (tiene menos carga negativa), los canales de sodio dependientes de voltaje se activan y se produce la entrada de sodio. Cuando esta entrada de sodio es capaz de que la membrana celular se despolarice más allá de cierto umbral (entre -65 mV y -50 mV, dependiendo principalmente del tipo celular) la célula dispara un potencial de acción. Tras unos milisegundos, se inicia la fase de repolarización en la que los canales de potasio dependiente de voltaje se abren y los canales de sodio se inactivan gradualmente. Este proceso de inactivación requiere un cambio conformacional que está asociado al bucle intracelular que conecta los dominios III y IV del canal de sodio que contiene los residuos isoleucina, fenilalanina, metionina. Este bucle actúa como una especie de “bola y cadena” (Goldin, 2003) que se une a la parte intracelular del poro iónico inactivando el canal. Tanto en el estado inactivado como en el estado de reposo (canal cerrado) el canal no conduce iones, pero los canales que han sido inactivados como consecuencia de una despolarización prolongada no responden hasta que la célula se repolariza y los canales de sodio vuelven al estado de reposo o cerrado.

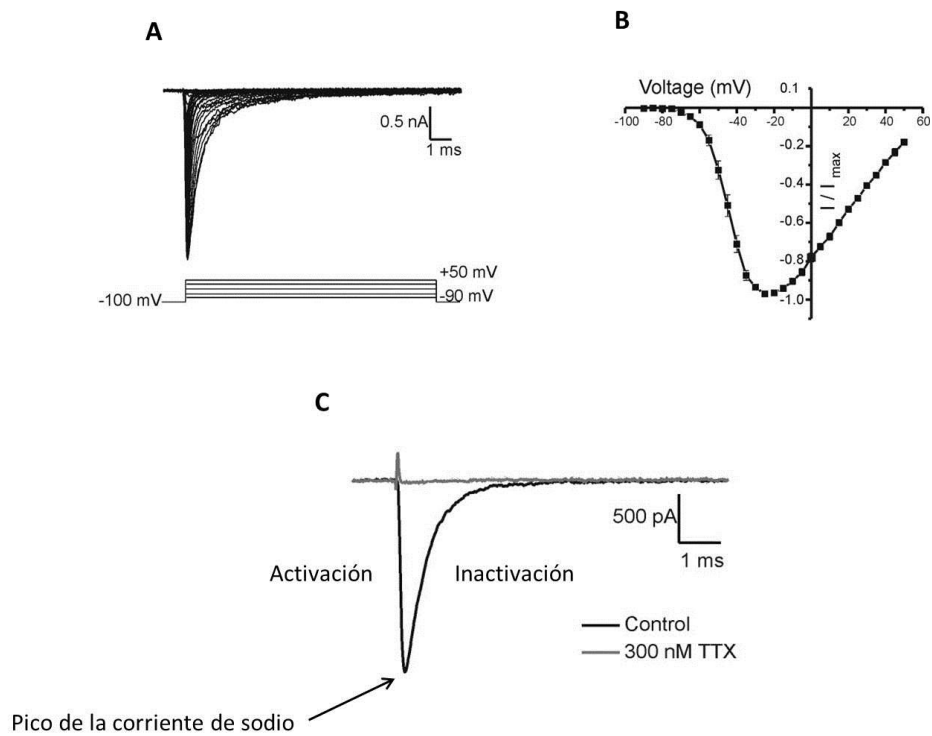


**Figura 17. Representación esquemática del funcionamiento del canal de sodio dependiente de voltaje y su influencia en la generación de potenciales de acción.** Los canales de sodio están cerrados en estado de reposo (1) y se activan con la despolarización celular generando corrientes de entrada de sodio y disparo de potenciales de acción en neuronas (2). Después de unos milisegundos, coincidiendo con la fase de repolarización del potencial de acción (3), los canales se inactivan como consecuencia del bloqueo del canal por el bucle intracelular de la subunidad  $\alpha$  (mecanismo de bola y cadena). Posteriormente la repolarización de la membrana produce la recuperación parcial de la inactivación (volviendo al estado cerrado). El registro del potencial de acción (panel superior) fue obtenido en una neurona cortical de 10 DIV. La figura del panel inferior está adaptada de Eijkelkamp *et al.*, 2012 (Eijkelkamp *et al.*, 2012).

### *Corrientes de sodio dependientes de voltaje*

Las corrientes de sodio se registraron por primera vez como parte del análisis del potencial de acción en un axón gigante de calamar empleando la técnica electrofisiológica de fijación de voltaje (Hodgkin *et al.*, 1952a; Hodgkin *et al.*, 1952b). Aquel trabajo demostró que las señales eléctricas en los nervios se iniciaban por la activación de corrientes de sodio dependientes de voltaje que despolarizaban la célula.

Para el registro de las corrientes de sodio se utilizan protocolos de varios pulsos de voltaje de corta duración, como el que se muestra en la Figura 18A, que despolarizan la célula consiguiendo la apertura de los canales  $Na_v$ . Dichos protocolos permiten obtener una curva corriente-voltaje donde se representa la corriente (eje Y) en función del voltaje (eje X), como se muestra en la Figura 18B. Como se aprecia en la Figura 18C, la corriente de sodio tiene una fase rápida de activación y después una fase que decrece exponencialmente, denominada inactivación. La cinética de activación e inactivación es dependiente de voltaje. Las corrientes de sodio se bloquean en presencia de bloqueantes específicos entre los que se encuentran la tetrodotoxina y la saxitoxina (Figura 18C).



**Figura 18. Dependencia de voltaje de las corrientes de sodio.** A, activación de corrientes de sodio (arriba) en función de diferentes pulsos de voltaje (abajo). B, curva corriente-voltaje normalizado respecto a la corriente máxima del control. C, cinética de la corriente de sodio dependiente de voltaje y efecto del bloqueante tetrodotoxina sobre la misma.

### 1.3.2 Canales de potasio dependientes de voltaje

Los canales de potasio dependientes de voltaje ( $K_v$ ) constituyen la familia más numerosa (unos 40 genes que los codifican) de todos los canales de potasio humanos, que también alberga a los canales de potasio activados por calcio ( $K_{Ca}$ ), a los canales de potasio rectificadores de entrada ( $K_{IR}$ , del inglés *inward-rectifying*) y a los canales de potasio de dos poros ( $K_{2P}$ ) (Gutman *et al.*, 2005). Los canales  $K_v$  participan en la regulación de la excitabilidad de la membrana en corazón y sistema nervioso y también en la regulación del potencial de reposo de células no excitables, como células de músculo liso y linfocitos (Catterall *et al.*, 2007). Los canales de potasio son importantes dianas celulares ya que están involucrados en diversas enfermedades neurológicas, cardíacas, inmunes y procesos inflamatorios (Tian *et al.*, 2014). Entre las enfermedades neurológicas asociadas a alteraciones en la función de los canales de potasio se encuentran la ataxia episódica y mioquimia (asociadas al canal  $K_v1.1$ ), las convulsiones neonatales benignas (asociadas a los canales  $K_v7.2$  y  $K_v7.3$ ), el Parkinson (asociado a los canales  $K_{IR2.1}$ - $K_{IR2.4}$ ), el Alzheimer (asociado a los canales  $K_v3.1$ - $K_v3.4$  y a canales  $K_{Ca}$ ) y el síndrome EAST que cursa con epilepsia, ataxia, sordera y tubulopatía renal (asociado a los canales  $K_{IR4.1}$  y  $K_{IR5.1}$ ) (Shieh *et al.*, 2000). La activación farmacológica de los canales de  $K^+$  en células excitables reduce la excitabilidad celular mientras que su inhibición la aumenta. Los moduladores de los canales  $K_v$  son principalmente iones metálicos, moléculas orgánicas pequeñas (3- 6 KDa) y péptidos derivados de venenos (Tian *et al.*, 2014). Estos compuestos regulan el canal bloqueando el poro (mecanismo típico de las moléculas orgánicas pequeñas y algunas toxinas de escorpión o anémonas marinas) o modulando la apertura o cierre del canal tras la unión al dominio sensible al voltaje, como en el caso de la toxina de araña anatoxina (Tian *et al.*, 2014).

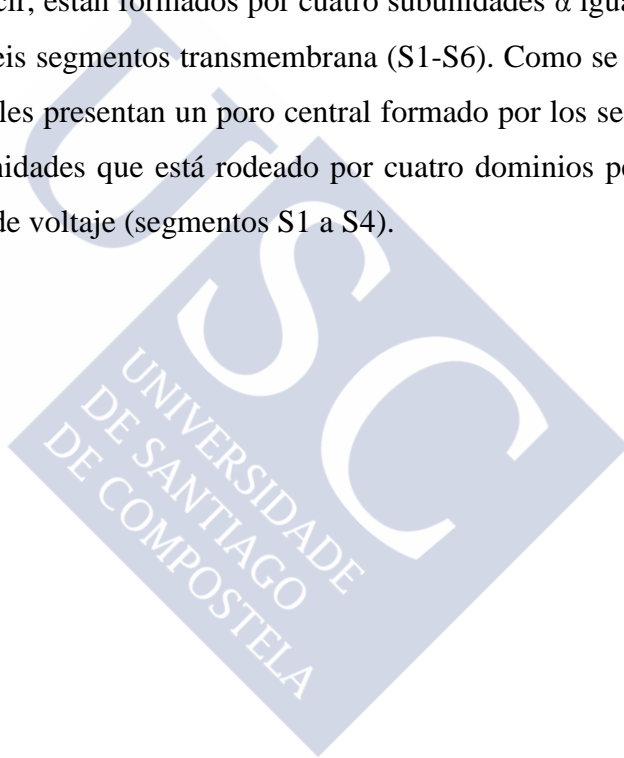
En la presente tesis se han estudiado los efectos de diferentes compuestos de origen marino sobre los canales de potasio dependientes de voltaje, una superfamilia que está compuesta por 12 subfamilias ( $K_v1$ - $K_v12$ ) (Gutman *et al.*, 2005). En la Tabla 3 se recogen las principales funciones, la fisiopatología, los agentes activadores y bloqueantes de los principales canales de potasio presentes en el sistema nervioso central.

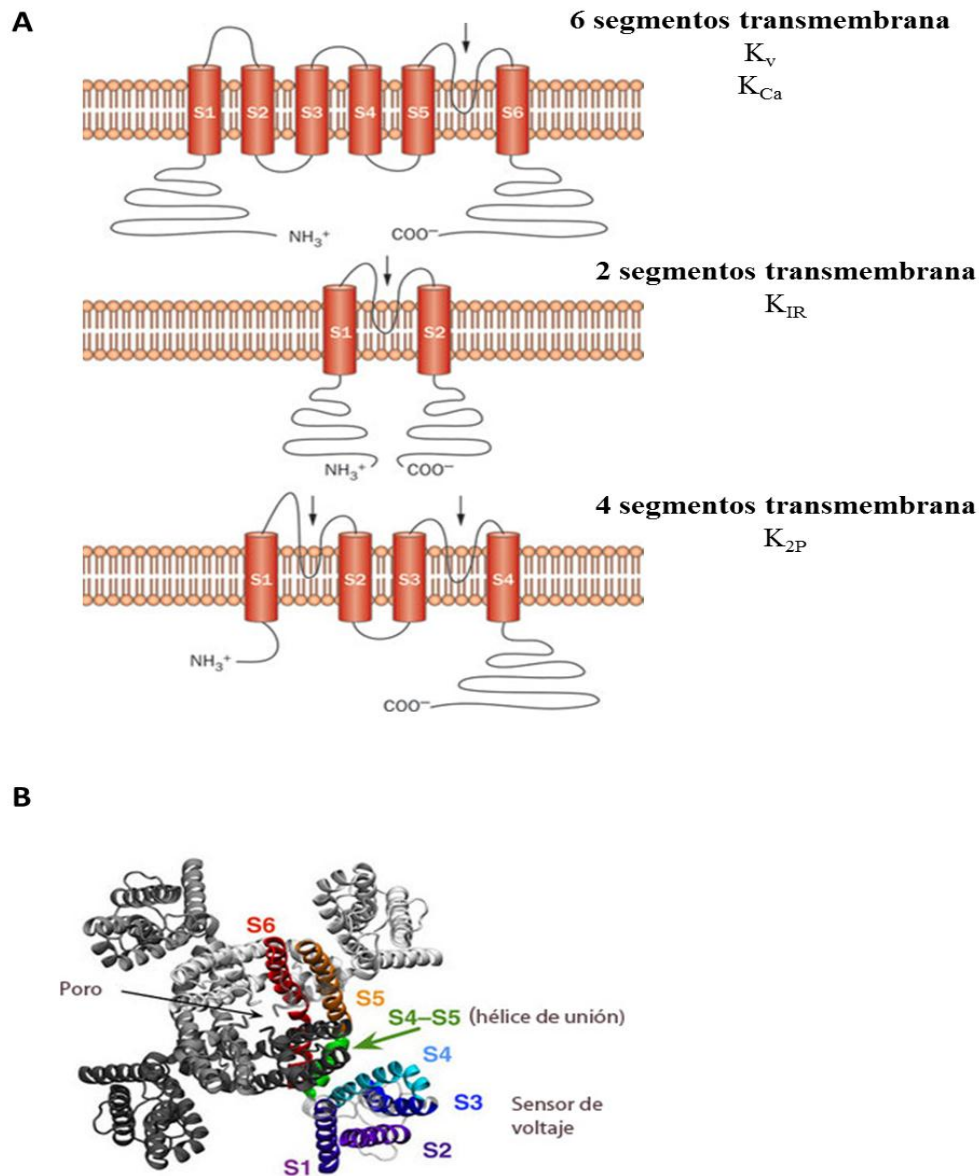
Canales	Tipo de corriente	Función	Fisiopatología asociada al canal	Activadores	Bloqueantes
<b>Kv1.1</b>	I <sub>K</sub> tardía	Mantenimiento del potencial de membrana y modulación de la excitabilidad neuronal	Ataxia episódica, mioquimia	Ninguno	TEA, 4-AP, nifedipina, diltiazem, flecainida, margatoxina
<b>Kv1.2</b>			No establecido		
<b>Kv1.3</b>		Mantenimiento del potencial de membrana y señalización de calcio en linfocitos y oligodendrocitos	Esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, psoriasis		Caribdotoxina, naltrexona, margatoxina
<b>Kv1.4</b>	I <sub>A</sub>	Hiperpolarización neuronal	No establecido en SNC	CaM/calcineurina	TEA, 4-AP, riluzol, quinidina, nicardipina
<b>Kv1.5</b>	I <sub>K</sub> tardía	Mantenimiento del potencial de membrana y modulación de la excitabilidad neuronal		S9947, 4-AP, capsaicina	
<b>Kv1.6</b>		Mantenimiento del potencial de membrana		Dendrotoxina A, TEA, 4-AP	
<b>Kv1.7</b>		Repolarización de la membrana		TEA, nifedipina, diltiazem, flecainida	
<b>Kv1.8</b>		No establecido en SNC		Caribdotoxina, Ba <sup>+2</sup> , TEA, 4-AP	
<b>Kv2.1</b>	I <sub>K</sub> tardía	Mantenimiento del potencial de membrana y modulación de la excitabilidad neuronal	No establecido en SNC	Ácido linoleico	Ba <sup>+2</sup> , TEA, 4-AP, anatoxina
<b>Kv2.2</b>	I <sub>K</sub> tardía			Ninguno	Quinina, TEA, 4-AP
<b>Kv3.1</b>	I <sub>K</sub> tardía	Disparo neuronal rápido, disparo rápido de interneuronas GABAérgicas, regulación de la	Hipersensibilidad al alcohol, ataxia, mioclonía (en ratones que carecen de Kv3.1 y Kv3.3)	Ninguno	Nifedipina, diltiazem, TEA, fampridina

<b>Kv3.2</b>		duración de potenciales de acción en terminales presinápticas	No establecido		
<b>Kv3.3</b>	$I_A$	No establecido	Hipersensibilidad al alcohol, ataxia, mioclonía (en ratones que carecen de Kv3.1 y Kv3.3)		
<b>Kv3.4</b>			No establecido		
<b>Kv4.1</b>	$I_A$	No establecido	No establecido	Ninguno	4-AP, TEA
<b>Kv4.2</b>					4-AP, heteropodatoxinas, ácido araquidónico
<b>Kv4.3</b>					4-AP, bupivacaína
<b>Kv7.2-7.3</b>	$I_K$ tardía	Determinación del umbral de excitabilidad neuronal	Convulsiones neonatales benignas familiares	PIP2, retigabina, flupirtina	TEA, linopirdina
<b>Kv10.1</b>	$I_K$ tardía	No establecido en SNC	No establecido en SNC	No establecido	Haloperidol, quinidina, calmodulina, terfenadina.
<b>Kv10.2</b>	$I_K$ tardía de salida no inactivante	No establecido	Encefalopatía epiléptica	No establecido	Quinidina

**Tabla 3. Propiedades electrofisiológicas, farmacológicas, función y enfermedades asociadas a los canales de potasio dependientes de voltaje expresados en el sistema nervioso central (<http://www.iuphar-db.org>).** Los canales Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9 no son funcionales por sí solos, sino que se unen a las subunidades de los canales Kv2 modificando su función. Los canales Kv7.5, Kv11.1, Kv11.3 y Kv12.1-Kv12.3 también se expresan en el SNC pero no existe información de sus propiedades farmacológicas, su función o las enfermedades asociadas a estos canales. TEA es tetraetilamonio, 4-AP es 4-aminopiridina,  $I_A$  es corriente de  $K^+$  tipo A o de inactivación rápida,  $I_K$  tardía es corriente rectificadora tardía.

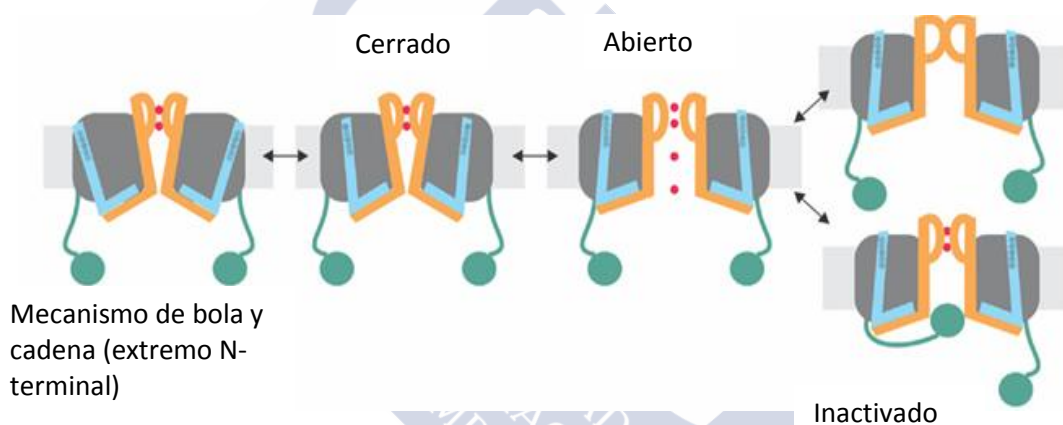
Los canales de potasio están formados por subunidades  $\alpha$  que determinan la estructura del canal y subunidades auxiliares  $\beta$  que regulan las propiedades del canal (Tian *et al.*, 2014). Las diferentes familias de canales de potasio se clasifican en función de la secuencia de aminoácidos y la estructura de la subunidad  $\alpha$  que contiene el poro y se pueden dividir en tres grupos en función del número de segmentos transmembrana que presenten, formando los canales de 6, 2 y 4 segmentos transmembrana. Como se muestra en la Figura 19A, los  $K_v$  y los  $K_{Ca}$  contienen seis segmentos transmembrana (S1-S6) y un poro, los canales  $K_{IR}$  contienen dos regiones transmembrana (S1-S2) y un poro, y los canales  $K_{2P}$  contienen cuatro regiones transmembrana (S1-S4) y dos poros. Los canales  $K_v$  son homotetrámeros, es decir, están formados por cuatro subunidades  $\alpha$  iguales, cada una de ellas formada por seis segmentos transmembrana (S1-S6). Como se muestra en la Figura 19B, estos canales presentan un poro central formado por los segmentos S5 y S6 de las cuatro subunidades que está rodeado por cuatro dominios periféricos que actúan como sensores de voltaje (segmentos S1 a S4).





**Figura 19. Representación esquemática de la estructura de las subunidades  $\alpha$  de los distintos subtipos de canales de potasio (Giudicessi *et al.*, 2012) y estructura del poro de los canales  $K_v$  (Fowler *et al.*, 2013). A, el panel superior muestra la estructura de las subunidades con 6 segmentos transmembrana, propia de los canales  $K_v$  y  $K_{Ca}$ . Estos canales están formados por cuatro subunidades, cada una de ellas con seis segmentos transmembrana (S1-S6), un poro (flecha) situado entre los segmentos S5 y S6 y un sensor de voltaje en el segmento S4. El panel central muestra la estructura de las subunidades con 2 segmentos transmembrana, propia de los canales  $K_{IR}$ . Estos canales están formados por cuatro subunidades, cada una de ellas con dos segmentos transmembrana (S1 y S2) y un poro (flecha) entre ambos segmentos. El panel inferior muestra la estructura de las subunidades con 4 segmentos transmembrana (S1-S4) y dos poros (flechas), propia de los canales  $K_{2P}$ . B, esquema de la estructura del canal (vista desde arriba). Las primeras 4 hélices  $\alpha$  (S1-S4, representadas a color) de cada monómero forman el dominio sensor de voltaje. Éste está conectado por la hélice de unión S4-S5 a las dos hélices  $\alpha$  restantes (S5 y S6), las cuales se juntan con las hélices  $\alpha$  S5 y S6 de los otros tres monómeros para formar el dominio del poro central a través del cuál difunden moléculas de agua e iones potasio.**

Los canales  $K_v$  se activan tras la despolarización celular y participan en el mantenimiento del potencial de reposo de la membrana. Dado que la concentración del ión  $K^+$  es mucho mayor en el citosol (130-160 mM) que en el medio extracelular (4-8 mM), cuando el canal se activa se produce una salida de iones potasio al exterior celular que repolariza la membrana celular (por ejemplo al finalizar el potencial de acción). En la Figura 20 se muestran los diferentes estados funcionales de los canales de potasio dependientes de voltaje (Blunck *et al.*, 2012). Al igual que sucede en los canales de sodio, el cierre y la apertura de los canales de potasio se debe a un cambio conformacional de la estructura del canal mientras que la inactivación de estos canales depende del mecanismo de bola y cadena, en el que el extremo N terminal se mueve hacia el interior del poro obstruyendo el paso de  $K^+$  (Borys *et al.*, 2008).

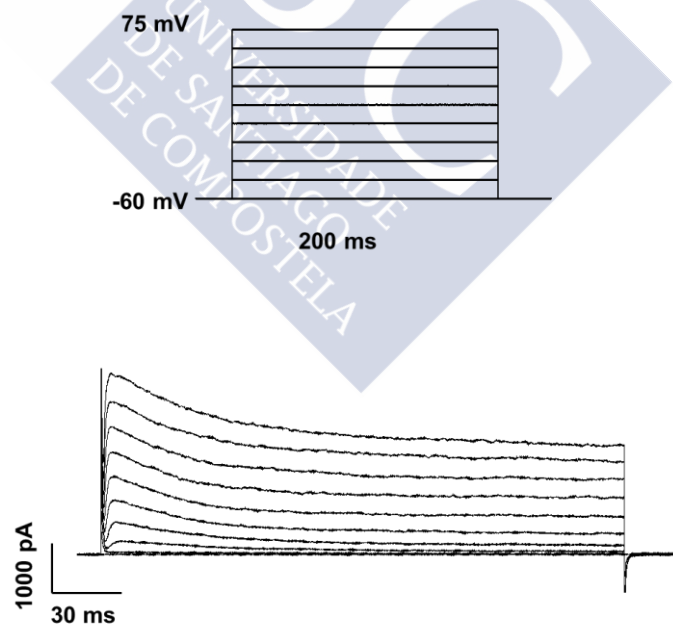


**Figura 20. Representación esquemática de un canal de potasio dependiente de voltaje indicando los tres estados principales del canal (Blunck *et al.*, 2012).** En el mecanismo de inactivación de los canales de potasio dependientes de voltaje llamado bola y cadena, la partícula inactivante del extremo N terminal (bola verde) disminuye la corriente mediante el bloqueo de la conducción del ión debido a que interacciona con el aminoácido isoleucina en el poro.

### *Corrientes de potasio dependientes de voltaje*

A diferencia de las corrientes de sodio, la corriente de potasio es una corriente de salida. La salida de potasio del medio intracelular hace que la célula quede cargada negativamente y se produzca la repolarización celular. Para bloquear la corriente de potasio dependiente de voltaje se emplean bloqueantes específicos de los canales de potasio dependientes de voltaje como el tetraetilamonio (TEA) y la 4-aminopiridina (4-AP). Sin embargo, estos bloqueantes no son específicos de algunos

canales Kv, como los Kv1.3 de linfocitos (ver siguiente sección). Las corrientes de potasio dependientes de voltaje se aíslan con bloqueantes de corrientes que se activan al mismo tiempo que la corriente de potasio, como es el caso de la corriente de sodio, es decir, para aislar las corrientes de potasio normalmente se emplean bloqueantes de la corriente de sodio dependiente de voltaje en la solución extracelular como la tetrodotoxina o la saxitoxina. Como se indicó en la Tabla 3 existen diferentes tipos de corrientes de potasio todas ellas importantes para la función neuronal. Así se ha descrito la corriente de  $K^+$  tipo A ( $I_A$ ) que presenta una cinética de inactivación rápida, la corriente de  $K^+$  sostenida o tipo K ( $I_K$ ) y la corriente de inactivación lenta o corriente tipo D ( $I_D$ ) (Ahmed, 1988; Everill *et al.*, 1998). En la presente tesis se registró la corriente total de potasio. En la Figura 21 se muestran las corrientes de  $K^+$  obtenidas en neuronas corticales mediante la aplicación de varios pulsos despolarizantes de 200 ms de duración modificando el potencial de membrana desde -60 mV hasta +75 mV. La variación del potencial de membrana entre -60 mV y +75 mV genera una corriente de potasio que aumenta a potenciales más positivos.



**Figura 21. Corrientes de potasio dependientes de voltaje.** En el panel de arriba se representa un protocolo de distintos pulsos de voltaje empleado para obtener las corrientes de  $K^+$  en neuronas corticales (abajo). Para ello se empleó la técnica de patch clamp en modo fijación de voltaje y se aplicaron varios pulsos despolarizantes de 200 ms de duración modificando el potencial de membrana desde -60 mV hasta +75 mV.

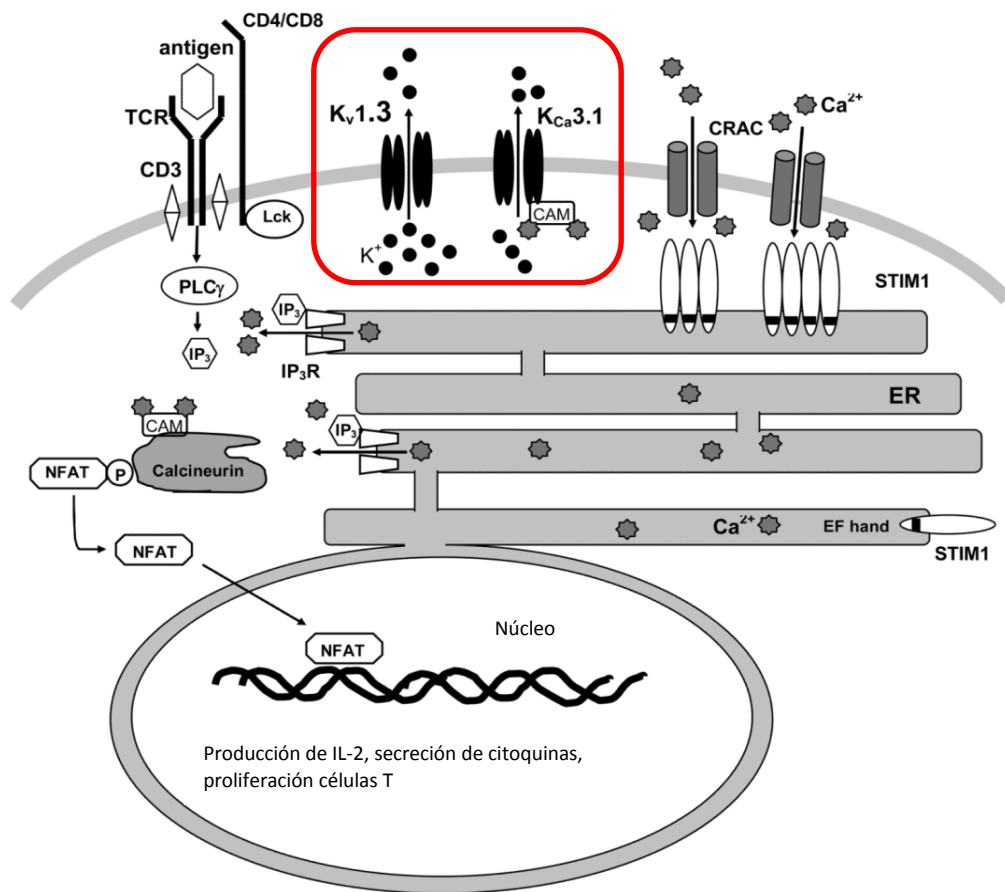
*Canales de potasio en linfocitos T humanos*

En la presente tesis doctoral también se evaluó el efecto de los análogos heptacíclico y tetracíclico del gambierol en canales de potasio de linfocitos humanos, cuyas principales características se describen a continuación.

Los linfocitos T son los responsables de coordinar la respuesta inmune y por tanto el bloqueo de la activación de estas células puede ser beneficioso en la prevención del rechazo de implantes o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. La proliferación y activación de los linfocitos T ante la respuesta antigénica, vienen precedidas de un aumento de las corrientes de potasio dependientes de voltaje, lo cuál mantiene potenciales negativos en la célula favoreciendo la entrada de calcio necesaria para la señalización de estos procesos (Cahalan *et al.*, 2009). Por tanto, el bloqueo de los canales de potasio de linfocitos T supone una estrategia para prevenir la activación de estas células.

En las células T se han caracterizado dos tipos de canales de potasio: el canal  $K_v1.3$  y el canal  $K_{Ca}3.1$  (Lam *et al.*, 2011). El canal  $K_v1.3$ , también presente en células excitables, es el principal canal de potasio de las células del sistema inmunitario. Una célula T en reposo posee unos 400 canales  $K_v1.3$  en su membrana (Lam *et al.*, 2011) que contribuyen al mantenimiento del potencial de membrana (Cahalan *et al.*, 1985). Los canales  $K_{Ca}3.1$ , en cambio, se activan por un incremento de calcio citosólico y no por cambios en el potencial de membrana (Grissmer *et al.*, 1993). La estructura de los canales  $K_{Ca}3.1$  es similar a la de los canales  $K_v$  ya que también están formados por cuatro subunidades  $\alpha$  (compuesta cada una de ellas por 6 segmentos transmembrana) que forman el poro. La apertura de los canales  $K_{Ca}3.1$  está mediada por la calmodulina (CaM) que actúa como receptor de  $Ca^{+2}$  y está unida al extremo carboxilo terminal del canal. Cuando el calcio procedente del retículo endoplásmico (ER) se une a la CaM se produce la activación del canal (Fanger *et al.*, 1999). Además, cuando se activan los linfocitos T (ante la presencia de un antígeno), aumenta la expresión de los canales  $K_{Ca}3.1$  pasando de menos de 20 canales (que posee una célula T en reposo) a aproximadamente 500 canales por célula, sin cambio en la expresión de canales  $K_v1.3$  (Ghanshani *et al.*, 2000).

En la Figura 22 se explica brevemente la influencia de los canales de potasio  $K_v1.3$  y  $K_{Ca}3.1$  en la activación de linfocitos T (Lam *et al.*, 2011).

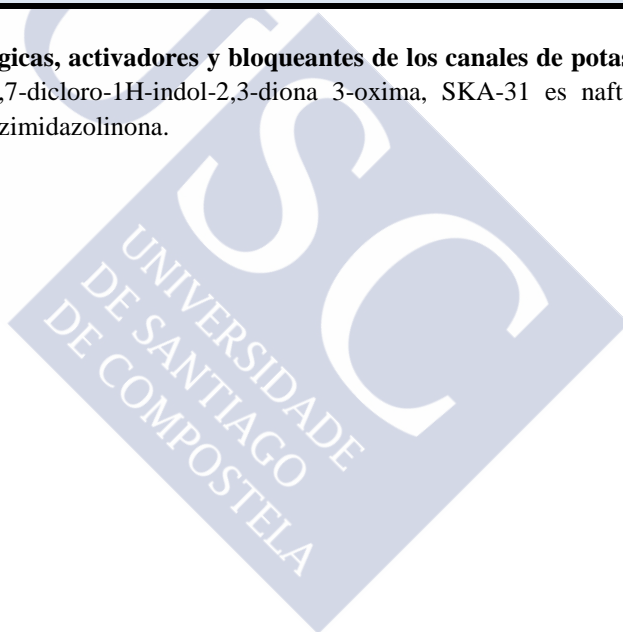


**Figura 22. Canales de potasio  $K_v1.3$  y  $K_{Ca}3.1$  y señalización de calcio durante la activación de células T (Lam *et al.*, 2011).** La presentación del antígeno en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) al complejo receptor-CD3 de células T activa la fosfolipasa C (PLC- $\gamma$ ), la cual produce inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$ ). El IP $_3$  se une al receptor IP $_3$  (IP $_3$ R) en la membrana del retículo endoplásmico (RE), la cual se abre para liberar calcio almacenado en el RE. Cuando la mano EF (motivo estructural de proteínas de unión al Ca $^{+2}$ ) que contiene la molécula de interacción estromal (STIM1, del inglés *stromal interaction molecule*), localizada en la membrana del RE, detecta el vaciamiento de calcio en el RE, se activan los canales CRAC (del inglés *Ca $^{+2}$  release-activated Ca $^{+2}$  channels*) localizados en la membrana celular y la concentración de calcio citosólico aumenta. Posteriormente, se abren los canales  $K_v1.3$  y  $K_{Ca}3.1$  en respuesta a la despolarización de la membrana y al incremento de la concentración de calcio, respectivamente, manteniendo la entrada de calcio a través de los canales CRAC. Por último, el incremento de calcio citosólico activa la fosfatasa calcineurina, dando lugar a la desfosforilación del factor de transcripción nuclear de las células T (NFAT), permitiendo su translocación al núcleo. Esto desencadena la producción de interleuquina 2 (IL-2), la secreción de citoquinas y la proliferación de linfocitos T.

Los bloqueantes clásicos de canales  $K_v$ , TEA y 4-AP, no son específicos para los canales de potasio en linfocitos y por tanto no inhiben su activación. Sin embargo, estos canales son sensibles a una gran variedad de agentes farmacológicos, entre los que se encuentran numerosas toxinas naturales, procedentes principalmente de venenos de escorpiones y arañas (Chandy *et al.*, 2001). Estos compuestos son bloqueantes selectivos de los canales de potasio  $K_v1.3$  y  $K_{Ca}3.1$  y ofrecen una aproximación mucho más selectiva que otros agentes inmunomoduladores. En esta línea, los bloqueantes de los canales  $K_v1.3$  son potencialmente adecuados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, la psoriasis y la artritis reumatoide, mientras que el potencial terapéutico de los bloqueantes de los canales  $K_{Ca}3.1$  se dirige fundamentalmente a patologías como el asma, restenosis, aterosclerosis y fibrosis (Lam *et al.*, 2011). Los bloqueantes selectivos de los canales  $K_v1.3$  disminuyen la entrada de calcio lo que bloquea la activación celular *in vitro* e *in vivo* (Cahalan *et al.*, 1997). En 1989 se descubrió por primera vez que la charibdotoxina, un péptido aislado de veneno de escorpión, bloqueaba los canales de potasio dependientes de voltaje y dependientes de calcio en linfocitos con elevada afinidad (Sands *et al.*, 1989). Esta toxina además reduce la producción de IL-2 y la proliferación de linfocitos a concentraciones en el rango nanomolar (Krasznai, 2005). Con la margatoxina, una toxina de escorpión, se demostró por primera vez que la inhibición de los canales  $K_v1.3$  bloquea la respuesta inmune *in vivo* (Koo *et al.*, 1997). Otras toxinas bloqueantes de los canales  $K_v1.3$  son la calitoxina y la maurotoxina, que actúan bloqueando el poro del canal, y la anatoxina, que bloquea al unirse a los canales  $K_v$  por la parte exterior del poro modificando la dependencia de voltaje del canal. Por otra parte, existen 3 bloqueantes potentes y selectivos de los canales  $K_{Ca}3.1$ , que son las moléculas 1-[(2-Clorofenil)difenilmetil]pirazol (TRAM-34), la acetamida trifenil fluorinada ICA-17043 y la lactona 10 ciclohexadieno (Lam *et al.*, 2011). En la Tabla 4 se resumen las principales funciones fisiológicas de los canales de potasio de linfocitos humanos y se indican los principales activadores y bloqueantes de estos canales.

Canal	Función fisiológica (humanos)	Activadores	Bloqueantes
<b>K<sub>Ca</sub>3.1</b>	Regulación de volumen de eritrocitos y linfocitos, hiperpolarización para facilitar la entrada de calcio durante la proliferación celular, migración celular	NS309, SKA-31, Ca <sup>+2</sup> , EBIO, clorzoxazona, riluzol	TRAM-34, caribdotoxina, clotrimazol, nitrendipina, maurotoxina, ICA-17043, lactona 10 ciclohexadieno
<b>K<sub>v</sub>1.3</b>	En linfocitos T: regulación del potencial de membrana, volumen, señalización de calcio y posiblemente apoptosis. El bloqueo de Kv1.3 inhibe la proliferación de las células T y secreción de citoquinas.	No descritos	Caribdotoxina, margatoxina, maurotoxina, anatoxina

**Tabla 4. Funciones fisiológicas, activadores y bloqueantes de los canales de potasio de linfocitos T humanos.** NS309 es 6,7-dicloro-1H-indol-2,3-diona 3-oxima, SKA-31 es nafto[1,2-d]tiazol-2-ilamina, EBIO es 1-etil-benzimidazolinona.



### 1.3.3 Canales de calcio dependientes de voltaje

Los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_v$ ) se abren en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el espacio extracelular al citosol. Esta entrada suele ser rápida debido al gradiente electroquímico para este ión lo que incrementa la concentración de calcio intracelular hasta el rango micromolar (Wadel *et al.*, 2007). Muchos de estos canales se inactivan rápidamente para limitar el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  y la repolarización de la membrana produce el cierre de los mismos.

Los canales de calcio regulan procesos intracelulares como la contracción, secreción, neurotransmisión y expresión genética. Estos canales ejercen dos funciones importantes para la función neuronal. En primer lugar, están presentes a lo largo de las diferentes partes de una neurona (dendritas, soma y terminales sinápticas) y contribuyen en gran medida a las propiedades electrofisiológicas neuronales. En segundo lugar, el calcio es un segundo mensajero importante en neuronas y la entrada de calcio en la célula (en parte a través de los canales de calcio) regula numerosas funciones fisiológicas, incluyendo la liberación de neurotransmisor, la plasticidad sináptica, el crecimiento de neuritas durante el desarrollo, la expresión génica y la activación de enzimas dependientes de calcio como las proteínas cinasas dependientes de calmodulina 2 (CaMKII) o la proteína cinasa c (PKC) (Clapham, 2007). Una inadecuada expresión o la disfunción de los canales  $\text{Ca}_v$  da lugar a diversas alteraciones neurológicas incluyendo, entre otros, dolor, epilepsia, migrañas y ataxia (Simms *et al.*, 2014).

En función de las características farmacológicas (sensibilidad ante bloqueantes farmacológicos) y electrofisiológicas (cinética de activación e inactivación de los canales  $\text{Ca}_v$ ), se han descrito seis tipos funcionales de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje en neuronas que han sido denominados T (del inglés “tiny” y “transient”), L (del inglés “large” y “long lasting”), N (del inglés “neither” y “neuron specific”), P/Q (“Purkinje”) y R (del inglés “resistant”). Las corrientes resultantes de cada uno de estos canales adoptan el mismo nombre (Simms *et al.*, 2014). Desde un punto de vista funcional, estos canales se clasifican en dos grupos: los canales de umbral de activación bajo conocidos como LVA (del inglés *low*

*voltaje activated*) y los canales de umbral de activación alto denominados HVA (del inglés *high voltaje activated*). Los canales de umbral de activación bajo, también denominados tipo T (transitorios), se activan por pequeñas despolarizaciones desde potenciales muy negativos y se inactivan rápidamente de una forma dependiente de voltaje. Estos canales son insensibles a dihidropiridinas, a los antagonistas de  $\text{Ca}^{+2}$  orgánicos y a la mayoría de los antagonistas de  $\text{Ca}^{+2}$  inorgánicos. Por su baja conductancia y por su corto periodo de apertura, su función está relacionada con el inicio del potencial de acción (Catterall, 2011). Por otra parte, los canales de umbral de activación alto (canales  $\text{Ca}_v$  tipo L, tipo N, tipo P/Q y tipo R) se abren en respuesta a grandes despolarizaciones de la membrana y su función está asociada a la excitabilidad neuronal y a la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (Armstrong *et al.*, 1985; Catterall, 2000).

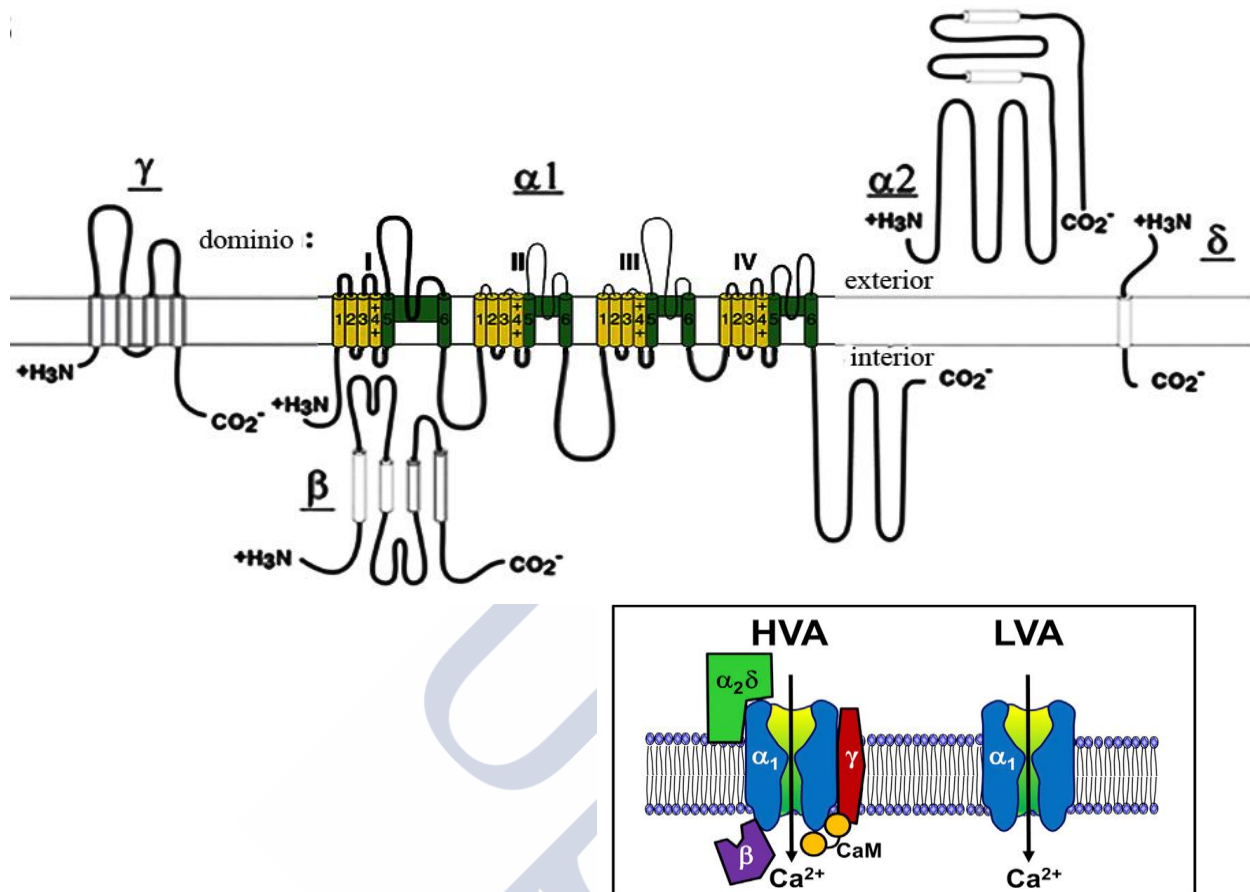
En la Tabla 5 se recogen las principales propiedades farmacológicas, electrofisiológicas y las principales funciones fisiológicas de los canales  $\text{Ca}_v$  (Catterall, 2011).



Canal	Tipo de corriente	Localización	Bloqueantes específicos	Perfil de activación	Perfil de inactivación	CDI	Funciones	Enfermedades asociadas
Ca <sub>v</sub> 1.1	L	Ganglios basales, cerebro (corteza e hipocampo), médula espinal, músculo esquelético, linfocitos	DHP	Alto voltaje	Moderado / lento	Sí	Establecimiento del patrón sináptico neuromuscular, excitación-contracción en músculo esquelético, regulación de la transcripción	Parálisis periódica hipocalémica
Ca <sub>v</sub> 1.2		Cerebro, corazón, células endocrinas, linfocitos, vejiga, útero, estómago, intestino	DHP				Excitación-contracción en corazón y músculo liso, elevación transitoria de Ca <sup>+2</sup> en cuerpos neuronales y dendritas, control de emociones, potenciación a largo plazo en hipocampo, secreción de insulina, función de la vejiga urinaria	Síndrome Timothy: arritmias cardíacas con desarrollos anormales y autismo, angina de pecho, hipertensión arterial, síndrome de Brugada
Ca <sub>v</sub> 1.3		Células endocrinas, soma neuronal y dendritas, corazón, linfocitos	DHP				Secreción endocrina, marcapasos cardíaco, elevación transitoria de Ca <sup>+2</sup> en cuerpos neuronales y dendritas y audición	Bradicardia sinusal, sordera congénita
Ca <sub>v</sub> 1.4		Retina	DHP				Liberación de neurotransmisor en fotorreceptores	Ceguera nocturna estacional
Ca <sub>v</sub> 2.1	N	Terminales nerviosas y dendritas	ω-CTx-GVIA	Alto voltaje	Rápido	Sí/no*	Liberación de neurotransmisor, elevación transitoria de Ca <sup>+2</sup> en dendritas	No descrito
Ca <sub>v</sub> 2.2	P/Q	Terminales nerviosas y dendritas	ω-Agatoxina	Alto voltaje	Moderado / lento	Sí/no	Liberación de neurotransmisor, elevación transitoria de Ca <sup>+2</sup> en dendritas	Migraña hemipléjica familiar, ataxia cerebelar
Ca <sub>v</sub> 2.3	R	Soma neuronal y dendritas	SNX-482	Alto voltaje	Rápido / moderado	No	Disparos repetitivos	No descrito
Ca <sub>v</sub> 3.1	T	Cerebro (cerebelo, tálamo, corteza), ovario, placenta	Ninguno	Bajo voltaje	Muy rápido	No	Regulación de disparos repetitivos neuronales	Crisis de ausencias (epilepsia)
Ca <sub>v</sub> 3.2		Riñón, hígado, corazón, cerebro, pulmón, músculo esquelético, páncreas, placenta					Nocicepción, secreción de aldosterona, dilatación de arterias coronarias	Crisis de ausencias (epilepsia), trastornos neurológicos
Ca <sub>v</sub> 3.3		Cerebro					Regulación de disparos repetitivos neuronales	Crisis de ausencias (epilepsia), trastornos neurológicos

**Tabla 5. Propiedades farmacológicas, electrofisiológicas (Budde *et al.*, 2002), funciones fisiológicas y enfermedades asociadas a los canales de calcio (Catterall, 2011).** Donde CDI es inactivación dependiente de calcio, DHP son dihidropiridinas, ω-CTx-GVIA es ω- conotoxina, SNX-482 es el nombre de una toxina de tarántula. \*Se han descrito diferentes resultados.

En la presente tesis doctoral se evaluó el efecto de diferentes compuestos marinos en los canales de umbral de activación alto (canales HVA). Como se muestra en la Figura 23, estos canales son complejos proteicos heteromultiméricos formados por las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Simms *et al.*, 2014). La subunidad  $\alpha 1$  es la más grande (190-250 kDa) y forma el poro del canal. Esta subunidad da lugar a la diversidad electrofisiológica y farmacológica de los distintos canales  $Ca_v$ , mientras que el resto de subunidades, denominadas auxiliares, modulan las propiedades del canal. Los canales de calcio LVA, en cambio, carecen de las subunidades auxiliares y su estructura está formada solamente por la subunidad  $\alpha 1$ . La secuencia de aminoácidos y estructura transmembrana de la subunidad  $\alpha 1$  es similar a la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio dependientes de voltaje y también se organiza en 4 dominios repetidos (I-IV), cada uno de los cuales contiene 6 segmentos transmembrana (S1-S6) y un bucle entre los segmentos transmembrana S5 y S6. Al igual que en los canales de sodio, los segmentos S4 de cada dominio homólogo funcionan como sensores de voltaje. La subunidad  $\beta$  posee hélices  $\alpha$  pero no segmentos transmembrana, mientras que la subunidad  $\gamma$  es una glicoproteína de cuatro segmentos transmembrana. La subunidad  $\alpha 2$  es una glucoproteína extracelular, unida a la membrana a través de una unión disulfuro con la subunidad  $\delta$ .



**Figura 23. Estructura de los canales de calcio dependientes de voltaje.** Figura adaptada de Catterall 2008 (Catterall *et al.*, 2008) y Simms 2014 (Simms *et al.*, 2014). En la representación esquemática del panel superior e inferior se muestran las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  de los canales HVA. Los números romanos indican los dominios de la subunidad  $\alpha_1$ ; los segmentos 5 y 6 (mostrados en verde) son los segmentos adyacentes al poro y las hélices S4 (amarillo) constituyen los sensores de voltaje. En el panel inferior se muestra la composición de los canales HVA formados por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  y de los canales LVA que sólo poseen la subunidad  $\alpha_1$ .

### *Corrientes de calcio dependientes de voltaje*

Las corrientes de calcio dependientes de voltaje son corrientes de entrada debido a la mayor concentración de iones calcio en el exterior celular que en el interior. Estas corrientes se aíslan con bloqueantes de corrientes que se activan al mismo tiempo que la corriente de calcio, como es el caso de la corriente de sodio y potasio, es decir, para aislar las corrientes de calcio normalmente se emplean

bloqueantes de la corriente de sodio dependiente de voltaje en la solución extracelular como la tetrodotoxina o la saxitoxina y bloqueantes de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, tetraetilamonio y 4-aminopiridina, que se añaden a la solución extracelular. Además, suele emplearse  $Ba^{+2}$  como transportador de carga dado que este ion bloquea los canales de potasio y reduce la inactivación de algunos tipos de canales de calcio. En la Figura 24 se representan los diferentes tipos de corrientes de calcio.

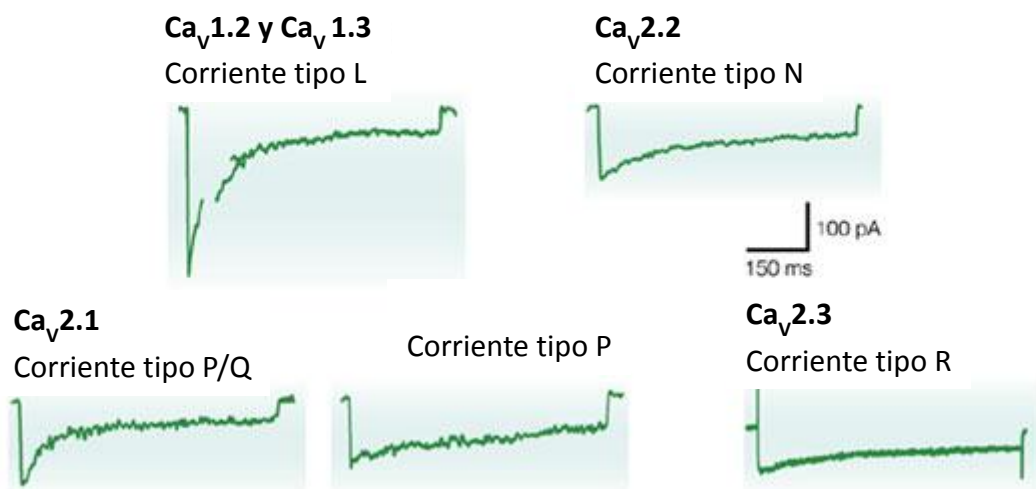
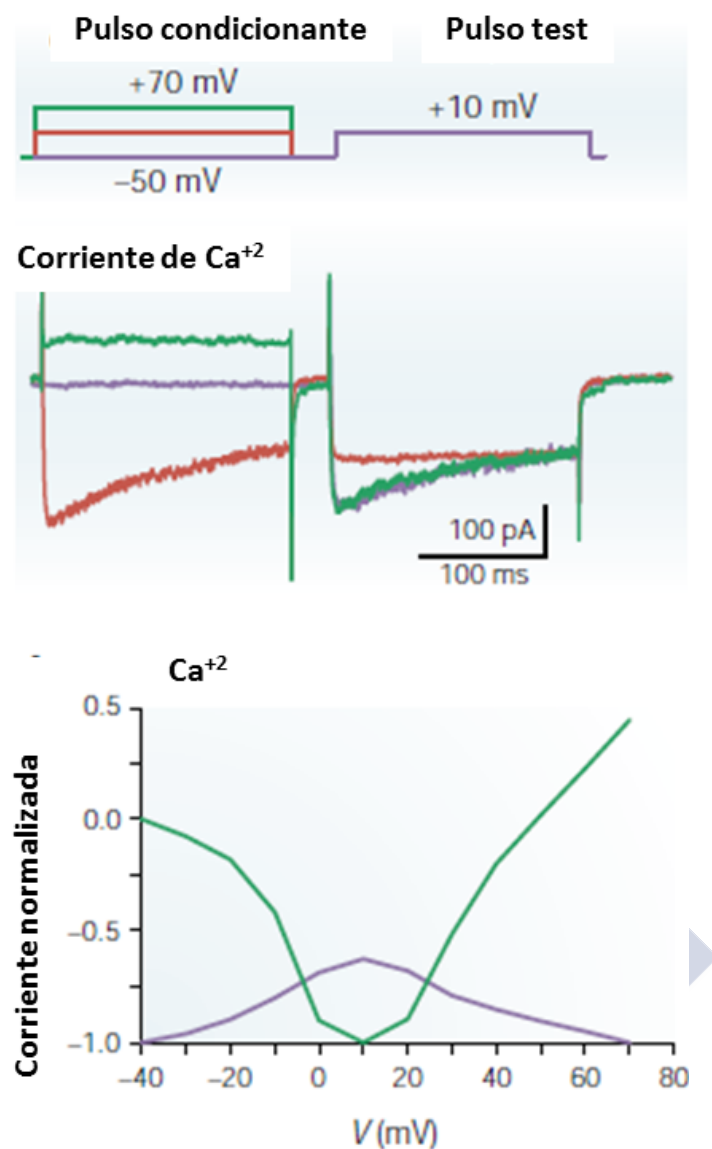


Figura 24. Esquema de las distintas corrientes de calcio activadas por voltaje alto (Budde *et al.*, 2002).

Al igual que los canales  $Na_v$  y  $K_v$ , los canales de calcio dependientes de voltaje presentan mecanismos de inactivación dependientes de voltaje. Además, algunas isoformas de los canales de  $Ca_v$  de umbral de activación alto presentan mecanismos de inactivación dependientes de calcio que están modulados por la subunidad  $\beta$  (Stotz *et al.*, 2004). A diferencia de los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje donde la inactivación se produce mediante el bloqueo del poro (mecanismo de bola y cadena), existe una mayor dificultad para identificar el mecanismo de inactivación dependiente de voltaje en canales de calcio. Sin embargo, recientemente se ha propuesto un modelo en el cual los segmentos S6 se reajustan

estructuralmente en respuesta a una despolarización prolongada de la membrana (Simms *et al.*, 2014). Mucho más comprendida, pero no menos complicada, es la inactivación dependiente de calcio (CDI). La CDI suele ser rápida y resulta en una curva de inactivación en forma de U (Figura 25). Este tipo de inactivación se mide normalmente empleando un protocolo de fijación de voltaje de doble pulso. Este protocolo consiste en un pulso de voltaje condicionante a diferentes potenciales (voltajes), seguido de una breve pausa y un pulso test a un voltaje fijo, que permite inducir la corriente de amplitud máxima y refleja el número de canales que pueden ser activados. Los pulsos condicionantes a potenciales muy positivos o muy negativos originan corrientes de calcio mínimas, dando lugar a corrientes máximas de calcio en el pulso de test. En cambio, cuando en el pulso condicionante se induce una corriente máxima de calcio, en el pulso test se produce una corriente mínima como resultado de la CDI ya que no hay suficiente número de canales susceptibles de abrirse (Budde *et al.*, 2002).





**Figura 25. Propiedades electrofisiológicas de la CDI en canales de calcio dependientes de voltaje (Budde *et al.*, 2002).** Arriba, protocolo de doble pulso empleado y corrientes de calcio inducidas. En este protocolo un pulso de voltaje condicionante a diferentes potenciales es seguido, tras una breve pausa, de un pulso test a un voltaje fijo. El voltaje del pulso test es un valor establecido para inducir la mayor amplitud de la corriente. Un pulso condicionante de un valor próximo o mayor que el potencial de reversión del calcio da lugar a una amplitud máxima de la corriente de calcio durante el pulso test (registro verde). Igualmente, se puede obtener una amplitud máxima de la corriente de calcio durante el pulso test a partir de un pulso condicionante de -50 mV, donde casi todos los canales de Ca<sup>+2</sup> están cerrados (registro azul). Por el contrario, un pulso condicionante que desencadena una corriente máxima de calcio, da lugar a una corriente pequeña durante el pulso test (registro rojo) debido a la CDI. Abajo, la amplitud de la corriente test típicamente aparece en forma de U (línea verde) mientras que la amplitud del pulso condicionante aparece en forma de U invertida (línea morada) cuando se representa en función del voltaje del pulso condicionante en un gráfico corriente-voltaje.

## 1.4 Técnicas electrofisiológicas

En este trabajo se han empleado técnicas electrofisiológicas para evaluar el efecto de diferentes compuestos de origen marino en canales iónicos y en la actividad espontánea neuronal. En términos generales, las técnicas electrofisiológicas tienen como objetivo cuantificar los movimientos eléctricos asociados al funcionamiento de células, tejidos u órganos. En estas técnicas, el contacto de un microelectrodo relleno de una solución electrolítica con una célula permite la determinación del potencial o de las corrientes iónicas cuando el electrodo se conecta a un voltímetro o a un amperímetro.

El desarrollo de las técnicas electrofisiológicas ha avanzado mucho desde el siglo XIX, cuando se demostró por primera vez que los fenómenos eléctricos formaban parte de la fisiología animal (Molleman, 2003). En 1952 Hodgkin y Huxley fueron capaces de medir el potencial de membrana en el axón gigante de calamar (Hodgkin y Huxley, 1939; Curtis y Cole 1940). En 1976 Neher y Sakmann introdujeron la variante electrofisiológica de patch clamp. Ellos emplearon también microelectrodos y fijación de voltaje, pero mejoraron la técnica empleando pipetas con extremos largos que no penetraban en la célula sino que formaban un contacto muy fuerte con la membrana celular. Sakmann y Neher recibieron el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en el año 1991. Desde entonces ha habido un continuo desarrollo de protocolos y técnicas de análisis, como la introducción del patch clamp perforado o el patch clamp en rodajas de cerebro.

A continuación se describen las bases fisiológicas sobre las que se asientan las técnicas electrofisiológicas del patch clamp así como los conceptos más relevantes de esta técnica.

### *Propiedades eléctricas de la membrana celular*

La membrana plasmática celular actúa como barrera entre el citoplasma y el medio extracelular generando una distribución iónica diferente entre el medio intra- y

extracelular (Tabla 6), que es bastante constante entre los diferentes tipos celulares, órganos e incluso especies animales.

Ión	Concentración intracelular (mM)	Concentración extracelular (mM)
Na <sup>+</sup>	5-20	130-160
K <sup>+</sup>	130-160	4-8
Ca <sup>+2</sup>	0.05-1	1.2-4
Mg <sup>+2</sup>	10-20	1-5
Cl <sup>-</sup>	1-60	100-140
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1-3	20-30

**Tabla 6. Distribución intracelular y extracelular de los principales iones en células animales (Molleman, 2003).**

Los fenómenos eléctricos en los sistemas biológicos están mediados por el movimiento de iones entre el medio intracelular y el medio extracelular, y viceversa, a través de la bicapa lipídica de la membrana celular, que funciona como un aislante impidiendo el movimiento libre de estas partículas cargadas eléctricamente. Sin embargo, este aislamiento no es perfecto ya que la membrana celular presenta canales iónicos, transportadores, y existen algunas pérdidas de corriente. La distribución desigual de iones a través de la membrana celular genera un potencial eléctrico en todas las células que se denomina potencial de membrana. En células en reposo, este potencial es negativo debido a que la membrana celular posee más canales permeables al K<sup>+</sup> que al Na<sup>+</sup> y por tanto se produce un mayor movimiento iónico de los iones K<sup>+</sup> desde el interior celular al espacio extracelular dejando un exceso de cargas negativas en el interior celular (Lodish *et al.*, 2000). Sin embargo, esta negatividad del potencial de membrana puede disminuir (hacerse más positivo o despolarizado) o aumentar (hacerse más negativo o hiperpolarizado) y como se explicó en la Figura 17, la despolarización de la membrana celular, tras la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje, genera potenciales de acción en células excitables

La membrana plasmática se asemeja a un circuito eléctrico. Simplificando, los canales iónicos equivaldrían al “cable metálico” por donde circula la corriente eléctrica que equivaldría al flujo de iones. Para comprender la membrana celular

desde un punto de vista electrofisiológico a continuación se revisan algunos conceptos (Tabla 7).

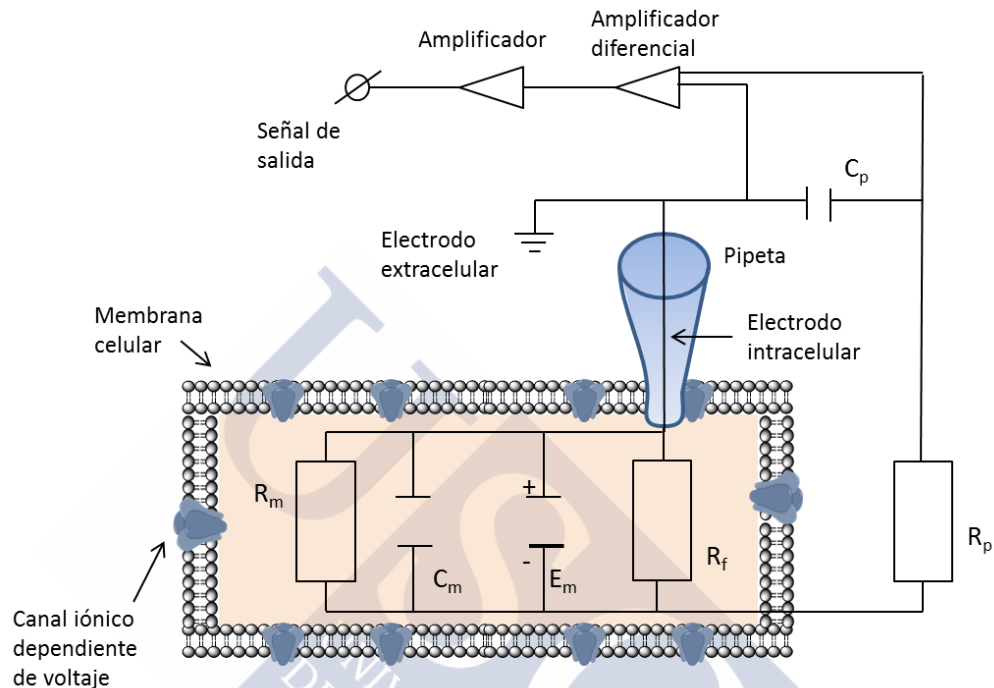
Parámetro	Unidad	Definición
<b>Carga (Q)</b>	Culombio (C)	Propiedad física de los iones que se manifiesta mediante fuerzas de atracción y repulsión entre ellos. Los protones son iones con carga positiva y los electrones son iones con carga negativa.
<b>Corriente (I):</b>	Amperio (A)	Flujo de carga por unidad de tiempo ( $dQ/dt$ ).
<b>Resistencia (R)</b>	Ohmio ( $\Omega$ )	Resistencia de membrana ( $R_m$ ): es la resistencia generada por los impedimentos que se encuentran los iones al atravesar la membrana plasmática. Resistencia de la pipeta ( $R_p$ ): es la resistencia que se genera cuando el pequeño diámetro de la punta de la pipeta entra en contacto con la membrana celular. Resistencia de fuga ( $R_f$ ): se introdujo dado el daño que supone el microelectrodo a la membrana plasmática, creando un pequeño circuito entre el citosol y la tierra (electrodo presente en el baño extracelular).
<b>Potencial de membrana (<math>V_m</math> o <math>E_m</math>)</b>	Voltio (V)	Es la diferencia de carga eléctrica a ambos lados de la membrana.
<b>Capacitancia de la membrana (<math>C_m</math>)</b>	Faradai (F)	Es la capacidad de la membrana para almacenar carga.
<b>Conductancia iónica (g)</b>	Siemens (S)	Es la facilidad de los iones para moverse de un lado a otro de la membrana. Es inversamente proporcional a la $R_m$ ( $g = 1/R_m$ )

Tabla 7. Parámetros eléctricos de la membrana celular.

### *La técnica del "patch clamp"*

Desde hace décadas, el método empleado para estudiar las propiedades electrofisiológicas de las membranas biológicas y de las corrientes iónicas es la técnica de patch clamp. Inicialmente esta técnica fue desarrollada con el objetivo de registrar la corriente que pasaba a través de cada canal iónico individual presente en un "trozo" de membrana celular, denominado patch. Sin embargo, posteriormente se demostró su utilidad para el registro de corrientes macroscópicas. La combinación de esta técnica con manipulaciones farmacológicas o sustituciones iónicas permite alterar los componentes citoplasmáticos y aislar en una célula las corrientes de membrana asociadas a un determinado ión. Sin embargo, los iones son partículas que no fluyen con facilidad a través de la membrana ya que en su camino se encuentran

con resistencias, que en un contexto electrofisiológico son la  $R_m$ , la  $R_p$  y la  $R_f$ , principalmente. En la Figura 26 se muestra un esquema de un registro electrofisiológico intracelular.

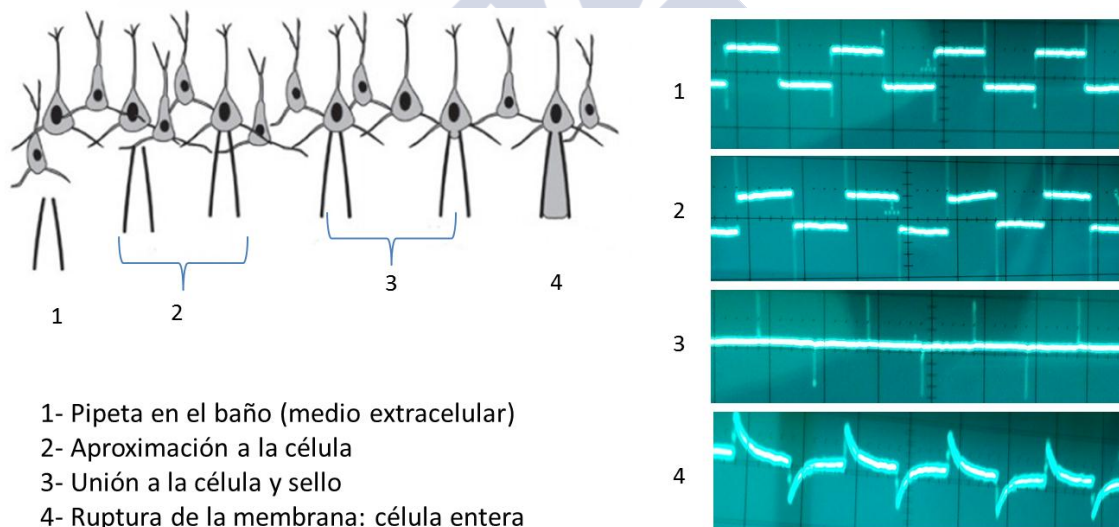


**Figura 26. Esquema de un circuito electrofisiológico.**

A continuación se explica de un modo simplificado, cómo se lleva a cabo la técnica de patch clamp.

Fundamentalmente, la técnica de patch clamp consiste en colocar una pipeta (o electrodo de registro) sobre la membrana celular y aplicar una pequeña presión negativa (mediante succión) a la pipeta para conseguir un contacto lo más estrecho posible entre la membrana y la pipeta, que se denomina sello. En la Figura 27 se muestran los pasos necesarios para la obtención del sello y la configuración de célula entera (que se explica más adelante) así como la evolución de la resistencia de la membrana en dicho proceso. Como se muestra en el paso 1, cuando la punta de la pipeta se sumerge en la solución extracelular, la corriente del pulso test que se aprecia en el osciloscopio (derecha de la imagen) permite medir la resistencia de la pipeta. Posteriormente, cuando la punta de la pipeta se posiciona cerca de la célula que se

quiere estudiar (paso 2), el pulso test del osciloscopio refleja un aumento de resistencia al encontrarse la punta de la pipeta obstruida por la superficie celular. Más tarde se realiza el sello (paso 3), mediante la unión espontánea de la punta de la pipeta con la célula o aplicando de nuevo una ligera presión negativa mediante succión. Esto se refleja en el osciloscopio por una ausencia de corriente en el pulso test, lo que indica un aumento de resistencia, que idealmente debería ser igual o mayor a 1 gigaohmio ( $G\Omega$ ). Finalmente, en el caso de la modalidad de célula entera (paso 4), se necesita romper el trozo de membrana que está en contacto con la pipeta para lo que, normalmente, se realiza una succión de nuevo. Una vez rota la membrana, la solución de la pipeta entra en contacto directo con el citoplasma. Una ruptura correcta se refleja en el osciloscopio por un aumento en la corriente del pulso test, ya que suele aparecer una señal alargada que está formada por la capacitancia de la membrana, la resistencia de la pipeta, la resistencia de la membrana y la resistencia de acceso (Molleman, 2003).



**Figura 27. Representación esquemática de las fases necesarias para conseguir la ruptura de la membrana en el modo célula entera (izquierda) y de la evolución de la resistencia de la membrana durante ese proceso (derecha).**

El descubrimiento de que una succión suave conseguía establecer un sello con una resistencia de un gigaohmio (Sigworth *et al.*, 1980), denominado un gigasello, fue el inicio de grandes mejoras en la calidad de los registros de patch clamp y de la expansión de la técnica. Desde entonces se han descrito diferentes modalidades de la técnica de patch clamp que permiten el estudio de diferentes aspectos de la membrana, que se describen a continuación (Molleman, 2003) y que se representan en la Figura 28:

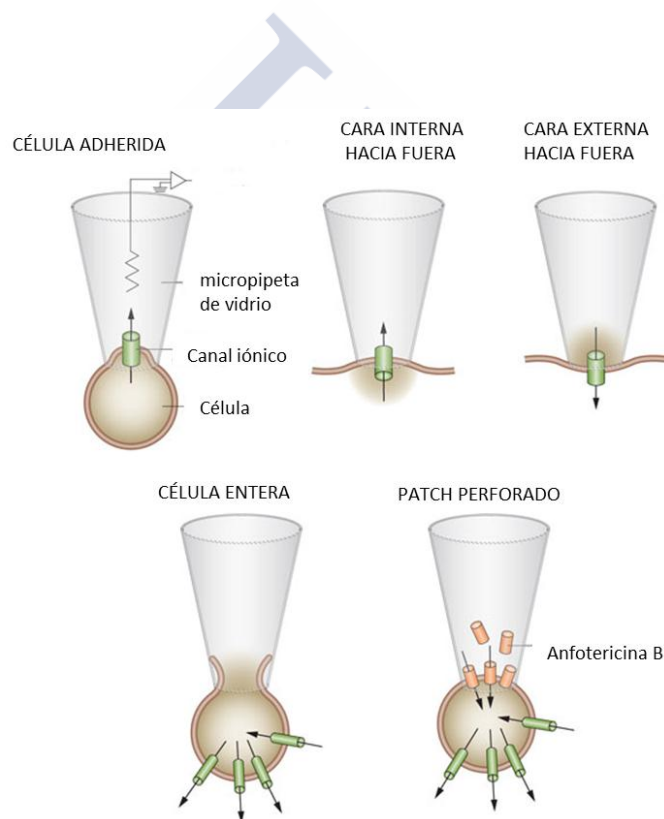
**-Célula adherida:** se obtiene mediante una fuerte conexión entre la punta de la pipeta de vidrio y la membrana celular, lo que origina un sello de elevada resistencia (tal y como comienzan todos los experimentos de patch-clamp).

**-Célula entera:** se obtiene mediante la ruptura del fragmento de membrana adherido a la punta de la pipeta (patch) consiguiendo que la solución del interior de la pipeta entre en contacto directo con el citoplasma celular, lo que produce diálisis entre la solución de la pipeta y el contenido intracelular. Esta configuración permite que el potencial de membrana se pueda medir directamente.

**-Célula perforada:** se utilizan agentes perforadores (gramicidina, anfotericina B y nistatina principalmente) en la solución de la pipeta. Estos agentes realizan pequeños poros en la membrana plasmática permitiendo el paso selectivo de iones. Esta configuración permite mantener prácticamente intacto el contenido intracelular.

**-Configuración cara externa hacia fuera (outside-out):** cuando el trozo de la membrana que está en la punta de la pipeta está roto (célula entera), se puede separar el electrodo y debido a las características de los fosfolípidos, estos se pliegan sobre sí mismos cubriendo la punta de la pipeta, de forma que un pequeño trozo de membrana con su cara externa hacia afuera queda unido a la pipeta. Para que se establezca una situación fisiológica, la solución del interior de la pipeta ha de ser lo más parecida posible al contenido iónico intracelular, ya que se pone en contacto con el lado intracelular de la membrana. Este tipo de configuración se utiliza para el estudio de los efectos de los factores extracelulares en los canales, ya que la composición de la solución extracelular presente en el baño se puede modificar fácilmente durante el experimento.

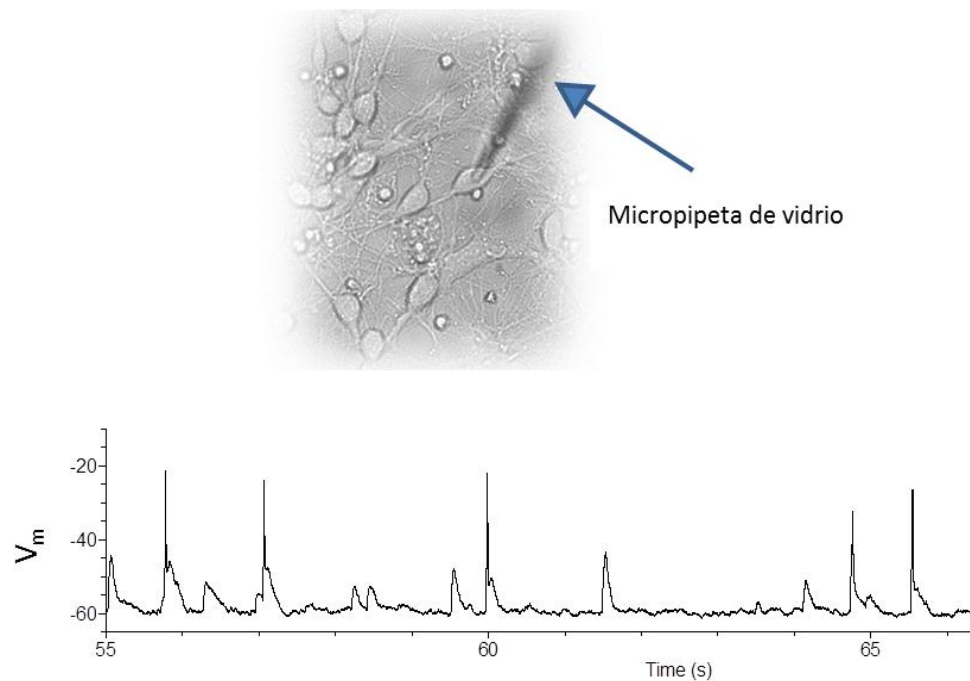
**-Configuración cara interna hacia fuera (inside-out):** se obtiene a partir de la situación de célula adherida, donde, al igual que en la configuración anterior, la pipeta se separa de la célula, de tal forma que se crea una vesícula de parte de la membrana celular que queda unida a la punta de la pipeta. Esta vesícula se puede romper con la exposición al aire, quedando un trozo de membrana unido a la pipeta, pero en este caso con su cara interna hacia afuera. Este tipo de configuración es ideal para el estudio de los efectos de factores citosólicos en los canales. Sin embargo, esta configuración es mucho más complicada para trabajar que la anterior, ya que para su obtención se necesita un paso adicional, la destrucción de la vesícula, y en cada experimento la solución extracelular ha de ser sustituida por la solución intracelular.



**Figura 28. Configuraciones de patch clamp.** Figura modificada de Ashcroft & Rorsman, 2013 (Ashcroft *et al.*, 2013).

Aunque la mayoría de los experimentos de patch clamp son experimentos de fijación de voltaje en los cuales se registra la corriente manteniendo el voltaje constante, existe otra variante denominada *fijación de corriente* que consiste en registrar las variaciones de voltaje manteniendo fija la corriente de membrana. Esta modalidad se emplea normalmente para controlar la calidad y estabilidad del sello y

de la célula una vez que se consigue acceso al citoplasma y además permite medir el potencial de membrana y la actividad espontánea así como el registro de potenciales de acción. En el presente trabajo se emplearon ambas modalidades en la configuración de célula entera. En la Figura 29 se muestra una imagen de la técnica de patch clamp en uno de los experimentos de esta tesis, así como un registro de la actividad espontánea neuronal en modo de fijación de corriente.



**Figura 29. Experimento de patch clamp en el modo de célula entera.** Arriba se muestra la micropipeta de vidrio en contacto con una neurona. Abajo se muestra un registro en modo de fijación de corriente, en el que se aprecia la actividad espontánea neuronal.

### 1.5 Neurotransmisión y plasticidad sináptica

El cerebro humano está compuesto por billones de neuronas, cada una de ellas formando hasta 100.000 conexiones sinápticas, lo que lo convierte en el sistema más complejo conocido hasta la fecha. Con el fin de almacenar información y adaptarse a cambios en el ambiente, el cerebro es una estructura plástica que está continuamente sufriendo modificaciones. Dado que una parte de la presente tesis doctoral está dirigida al estudio del efecto de la ciguatoxina sobre la transmisión y plasticidad sináptica neuronal, es necesario comprender cómo funciona un sistema neuronal y qué repercusiones, a nivel funcional, cabe esperar de las alteraciones de la actividad inducidas por la administración de compuestos activadores de canales de sodio. Dado que la transmisión sináptica está regulada por 2 efectos opuestos, la excitación y la inhibición neuronal, en esta sección se describirán los conceptos más relevantes de los receptores de neurotransmisor más abundantes en el sistema nervioso central (SNC), receptores de glutamato y receptores del ácido  $\gamma$  aminobutírico (GABA), responsables de la excitación y de la inhibición neuronal, respectivamente. Posteriormente, se abordará el concepto de homeostasis neuronal, que, en términos generales, es un proceso que trata de estabilizar la actividad de un circuito neuronal ante diferentes perturbaciones.

#### *Excitación neuronal y receptores de glutamato*

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC, donde participa en la regulación de la memoria, la actividad sináptica, la plasticidad y la supervivencia celular. El glutamato produce sus efectos fisiológicos al interactuar con receptores específicos localizados en la membrana neuronal. Tres de los receptores glutamatérgicos son canales iónicos regulados por ligando denominados receptores ionotrópicos, mientras que otros tres tipos, denominados receptores metabotrópicos de glutamato son receptores acoplados a proteínas G (Traynelis *et al.*, 2010).

La unión del glutamato a receptores ionotrópicos produce la apertura del canal con el consiguiente paso de iones (estos receptores son permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{K}^+$ ) provocando la despolarización de la membrana. Existen varios tipos de

receptores ionotrópicos de glutamato que se clasifican según los agonistas específicos que los activan:

- Receptores NMDA, activados por N-metil-D-aspartato (NMDA).
- Receptores AMPA, activados por Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA).
- Receptores cainato, activados por ácido caínico.

A continuación se describen las características de los principales receptores de glutamato involucrados en la plasticidad sináptica del SNC, los receptores NMDA y los receptores AMPA.

### **Receptores NMDA**

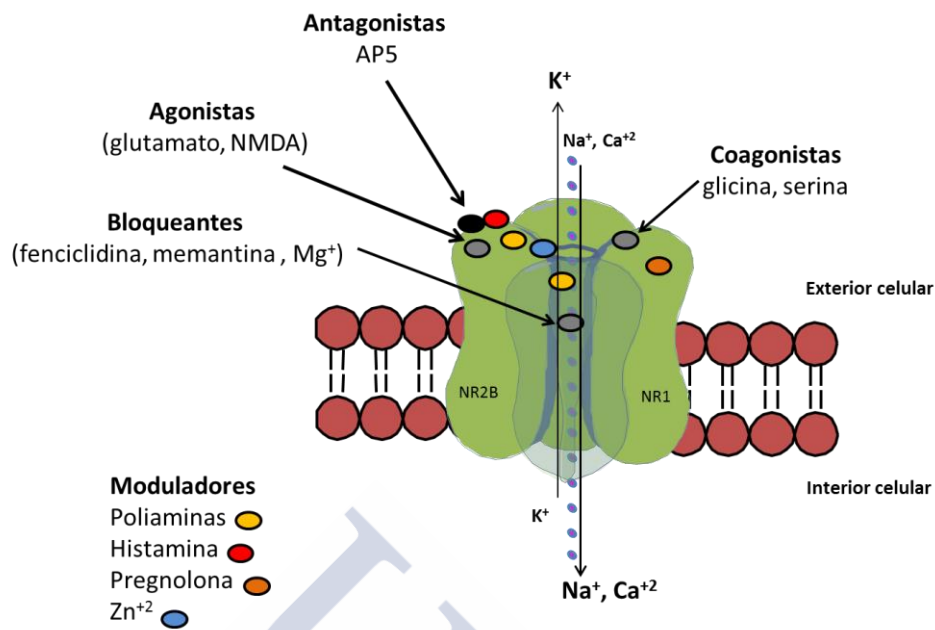
Los receptores NMDA son proteínas transmembrana compuestas por diferentes combinaciones de cuatro subunidades denominadas NR1, NR2A-2D y NR3A-3B, cuyo ensamblaje forma un poro iónico o canal central. La subunidad NR1 posee todas las propiedades necesarias para constituir un canal funcional y confiere al receptor las propiedades de activación/inactivación, interacción con fármacos y sensibilidad al pH (Traynelis *et al.*, 2010). Distintas combinaciones de la subunidad NR1 con las otras subunidades dan lugar a receptores NMDA con propiedades funcionales diferentes. Las cuatro variantes de la subunidad NR2 también participan en la regulación y en la función del canal. Mientras que la subunidad NR2A está ampliamente distribuida por el cerebro, la NR2B se expresa más en el proencéfalo, la NR2C en el cerebelo y la NR2D en el tálamo (Buller *et al.*, 1994). Las subunidades NR3 están distribuidas por todo el SNC.

Los receptores NMDA presentan dos peculiaridades que los distinguen del resto de canales dependientes de ligando. En primer lugar, la actividad de estos receptores está regulada por múltiples ligandos y para que el canal se abra necesita, además de glutamato, la presencia de un coagonista (principalmente glicina, serina o alanina). Ciertas poliaminas y la histamina modulan positivamente el canal, mientras que el  $Zn^{+2}$  o la pregnolona lo modulan negativamente (Traynelis *et al.*, 2010). En segundo lugar, los receptores NMDA comparten características funcionales con los

canales sensibles a voltaje. En esta línea, los receptores NMDA en estado de reposo están cerrados por la presencia de iones magnesio en el poro del canal y para su activación se necesita (además de la unión de glutamato y coagonistas) la despolarización celular para retirar el  $Mg^{+2}$  y así desbloquear el poro del canal. En condiciones fisiológicas, el  $Mg^{+2}$  es retirado tras la activación de otros receptores glutamatérgicos como AMPA y cainato (Mayer *et al.*, 1984).

Los receptores de NMDA presentan una permeabilidad muy elevada al  $Ca^{+2}$  por lo que su activación permite un rápido influjo de  $Na^{+}$  y también de  $Ca^{+2}$  (además de una salida de  $K^{+}$ ). Ésto dispara una cascada de segundos mensajeros que dan lugar a acciones muy diversas, por lo que estos receptores están implicados en numerosas funciones dentro del sistema nervioso como la memoria y el aprendizaje (Fan *et al.*, 2014). La sobreactivación de los receptores NMDA puede producir disfunción neuronal debido a un aumento excesivo de calcio intracelular, dando lugar a muerte neuronal por excitotoxicidad (Zorumski *et al.*, 2012), mientras que un bloqueo excesivo de estos canales también produce daño neuronal (Collingridge *et al.*, 1995). Los receptores NMDA están implicados en diversas patologías neurológicas tales como epilepsia, trastornos del comportamiento (Ghasemi *et al.*, 2014) y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Paoletti *et al.*, 2013).

En la Figura 30 se muestra una representación esquemática de la estructura de los receptores NMDA, los ligandos más importantes que regulan estos canales y el flujo de iones a través de estos canales.



**Figura 30. Representación esquemática de la estructura del receptor NMDA, moléculas que lo regulan y flujo de iones.**

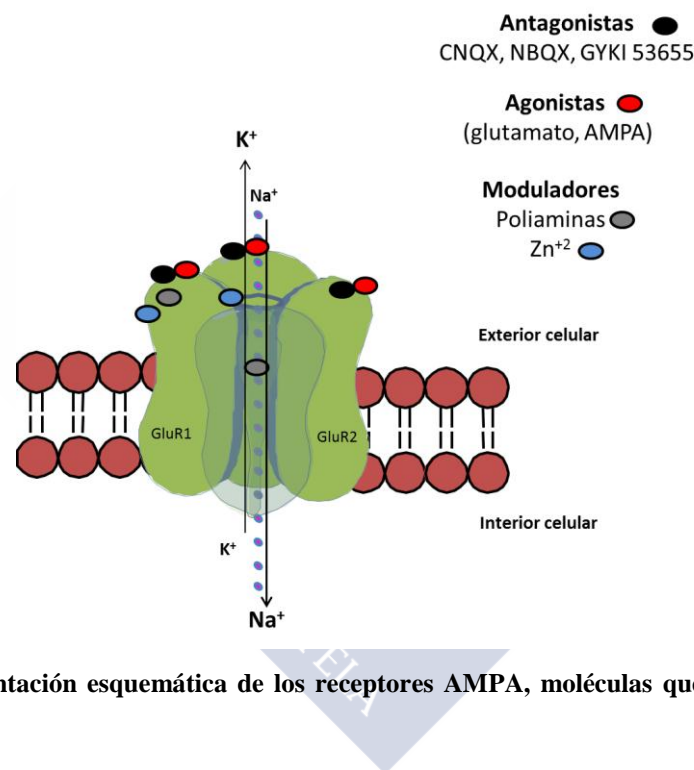
### Receptores AMPA

Los receptores AMPA son proteínas tetraméricas formadas por diferentes combinaciones de 4 subunidades denominadas GluR1-GluR4. Cada una de estas subunidades está formada por unos 900 aminoácidos y tiene un peso molecular de unos 105 kDa (Rogers *et al.*, 1991). Mientras que las subunidades GluR1, GluR2 y GluR3 son abundantes en el SNC (principalmente en hipocampo, cortex, septo lateral, ganglio basal y amígdala), la expresión de las subunidades GluR4 es baja en la mayor parte del SNC salvo en el cerebelo y en el núcleo talámico reticular (Palmer *et al.*, 2005). Las principales enfermedades de naturaleza neurológica asociadas a los receptores AMPA son la epilepsia, el retraso mental, la esquizofrenia y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y el Parkinson (O'Neill *et al.*, 2004).

Al igual que los receptores NMDA, los receptores AMPA son permeables al  $Na^{+}$  y  $K^{+}$  en respuesta a la unión del ligando, principalmente glutamato y AMPA. Sin embargo, la permeabilidad al  $Ca^{+2}$  solo se ha detectado en receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2 (Isaac *et al.*, 2007). Entre los antagonistas

competitivos de los receptores AMPA se encuentran algunas quinoxalinodionas, como la 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) que actúa en las subunidades GluR1 y GluR2 y la 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(f)quinoxalina-2,3-diona (NBQX) que actúa en todas las subunidades del receptor AMPA al igual que el antagonista no competitivo GYKI53655. Además, el  $Zn^{+2}$  y las poliaminas actúan modulando negativamente los receptores AMPA (Traynelis *et al.*, 2010).

En la Figura 31 se muestra una representación esquemática de la estructura de los receptores AMPA, los ligandos más importantes que regulan estos canales y el flujo de iones a través de estos canales.

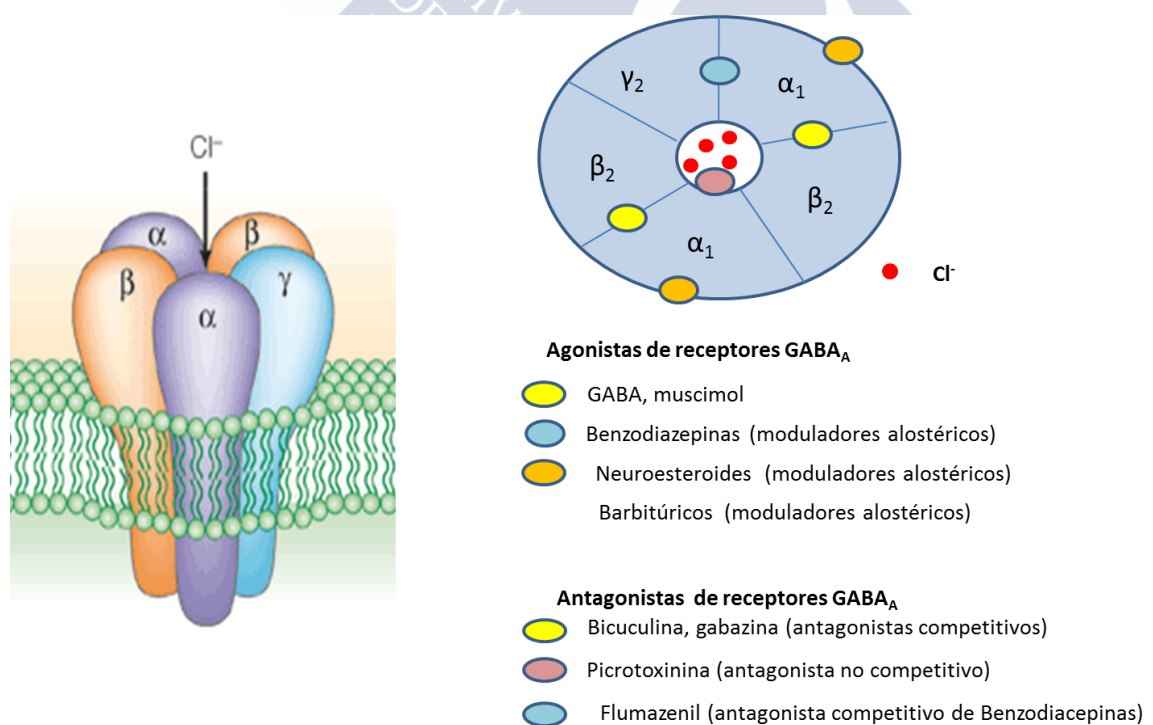


**Figura 31. Representación esquemática de los receptores AMPA, moléculas que los regulan y flujo de iones.**

### *Inhibición neuronal y receptores GABA*

La inhibición neuronal en el SNC está principalmente mediada por el ácido  $\gamma$  aminobutírico (GABA) que, tras la unión a sus receptores, desencadena un aumento en el flujo de aniones ( $Cl^-$ ) al interior celular (Smart *et al.*, 2012). Esta entrada de  $Cl^-$  produce hiperpolarización, lo que disminuye la probabilidad de generación de potenciales de acción causando inhibición neuronal (Sankar, 2012).

Existen 3 tipos de receptores GABA en el SNC denominados GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. Estos tipos de receptores presentan diferentes propiedades farmacológicas, bioquímicas y electrofisiológicas. Mientras que los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> son receptores ionotrópicos operados por ligando, los receptores GABA<sub>B</sub> son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Los receptores GABA<sub>A</sub> son los receptores de neurotransmisores inhibitorios más importantes del cerebro de mamíferos. Estructuralmente, los receptores GABA<sub>A</sub> son pentámeros formados por el ensamblaje de diferentes combinaciones de cuatro tipos de subunidades. En mamíferos se han descrito las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\rho$ ,  $\Theta$  y  $\pi$ . La mayoría de receptores GABA<sub>A</sub> contienen las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  que en el cerebro humano adulto presentan una estequiometría  $(\alpha_1)_2(\beta_2)_2(\gamma_2)_1$  (Belelli *et al.*, 2005). En la Figura 32 se muestra la estructura de los receptores GABA<sub>A</sub> así como una representación esquemática de los sitios de unión de diversos ligandos que modulan estos receptores positivamente (agonistas) o negativamente (antagonistas) (Makkar *et al.*, 2010) entre los que se encuentran una gran variedad de fármacos de uso clínico como las benzodiazepinas, los barbitúricos y los anestésicos intravenosos e inhalatorios.



**Figura 32. Representación esquemática del receptor GABA<sub>A</sub>, moléculas que lo modulan y flujo de iones.**

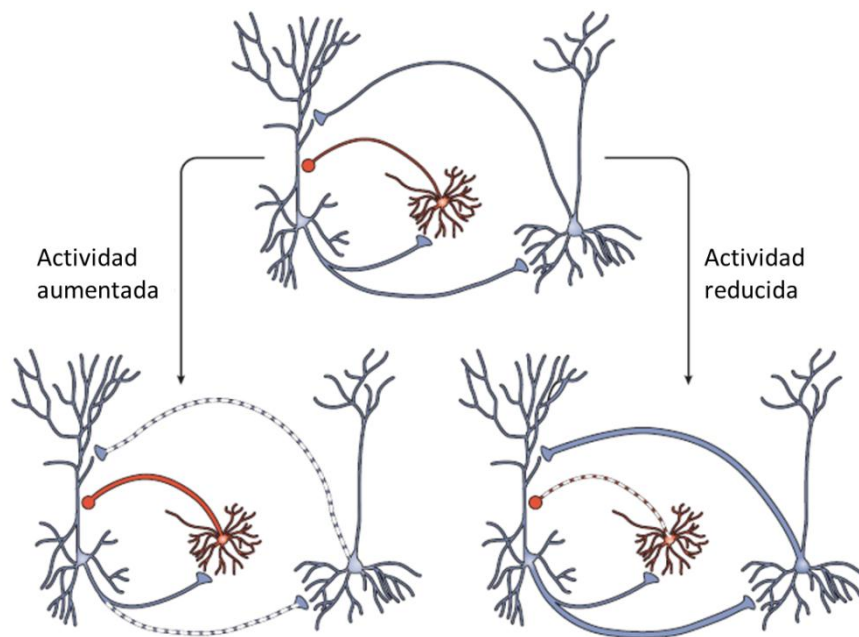
### *Plasticidad sináptica*

El sistema nervioso está sujeto a dos requerimientos completamente opuestos, la necesidad de cambio y la necesidad de estabilidad (Turrigiano, 1999). La necesidad de cambio se manifiesta por la variación en el número y magnitud (de aquí en adelante la magnitud se denominará fuerza) de las conexiones sinápticas en respuesta a estímulos extrínsecos (como cambios en la actividad neuronal), lo que permite a los circuitos neuronales irse redefiniendo con el paso del tiempo (Shatz, 1990; Stent, 1973). Durante el tiempo de vida de una neurona, sus propiedades eléctricas, morfológicas y sinápticas fluctúan constantemente; las neuronas crecen, cambian de forma, pierden y ganan sinapsis, y están sometidas a un continuo reciclaje de canales iónicos que determina las propiedades eléctricas y de disparo neuronal. Aún en ese escenario de continuas variaciones, dada la necesidad de estabilidad, las neuronas son capaces de mantener unas propiedades eléctricas relativamente constantes a lo largo del tiempo gracias a los mecanismos de plasticidad sináptica.

La plasticidad sináptica del sistema nervioso central supone un mecanismo celular para múltiples funciones cerebrales, tales como el aprendizaje, la memoria, la adicción a las drogas y el dolor persistente (Malenka *et al.*, 2004; Nestler, 2005; Zhuo, 2005). En las últimas décadas se han descrito varias teorías de plasticidad sináptica; una de las más estudiadas es la plasticidad Hebbiana, que nació en la década de 1940 cuando el neurocientífico canadiense Donald Hebb propuso, por primera vez, que las neuronas reforzaban su comunicación si la célula presináptica estimulaba de un modo continuo a la célula postsináptica. Según este modelo, la actividad neuronal tiene un papel importante en definir las conexiones sinápticas durante el desarrollo neuronal, en gran medida a través de los mecanismos de potenciación y depresión a largo plazo, LTP y LTD respectivamente. Estos modelos experimentales se caracterizan por un incremento (LTP) o una disminución (LTD) continuo y a largo plazo de la actividad sináptica entre dos neuronas adyacentes tras una estimulación (eléctrica o química) repetitiva (Collingridge *et al.*, 2004; Collingridge *et al.*, 2010; Malenka *et al.*, 2004). Sin embargo, la plasticidad Hebbiana es una teoría que resulta insuficiente para explicar el desarrollo neuronal

que depende de la actividad, ya que tanto la LTP como la LTD son procesos de retroalimentación positiva que tienden a desestabilizar la actividad de los circuitos neuronales, potenciándolos o deprimiéndolos sostenidamente (Lee *et al.*, 2014), lo cual desencadena estados de hiperexcitabilidad neuronal (epilepsia) o de inactividad neuronal, respectivamente (Kriegstein, 1987).

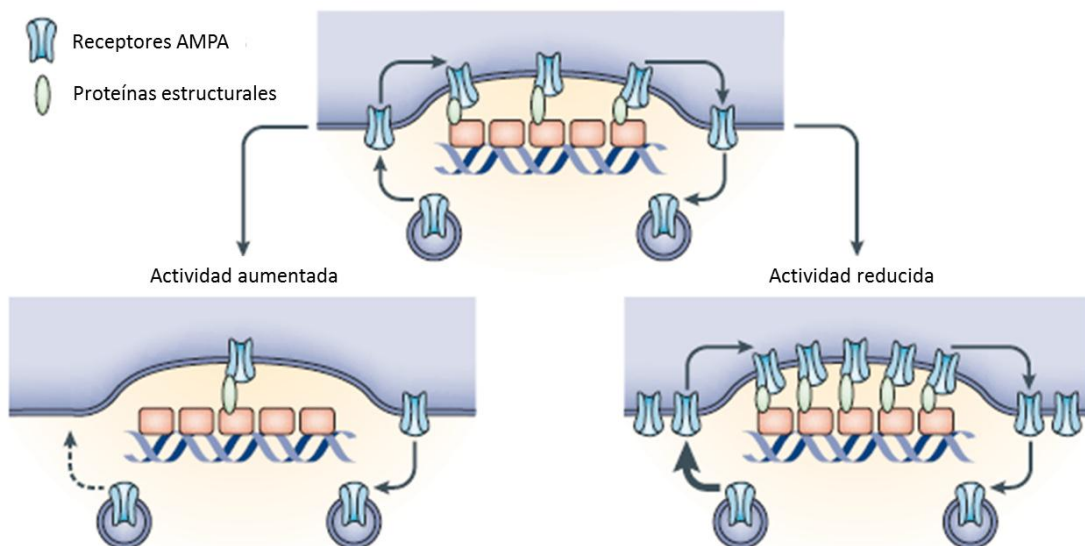
En cambio, la teoría de la plasticidad homeostática o equilibrio sináptico, surgida en los últimos años, funciona de forma compensatoria induciendo mecanismos de retroalimentación negativa con el objetivo de mantener la estabilidad del sistema neuronal (Turrigiano, 2008). Esta teoría explica cómo los circuitos neuronales consiguen una estabilidad tras perturbaciones en la actividad neuronal (Lee *et al.*, 2014) y sostiene que una neurona ajusta sus sinapsis excitadoras e inhibitorias aumentándolas o disminuyéndolas en respuesta a la actividad neuronal para regular la fuerza sináptica y estabilizar el disparo neuronal (Turrigiano, 2008). En la plasticidad homeostática, la regulación de la inhibición y la excitación neuronal, desencadenada por los cambios en la actividad neuronal, se produce en direcciones opuestas (Turrigiano *et al.*, 2004). Así, como se muestra en la Figura 33, cuando la actividad disminuye (por alguna alteración externa), la respuesta excitadora entre neuronas aumenta y la retroalimentación inhibitoria disminuye, lo cual debería aumentar los potenciales de acción espontáneos. En cambio, cuando aumenta la actividad, la respuesta excitadora entre neuronas disminuye y la inhibición aumenta devolviendo la actividad neuronal a niveles basales (Turrigiano *et al.*, 2004).



**Figura 33. Regulación homeostática del equilibrio entre excitación e inhibición en redes neuronales.** La actividad en las redes corticales está regulada por el equilibrio entre la excitación y la inhibición. Las neuronas piramidales (azules) envían señales excitatorias a otras neuronas piramidales, y también a neuronas inhibitorias (rojas). Estas neuronas inhibitorias en cambio devuelven la señal en forma de inhibición a las neuronas piramidales. En cultivos corticales, el aumento de actividad durante dos días produce un conjunto de cambios coordinados en la fuerza sináptica que resultan en una disminución de las señales excitatorias y en un aumento de las inhibitorias en neuronas piramidales (abajo a la izquierda). Por el contrario, un bloqueo de la actividad durante dos días, aumenta la señal excitadora y disminuye la inhibitoria. Adaptado de Turrigiano et al. 2004 (Turrigiano *et al.*, 2004).

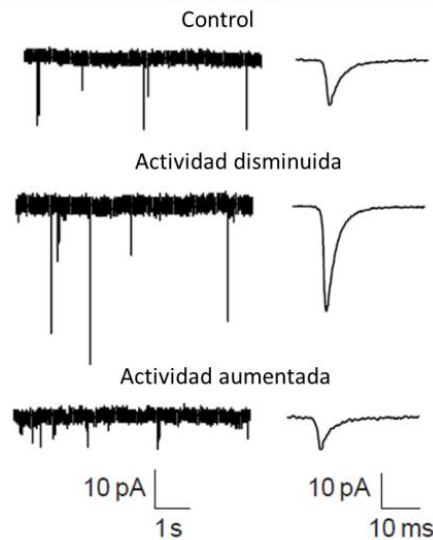
El modelo de plasticidad homeostática contempla la capacidad global (no de una única neurona que recibe el estímulo como ocurre en la plasticidad Hebbiana) de los sistemas neuronales para mantener los niveles de actividad neuronal estables en respuesta a diferentes estímulos (Turrigiano, 1999; Turrigiano *et al.*, 2004). Según este modelo, la fuerza sináptica total, que se define como el producto de la probabilidad de liberación de neurotransmisor (a nivel presináptico), de la respuesta postsináptica a la liberación de una única vesícula de neurotransmisor y del número de lugares de liberación de neurotransmisor (Katz, 1979), podría regularse mediante cambios en dichos parámetros (Turrigiano *et al.*, 2004). En principio, la medición de estas variables, permite determinar si existen mecanismos de plasticidad homeostática que ajustan la fuerza sináptica en respuesta a un cambio en la actividad neuronal. En esta dirección, los receptores de glutamato están involucrados en

cambios dependientes de la actividad y participan en la regulación de la fuerza sináptica (Contractor *et al.*, 2002). Las primeras evidencias de plasticidad homeostática en neuronas corticales, señalaban que la regulación homeostática era llevada a cabo mediante cambios postsinápticos en la acumulación y reciclaje de receptores AMPA (Turrigiano *et al.*, 1998). Como se muestra en la Figura 34, en los mecanismos de plasticidad homeostática, una disminución de la actividad neuronal (células en presencia de tetrodotoxina) durante largos periodos de tiempo aumenta la acumulación de receptores AMPA, mientras que un incremento de la actividad sináptica (células en presencia de bicuculina, un bloqueante de receptores GABA<sub>A</sub>) causa una disminución en el número de dichos receptores (Lissin *et al.*, 1999a; Lissin *et al.*, 1999b). Posteriormente también se ha descrito que las alteraciones de la actividad neuronal modifican la acumulación de receptores NMDA que contribuyen a la plasticidad homeostática (Perez-Otano *et al.*, 2005). En este sentido, un bloqueo de la actividad neuronal durante 48 h aumenta los niveles totales de diferentes subunidades del receptor NMDA mientras que el aumento de la actividad sináptica produce el efecto contrario (Bateup *et al.*, 2013).



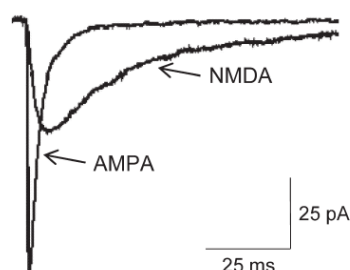
**Figura 34. Cambios en la acumulación de receptores AMPA.** El equilibrio sináptico se acompaña de cambios en la acumulación de receptores AMPA así como en las proteínas estructurales que unen los receptores AMPA al citoesqueleto. Un mecanismo posible para esos cambios es el modo en el que la actividad afecta al número de receptores AMPA de la membrana, de tal manera que un aumento de la actividad reduce el número de receptores -flecha discontinua- mientras que la actividad reducida aumenta el número de receptores -flecha ancha-. Adaptado de Turrigiano *et al.* 2004 (Turrigiano *et al.*, 2004).

Una de las técnicas más empleadas para registrar cambios homeostáticos se basa en la medición de las corrientes postsinápticas excitadoras y/o inhibitorias miniatura, mEPSCs y mIPSCs respectivamente. Estas corrientes sinápticas miniatura también conocidos como “minis”, reflejan la liberación espontánea de vesículas de neurotransmisor (GABA en el caso de las mIPSCs y glutamato en el caso de las mEPSCs) en ausencia de potenciales de acción (Fatt *et al.*, 1952). El registro de estas corrientes se realiza en presencia de bloqueantes de sodio para prevenir las corrientes mediadas por potenciales de acción. Aunque la función de los minis ha sido difícil de identificar, se sabe que están implicados en diversas funciones neuronales como el disparo postsináptico, el crecimiento dendrítico y la homeostasis sináptica (Carter *et al.*, 2002; Frank *et al.*, 2006; McKinney *et al.*, 1999; Sutton *et al.*, 2004). Por ello, el análisis de las propiedades de los minis se ha convertido en un método estándar para el estudio de la función sináptica tras cambios en la actividad neuronal. Así, los cambios en la amplitud de un conjunto de minis se interpretan como cambios en el número de receptores de glutamato (en el caso de los mEPSCs) o receptores GABA (en el caso de los mIPSCs) o en la conductancia de dichos receptores, mientras que los cambios en la frecuencia de los minis se interpretan como cambios en la liberación o recaptación de neurotransmisor (Pozo *et al.*, 2010; Turrigiano *et al.*, 1998; Turrigiano *et al.*, 2004). Resulta muy interesante el hecho de que los cambios en la actividad neuronal, que como se ha mencionado, influyen en la expresión de los receptores AMPA y NMDA (Lissin *et al.*, 1998), electrofisiológicamente se reflejan en cambios en las mEPSCs (Watt *et al.*, 2000). Así la distribución de las amplitudes de las mEPSCs aumenta o disminuye de un modo proporcional ante cambios crónicos de la actividad (Turrigiano, 2008). De ese modo, el bloqueo crónico de la actividad origina un aumento en la amplitud de las mEPSC mientras que el aumento crónico de actividad produce el efecto opuesto (Figura 35).



**Figura 35. Los cambios en la actividad neuronal modulan la fuerza sináptica en neuronas corticales.** La amplitud de las mEPSCs depende del historial de actividad de la neurona (Turrigiano *et al.*, 1998). En esta imagen, la actividad espontánea fue aumentada o bloqueada durante 48 h en cultivos corticales. Se muestran los registros de neuronas cultivadas durante 48 h en condiciones control, con la actividad bloqueada (cultivadas en presencia de tetrodotoxina) o con la actividad aumentada (cultivadas en presencia de bicuculina). Las neuronas con actividad bloqueada presentaron mEPSCs de menor amplitud que las neuronas control, mientras que en las neuronas con actividad aumentada sucede lo contrario (Turrigiano, 1999).

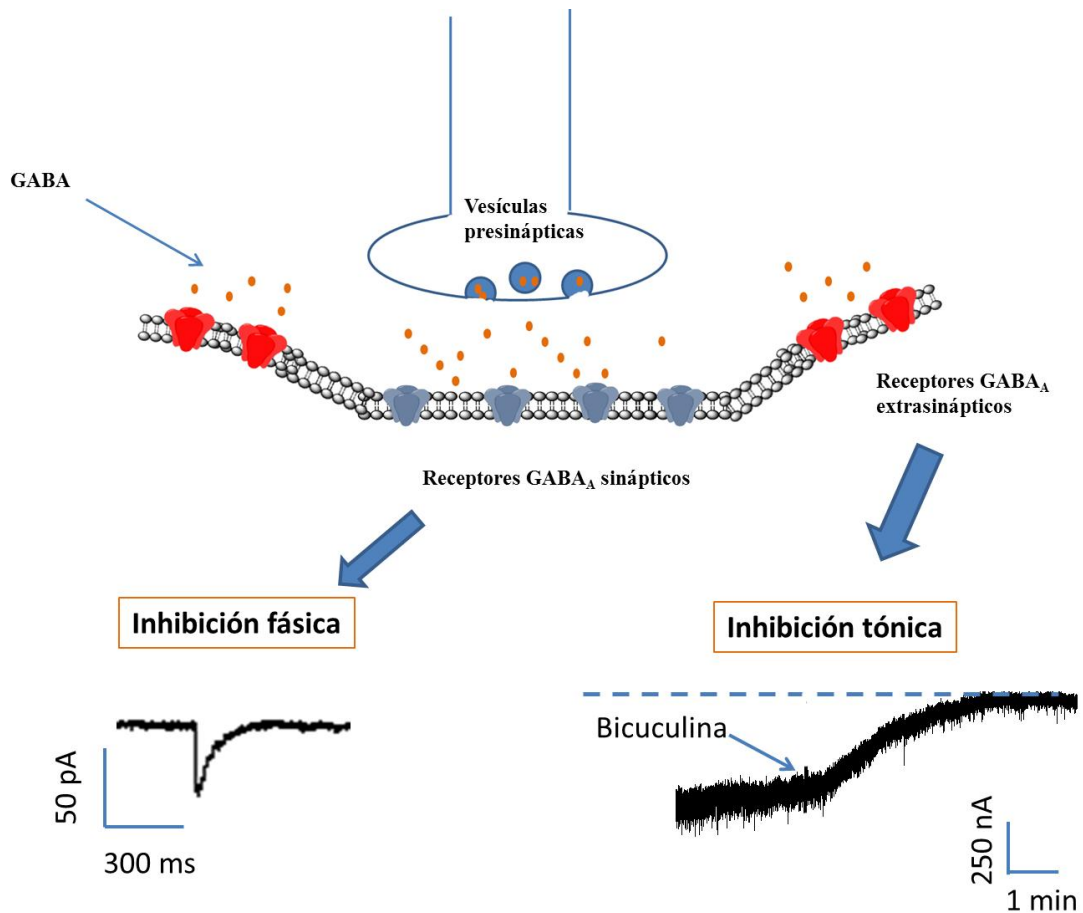
Cabe señalar que existen diferencias en la cinética de las mEPSCs en función del receptor que procedan (Figura 36). En este sentido, ya que los receptores AMPA son importantes mediadores de neurotransmisión sináptica rápida *in vivo* e *in vitro* (Palmer *et al.*, 2005), las mEPSCs de naturaleza AMPA presentan cinéticas de activación y desactivación rápidas (0.2-0.4 ms), mientras que las mEPSCs procedentes de receptores NMDA presentan cinéticas mucho más lentas (10-50 ms) que determinan la duración de la corriente sináptica (Sanchez-Perez *et al.*, 2005).



**Figura 36. Contribución de los receptores AMPA y NMDA a la actividad sináptica.** El componente rápido AMPA de los mEPSCs se aísla en presencia de antagonistas de receptores NMDA (como AP5) y el componente lento NMDA se aísla en presencia de antagonistas de receptores AMPA (como CNQX) y en ausencia de magnesio (Traynelis *et al.*, 2010).

En ocasiones, la modulación de las fuerzas sinápticas únicamente excitadoras no es suficiente para mantener la estabilidad del sistema neuronal. Como se mencionó previamente, existen extensas conexiones entre neuronas que también están reguladas por mecanismos inhibitorios por lo que un componente fundamental de la homeostasis neuronal ocurre a través del ajuste de las fuerzas inhibitorias (Rutherford *et al.*, 1998). La comunicación sináptica mediada por receptores GABA<sub>A</sub> requiere una transmisión rápida y precisa. Tras la llegada de un potencial de acción a la terminal nerviosa, se produce una entrada local de calcio que desencadena la fusión de vesículas sinápticas con la membrana presináptica en el sitio de liberación de GABA. Cada vesícula libera miles de moléculas GABA en la hendidura sináptica, generando un aumento de la concentración de GABA. En la neurona postsináptica existe un pequeño número de receptores (entre 10 y algunos cientos) que se abren cuando el GABA se une a ellos dando lugar a la entrada de Cl<sup>-</sup> (Farrant *et al.*, 2005). Aproximadamente la mitad de receptores GABA<sub>A</sub> están localizados en sitios sinápticos mientras que la otra mitad en zonas extrasinápticas (Farrant *et al.*, 2005). Como se muestra en la Figura 37, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> da lugar a dos tipos de corrientes que se pueden registrar electrofisiológicamente. Por un lado, la activación de receptores GABA<sub>A</sub> de zonas sinápticas genera corrientes fásicas de corta duración conocidas como mIPSCs que reflejan la liberación de GABA de una única vesícula sináptica (Farrant *et al.*, 2005). Por otra parte, la activación de receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos, que presentan una elevada afinidad por GABA y responden incluso a bajos niveles de GABA, genera una corriente tónica prolongada (Bright *et al.*, 2013). La magnitud de la corriente tónica mediada por receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos se cuantifica por el cambio en la corriente de fijación producida tras la administración de un antagonista de receptores GABA, normalmente bicuculina, gabazina o picrotoxina (Bright *et al.*, 2013). Estos dos tipos de corrientes GABAérgicas mediadas por receptores GABA<sub>A</sub> localizados en zonas sinápticas o extrasinápticas se muestran en la Figura 37. A pesar de que la plasticidad homeostática en sinapsis inhibitorias ha sido menos estudiada (Mody, 2005), se sabe que la inhibición neuronal también está regulada por cambios crónicos en la actividad. Así, un bloqueo de la actividad (presencia de tetrodotoxina en el medio celular, por ejemplo) produce una disminución de la inhibición neuronal, que electrofisiológicamente se traduce en una disminución de la amplitud de las

corrientes postsinápticas miniatura inhibitorias, mientras que el aumento de la actividad resulta en un aumento de la frecuencia y amplitud de las mismas (Rutherford *et al.*, 1997).



**Figura 37. Corriente fásica y tónica inducidas por la activación del receptor GABA<sub>A</sub>.** Los receptores GABA<sub>A</sub> sinápticos (azul) se localizan en la zona de la membrana postsináptica inmediatamente junto al lugar de liberación vesicular, mientras que los receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos (rojo) están alejados de la zona sináptica. La activación de los receptores GABA<sub>A</sub> sinápticos da lugar a corrientes fásicas conocidas como corrientes postsinápticas miniatura inhibitorias (mIPSCs) registradas en presencia del bloqueante de sodio tetrodotoxina y de los bloqueantes de receptores AMPA y receptores NMDA. En cambio, la activación de receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos produce una corriente tónica como evidencia el cambio de la línea basal (línea punteada azul) tras la aplicación del antagonista de receptor GABA<sub>A</sub> bicuculina 20  $\mu$ M.

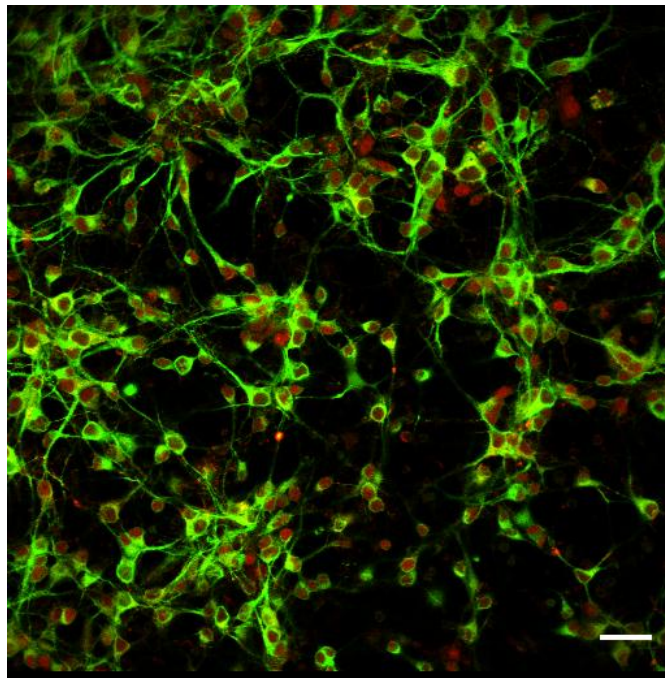
### *Canales de sodio y plasticidad sináptica*

La regulación de los canales de sodio dependientes de voltaje, responsables del inicio y propagación del potencial de acción (Hodgkin *et al.*, 1952b), supone una

forma de plasticidad sináptica ya que estos canales controlan la excitabilidad neuronal modulando la frecuencia y la forma de los potenciales de acción (Cantrell *et al.*, 2001). Además, los cambios de la concentración intracelular de sodio modifican directamente la función de los receptores glutamato (Yu *et al.*, 1998b). En este sentido, una de las ficotoxinas activadoras de canales de sodio, la brevetoxina, modula la plasticidad neuronal incrementando la función NMDA y potenciando el crecimiento de neuritas en neuronas corticales inmaduras a concentraciones que no modifican la concentración de calcio intracelular (George *et al.*, 2012; George *et al.*, 2009). Por otra parte, el bloqueante de los canales de sodio tetrodotoxina se emplea, de manera rutinaria, para disminuir la actividad neuronal dando lugar a mecanismos de plasticidad sináptica (Ramakers *et al.*, 1994; Turrigiano, 2008). Como consecuencia del bloqueo de la actividad neuronal con tetrodotoxina se produce un aumento en la expresión de algunas subunidades de receptores AMPA y NMDA. Sin embargo, el efecto opuesto al que se consigue con la TTX, es decir, la activación de canales de sodio dependientes de voltaje, no ha sido explorado en la regulación de la transmisión sináptica y en los mecanismos de plasticidad homeostática ya que la mayoría de estudios potencian la actividad neuronal disminuyendo la transmisión inhibitoria (Pozo *et al.*, 2010). En este sentido se ha descrito que el aumento de la actividad neuronal mediante el bloqueo de la transmisión inhibitoria (con bicuculina) activa la expresión de un gen de expresión temprana que codifica para la proteína Arc (del inglés *activity regulated cytoskeleton protein*) cuyo aumento produce la endocitosis de receptores AMPA y NMDA y por tanto una disminución de la expresión de algunas subunidades de estos receptores (Bateup *et al.*, 2013). Considerando este contexto, en la presente tesis doctoral, se planteó la posibilidad de que la ciguatoxina, al presentar un mecanismo de acción opuesto a la TTX, también presentara efectos opuestos a esta toxina en la regulación de los mecanismos de plasticidad sináptica neuronal.

Durante la última década, se ha empleado el cultivo primario de neuronas como modelo celular para el estudio de la plasticidad sináptica homeostática, ya que este sistema permite una manipulación de la actividad sencilla (Pozo *et al.*, 2010). Por ello, en la presente tesis se emplearon neuronas corticales de ratón obtenidas de cultivo primario para estudiar los efectos de la ciguatoxina en la regulación de la homeostasis neuronal. Estas células presentan la capacidad de formar conexiones

sinápticas y generan actividad sináptica espontánea que aumenta con el tiempo que las neuronas permanecen en cultivo (Chiappalone *et al.*, 2006). En la imagen de microscopía confocal de la Figura 38, se muestran las redes neuronales que forman las neuronas corticales en cultivo empleadas en la presente tesis. En esta imagen se muestran neuronas corticales marcadas con un anticuerpo frente a las subunidades GluR2 y GluR3 (GluR2/3) de los receptores AMPA y con un anticuerpo frente a la proteína estructural  $\beta$  tubulina (verde).



**Figura 38. Imagen de microscopía confocal de neuronas corticales.** Las neuronas fueron marcadas con un anticuerpo frente a las subunidades GluR2/3 de los receptores AMPA (rojo) y otro anticuerpo frente a la proteína estructural  $\beta$  Tubulina (verde). La barra de escala equivale a 25 micrometros.



## **2. OBJETIVO**

Las intoxicaciones alimentarias suponen un elevado riesgo para la salud pública y producen pérdidas económicas importantes a nivel global. Dentro de estas intoxicaciones, la prevalencia de la ciguatera en países endémicos y su distribución geográfica por otras regiones del mundo, incluyendo España, están en aumento. Pese a ello, en la actualidad no existe un tratamiento específico para esta enfermedad por lo que resulta necesario seguir avanzando en el conocimiento de las dianas moleculares de toxinas ciguatera y cómo estas moléculas afectan al comportamiento de los circuitos neuronales, pues la sintomatología de la ciguatera es mayoritariamente neurológica.

Por otra parte, los compuestos marinos presentan mecanismos de acción muy específicos normalmente vinculados a sistemas defensivos de los organismos que los producen. En este contexto, resulta muy interesante establecer las dianas moleculares de estos compuestos ya que en ocasiones dichos mecanismos presentan potencial terapéutico.

Este trabajo comprende el estudio de dos grandes grupos de compuestos:

- Alcaloides de la esponja *Crambe crambe*: crambescinas y crambescidinas.
- Toxinas ciguatera: ciguatoxinas, gambierol y maitotoxinas.

Los objetivos de la presente tesis doctoral son:

- 1- Evaluar electrofisiológicamente el mecanismo de acción de crambescinas y crambescidinas en neuronas corticales.
- 2- Comparar el efecto de la maitotoxina y de la ciguatoxina sintética CTX 3C en neuronas corticales.
- 3- Evaluar los efectos agudos y crónicos de la CTX 3C sobre la actividad eléctrica y la plasticidad sináptica.
- 4- Evaluar los efectos de los análogos heptacíclico y tetracíclico del gambierol en la activación de linfocitos T humanos.



### **3. PUBLICACIONES**

### 3.1 Presentación

En esta sección se presentan los resultados obtenidos durante la tesis doctoral, que incluyen tres artículos publicados en revistas internacionales y dos artículos sometidos a revisión para su publicación. Dichos resultados van acompañados de la descripción de la metodología científica empleada y de las conclusiones obtenidas en cada caso. Los resultados obtenidos se agrupan en tres bloques que se resumen a continuación:

#### **Parte I: Estudio del efecto de los alcaloides de las familias de la crambescina y de la crambescidina en neuronas corticales**

Tomando como referencia un estudio de 1993 en el que se describía que la crambescidina 816 presentaba un efecto antagonista sobre los canales de calcio dependientes de voltaje (Berlinck *et al.*, 1993) y teniendo en cuenta que los canales iónicos son frecuentes dianas para las toxinas marinas, en esta tesis doctoral se estudió el efecto de la crambescina 816 y de otros compuestos también producidos por la esponja *Crambe crambe* pertenecientes a la familia de las crambescinas, en los principales canales dependientes de voltaje en neuronas empleando técnicas electrofisiológicas.

A esta parte corresponde la siguiente publicación:

I.1. Differential effects of crambescins and crambescidin 816 in voltage gated sodium, potassium and calcium channels in neurons.

## **Parte II: Estudio del efecto de toxinas ciguatera en neuronas corticales**

La ciguatoxina y la maitotoxina además de estar producidas por el mismo microorganismo, *Gambierdiscus toxicus*, presentan ciertas similitudes en sus estructuras químicas, lo que, en principio, las hace susceptibles de presentar efectos similares. Sin embargo, la mayoría de información existente hasta la fecha aparece en el contexto de una gran variedad de modelos celulares diferentes, lo cual obstaculiza la comparación de los efectos de estas toxinas. Por otra parte, para comprender las alteraciones neurológicas producidas en casos de ciguatera, resulta imprescindible establecer el papel que los cambios en la actividad neuronal producidos por la principal toxina involucrada en esta patología, la ciguatoxina, representan para las neuronas. En esta tesis doctoral se realizó, en primer lugar, un estudio diferencial abordando los efectos de la CTX y MTX sobre los principales canales dependientes de voltaje en neuronas corticales, así como en la viabilidad neuronal, cambios en la concentración de calcio citosólico y en el pH intracelular. Dado que los cambios en la concentración intracelular de sodio participan en la regulación de la plasticidad sináptica y puesto que la CTX es considerada la toxina marina que con mayor potencia activa los canales de sodio, se evaluó el efecto que las exposiciones agudas y crónicas a CTX producían sobre la actividad sináptica en neuronas corticales. A esta parte corresponden las siguientes publicaciones:

II.1. Differential effects of ciguatoxin and maitotoxin in primary cultures of cortical neurons.

II.2. Synthetic ciguatoxin CTX 3C induces a rapid imbalance of neuronal excitability.

II.3. Chronic ciguatoxin treatment induces synaptic scaling through voltage gated sodium channels in cortical neurons.

### **Parte III: Estudio del efecto de los análogos del gambierol en la activación de linfocitos T**

Otro de los compuestos bioactivos producidos por el dinoflagelado marino *Gambierdiscus toxicus*, el gambierol, es un potente bloqueante de los canales de potasio. Teniendo en cuenta que los bloqueantes de canales de potasio son frecuentemente empleados en el desarrollo de fármacos inmunomoduladores (Varga *et al.*, 2010) y que en el Departamento de Farmacología se había descrito previamente que los análogos heptacíclico y tetracíclico del gambierol producían una inhibición de las corrientes de potasio dependientes de voltaje en neuronas (Alonso *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2012), en esta tesis doctoral se planteó la posibilidad de que los análogos del gambierol también funcionaran como bloqueantes de los canales de potasio Kv1.3 de linfocitos T. Por ello en primer lugar se evaluó electrofisiológicamente el efecto de los análogos sintéticos del gambierol sobre canales de potasio de linfocitos T procedentes de donantes humanos sanos. Siguiendo este modelo experimental, se evaluó el efecto de estos compuestos sobre la liberación de interleuquina 2, una proteína responsable de la respuesta inmune. Además en colaboración con otros investigadores del Departamento de Farmacología se estudió el efecto de los análogos del gambierol sobre la expresión génica en células T en reposo y activadas. A esta parte corresponde la siguiente publicación:

III.1. Potassium currents inhibition by gambierol analogs prevents human T lymphocyte activation

### **I.1. Differential effects of crambescins and crambescidin 816 in voltage gated sodium, potassium and calcium channels in neurons**

#### **RESUMEN**

Las crambescinas y crambescidinas son dos familias de alcaloides guanidina producidos por la esponja *Crambe crambe*. Pese a la escasa información en relación con sus efectos biológicos, se sabe que la crambescidina 816 (Cramb816) bloquea canales de calcio en la línea celular neuroblastoma X glioma. Teniendo en cuenta ésto y que los canales iónicos son dianas frecuentes para las toxinas naturales, se estudió el efecto de la Cramb 816 y de tres compuestos de la familia crambescina, norcrambescina A2 (NcrambA2), crambescina A2 (CrambA2) y crambescina C1 (CrambC1), en los principales canales iónicos dependientes de voltaje en neuronas: los canales de sodio, de potasio y de calcio. Se obtuvo que las crambescinas inhibieron las corrientes de potasio con la siguiente potencia: NcrambA2 > CrambC1 > CrambA2, mientras que la Cramb816 no tuvo efecto sobre estos canales. Sólo la CrambC1 y la Cramb816 bloquearon parcialmente la corriente total de sodio. Aunque la Cramb816 bloqueó parcialmente la corriente de calcio, la NcrambA2 no afectó a estos canales. Dado que el efecto bloqueante de la Cramb816 en los canales de calcio no había sido atribuido a ningún subtipo de canal en concreto, se estudió el efecto de este compuesto sobre las dos principales corrientes de los canales de calcio activados por alto voltaje, que se aislaron farmacológicamente, en neuronas corticales. La Cramb816 actuó específicamente sobre los canales de calcio Cav1 bloqueándolos parcialmente con mayor potencia que la nifedipina, un bloqueante específico de estos canales. En resumen, las dos familias de alcaloides guanidina mostraron una clara relación estructura-actividad ya que las crambescinas actuaron principalmente sobre los canales de potasio dependientes de voltaje mientras que la Cramb816 lo hizo principalmente sobre los canales Cav1. Estos resultados son una primera aproximación de los diferentes efectos de compuestos crambescina y crambescidina en canales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje en neuronas y sirven de base para futuros estudios.

**Differential effects of crambescins and crambescidin 816 in voltage gated sodium, potassium and calcium channels in neurons**

Víctor Martín<sup>1</sup>, Carmen Vale<sup>1</sup>, Stéphanie Bondu<sup>2</sup>, Olivier P. Thomas<sup>2</sup>, Mercedes R. Vieytes<sup>3</sup> and Luís M. Botana<sup>1\*</sup>

Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain, <sup>2</sup> Nice Institute of Chemistry – PCRE, UMR 7272 CNRS, University of Nice Sophia-Antipolis, Faculté des Sciences, Parc Valrose 06108 Nice, France, and <sup>3</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain.

Key words: guanidine alkaloids, crambescidin 816, crambescins, cortical neurons, voltage-dependent channel.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270282>



## II.1. Differential effects of ciguatoxin and maitotoxin in primary cultures of cortical neurons

### RESUMEN

Las ciguatoxinas (CTXs) y maitotoxinas (MTXs) son toxinas producidas por el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*. A pesar de que la MTX es 3 veces más grande que la CTX, parte de la estructura de la MTX recuerda a la de la CTX. El mecanismo de acción principal de la ciguatoxina sintética CTX 3C es la activación de canales de sodio mientras que el efecto principal de la MTX es la inducción de la entrada de calcio en la célula provocando muerte celular. Sin embargo, hay una falta de información en relación el efecto de estas toxinas en un mismo modelo celular. Con el objetivo de comparar los principales efectos de estas toxinas en neuronas corticales de ratón se examinaron los efectos de la MTX y de la CTX 3C en los principales canales iónicos dependientes de voltaje en neuronas así como en el potencial de membrana, la concentración de calcio citosólico, el pH intracelular y la viabilidad neuronal. Se obtuvo ni la CTX 3C ni la MTX afectaron a los canales de calcio o potasio dependientes de voltaje. A diferencia de la MTX, la CTX 3C produjo una desviación de las curvas de activación e inactivación de los canales de sodio dependientes de voltaje hacia potenciales más negativos. Además tanto la CTX 3C como la MTX disminuyeron la amplitud máxima de la corriente de sodio. Otra diferencia notable entre las dos toxinas fue la entrada masiva de calcio y la acidificación intracelular producida por la MTX pero no por la CTX 3C. También se demostró que los bloqueantes de los canales de sodio dependientes de voltaje inhiben parcialmente la entrada de calcio producida por la MTX así como la acidificación intracelular y protegen a las neuronas de la rápida citotoxicidad producida por esta toxina. Éste es el primer estudio que compara los efectos de dos toxinas ciguatera en un modelo neuronal y sugiere que las analogías y diferencias en la bioactividad de estas dos toxinas pueden estar relacionadas con sus estructuras químicas.

---

**Differential effects of ciguatoxin and maitotoxin in primary cultures of cortical neurons**

Victor Martin<sup>1</sup>, Carmen Vale<sup>1\*</sup>, Alvaro Antelo<sup>2</sup>, Masahiro Hiramasa<sup>3</sup>, Shuji Yamashita<sup>3</sup>, Mercedes R. Vieytes<sup>4</sup>, Luis M. Botana<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario s/n, 27002, Lugo

<sup>2</sup>Laboratorios Cifga, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario s/n, 27002, Lugo

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan.

<sup>4</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario s/n, 27002, Lugo

**Keywords.** Ciguatoxin, CTX 3C, maitotoxin, voltage-gated channel, cortical neuron, cytosolic calcium concentration, intracellular pH, neurotoxicity, voltage-gated sodium channel.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24999537>

## **II.2. Synthetic ciguatoxin CTX 3C induces a rapid imbalance of neuronal excitability**

### **RESUMEN**

La ciguatera es una enfermedad que está causada por el consumo de pescado contaminado con las toxinas activadoras de canales de sodio ciguatoxinas (CTX) y supone un problema de salud a escala mundial. Los síntomas de ciguatera incluyen alteraciones neurológicas tales como parestesia, disestesia, depresión y nocipercepción aumentada, entre otros. Para comprender el mecanismo celular sobre el que se asientan estas alteraciones, es necesario establecer cómo afectan los cambios en actividad producidos por CTX 3C a las neuronas. En este trabajo se evaluaron los efectos de la ciguatoxina sintética CTX 3C en el potencial de membrana, capacidad de disparo neuronal y propiedades de la transmisión sináptica excitadora e inhibitoria en neuronas corticales mediante el uso de técnicas electrofisiológicas. La ciguatoxina produjo una fuerte despolarización y paralelamente una disminución de la capacidad de disparo neuronal. Además, la CTX 3C indujo una corriente tónica rápida que fue principalmente GABAérgica y aumentó la amplitud de las corrientes inhibitorias postsinápticas miniatura (mIPSCs), mientras que disminuyó la amplitud de las corrientes excitadoras postsinápticas miniatura (mEPSCs). La frecuencia de las mIPSCs aumentó mientras que la frecuencia de las mEPSCs no se vio alterada. En este estudio también se asociaron los efectos agudos de la CTX observados en la transmisión sináptica con parte de la sintomatología neurológica causada por ciguatera en humanos ya que el desequilibrio entre las señales excitadoras e inhibitorias se relacionan con síntomas de ciguatera que incluyen fatiga, debilidad y depresión. Los resultados presentados en este artículo facilitan nueva información sobre los mecanismos celulares que pueden dar lugar a la sintomatología neurológica observada en la intoxicación por ciguatera.

**Synthetic ciguatoxin CTX 3C induces a rapid imbalance of neuronal excitability**

**V Martín<sup>1</sup>, C Vale<sup>1</sup>, M Hirama<sup>2</sup>, S Yamashita<sup>2</sup>, M R Vieytes<sup>3</sup> and L M Botana<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain.

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan.

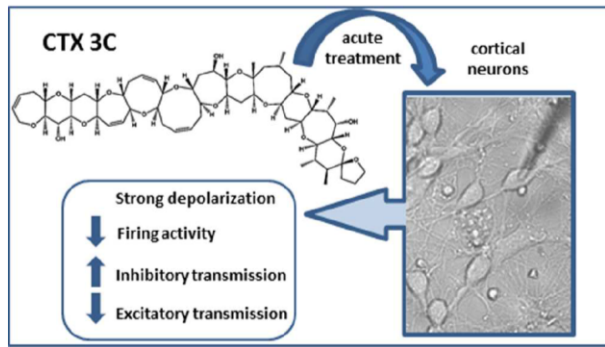
<sup>3</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain.

**Corresponding Author**

\*Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario s/n, 27002, Lugo, Spain. Tel/Fax:34-982822233. E-mail: Luis.Botana@lugo.usc.es.

**Keywords:** ciguatoxin, voltage gated sodium channels , depolarization, cortical neurons, synaptic transmission, mEPSC, mIPSC

**Table of contents graphic**



**Abstract**

Ciguatera is a human global disease caused by the consumption of contaminated fish that have accumulated the sodium channel activator toxins ciguatoxins (CTX). Symptoms of ciguatera include neurological alterations such as paraesthesiae, dysaesthesiae, depression and heightened nociception, among others. An important issue to understand these long term neurological alterations is to establish the role that changes in activity produced by CTX 3C represent to neurons. Here, the effects of synthetic ciguatoxin CTX 3C on membrane potential, spontaneous spiking and properties of synaptic transmission in cultured cortical neurons of 11-18 DIV were evaluated by using electrophysiological approaches. CTX 3C induced a large depolarization that decreased neuronal firing and caused a rapid inward tonic current that was primarily GABAergic. Moreover, the toxin enhanced the amplitude of miniature postsynaptic inhibitory currents (mIPSCs) while it decreased the amplitude of miniature postsynaptic excitatory currents (mEPSCs). The frequency of mIPSCs increased while the frequency of mEPSCs remained unaltered. We describe for the first time that a rapid membrane depolarization caused by CTX 3C to cortical neurons activates mechanisms that tend to suppress electrical activity by shifting the balance between excitatory and inhibitory synaptic transmission towards inhibition. Indeed, these results suggest that the acute effects of CTX on synaptic transmission could underlie some of the neurological symptoms caused by ciguatera in humans.

## Introduction

Neuronal homeostasis plays an essential role in the formation, maintenance and modification of neuronal circuits and provides neurons a reliable way to adapt to changes in the levels of activity<sup>1, 2</sup>. Neuronal changes in intracellular sodium concentration control action potential generation and mediate forms of synaptic plasticity that depend on neuronal firing<sup>3, 4</sup>. In this sense, marine neurotoxins acting on voltage gated sodium channels (VGSC) have been very useful in the study of the role of excitability in various synaptic preparations<sup>5</sup>. The VGSC activator brevetoxin (PbTx), has been shown to increase N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) function and promote neurite growth in immature cortical neurons at concentrations that do not modify the intracellular calcium concentration<sup>4</sup>. Among the marine toxins that activate sodium channels, CTXs are the most potent activators of VGSC, causing cell membrane depolarization at rest, by increasing sodium influx, leading to persistent neurological changes in humans intoxicated by contaminated fish containing CTXs<sup>6-11</sup>. The physiological consequence of the binding of ciguatoxins to sodium channels is an initial increase in cellular excitability, which results in spontaneous and repetitive firing of action potentials, followed by a decrease in excitability as the membrane further depolarizes (Lewis et al., 2000). However, most of the studies to date are focused on the effects of ciguatoxin in the excitability of the peripheral nervous system and not in central neurons.

An important issue to understand the neurological consequences of ciguatera food poisoning in humans is to establish the role that changes in activity elicited by CTX could represent to central neurons. The neurological sequel of ciguatera fish poisoning in humans usually resolves within weeks of onset, however, some nervous symptoms may persist for months or even years<sup>12</sup>. In humans, symptoms of ciguatera fish poisoning manifest with paraesthesiae, dysaesthesiae, and heightened nociception, as well as sensory abnormalities which include subjective features of metallic taste, pruritus, arthralgia, myalgia and dental pain<sup>12</sup>. Interestingly, alterations in inhibitory transmission are involved in altered body temperature and ataxia<sup>13</sup>, both observed in ciguatera<sup>10, 14</sup>. Moreover, fatigue, weakness and depression which result from decreased excitatory activity or increased inhibitory activity or both<sup>15</sup> are common in ciguatera food poisoning<sup>12</sup>. Therefore we hypothesized that some of those neurological effects may be related with alterations in synaptic homeostasis or perturbations in the global network transmission. Although the clinical consequences of ciguatera are long lasting,

firstly it is necessary to establish the effects of an acute exposure of CTX to central neurons in order to set the basis to future works. In this direction, glutamate receptors can be regulated by rapid (5 min) membrane trafficking, modulating synaptic transmission in response to rapid activation <sup>16</sup>. Indeed, GABAA receptors can be also modulated in a short time scale after neuronal depolarization <sup>17</sup>. Therefore, the main objective of this work was to analyze the acute effect of CTX 3C on spontaneous synaptic transmission in cortical neurons, in order to analyze the effect of CTX 3C on inhibitory and excitatory synaptic transmission in central neurons.

Altogether the results presented here indicate that the depolarization caused by the sodium channel activator CTX 3C reduces neuronal firing rate and shifts the balance between inhibitory and excitatory neurotransmission towards inhibition. These results constitute a first approach to better understand the cellular mechanisms that might lead to the neurological symptomatology of human ciguatera food poisoning and thus provide a basis for future studies.

## **Materials and methods**

### **Primary cultures of cortical neurons**

Swiss mice were used to obtain primary cultures of cortical neurons. All protocols were approved by the University of Santiago de Compostela Institutional animal care and use committee (authorization code: AE-LU-002/07/01/03/LBL4) and comply with European legislation on the use and management of experimental animals. Primary cortical neurons were obtained from embryonic day 16–18 Swiss mice as previously described <sup>18</sup>. Briefly, cerebral cortices were removed and dissociated by mild trypsinisation, followed by mechanical trituration in a DNase solution (0.004% w/v) containing a soybean trypsin inhibitor (0.05% w/v). The cells were suspended in Neurobasal Medium supplemented with 1% B-27 supplement (Invitrogen), 5 mM L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin. Cell suspension was seeded in 12 well plates precoated with poly-D-lysine and the cell culture was kept in a 95% air, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. Culture medium was replaced every 3-4 days. All data were obtained in parallel from drug-treated and age-matched sister control cultures.

### **Electrophysiology**

Whole cell patch-clamp recordings, achieved by gentle mechanical suction of the membrane patch, were performed on cortical neurons, between 11-18 days in culture, at room temperature (22-25°C). A computer-controlled current and voltage clamp

amplifier (Multiclamp 700B, Molecular Devices) was used. Signals were recorded and analyzed using a Pentium computer equipped with Digidata 1440 data acquisition system and pClamp10 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). pClamp10 was used to generate current and voltage-clamp commands and to record the resulting data. Signals were filtered at 10 kHz and digitized at 20  $\mu$ s intervals. Culture medium was exchanged with several washes of recording solution immediately prior to the experiment. After establishing the whole-cell configuration, neurons were allowed to stabilize for at least 5 min before experiments were initiated to ensure adequate equilibration between the internal pipette solution and the cell interior. Recording electrodes were fabricated from borosilicate glass micro capillaries (outer diameter, 1.5mm), and the tip resistance was 5-10M $\Omega$ . Only recordings with stable access resistance and holding current for at least 3 min were included in the analysis. The external solution in all the experiments contained (in mM): 119 NaCl, 5.9 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 22.8 NaHCO<sub>3</sub> and 0.1% glucose, (pH 7.4 adjusted with CO<sub>2</sub> prior to use) while intracellular pipette solutions contained (in mM): 150 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 1.1 EGTA and 2 Na<sub>2</sub>ATP (pH 7.2). Data were rejected if the initial resting potential was more depolarized than -50 mV. In order to evaluate the effect of CTX 3C in neuronal spiking and resting membrane potential miniature synaptic events were recorded in voltage-clamp mode at a holding potential of -80 mV. Events were counted and analyzed over a 1 minute period immediately before (control) and over a 1 minute period after 4 minutes of compound exposure. Miniature excitatory postsynaptic currents were recorded in the presence of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, bicuculline (BIC) 20  $\mu$ M, and the VGSC blocker, tetrodotoxin (TTX) at 0.5  $\mu$ M to block action potentials. Miniature inhibitory postsynaptic currents were recorded in the presence of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 20  $\mu$ M), a NMDA receptor antagonist, D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV, 100  $\mu$ M) and 0.5  $\mu$ M TTX<sup>19</sup>. Both miniature and spontaneous postsynaptic currents were detected using an automatic template detection program (pCLAMP, Molecular Devices) and verified manually. To generate the average trace of mEPSC or mIPSC for a given experimental condition, all the events from every neuron recorded in one minute and in each condition were averaged<sup>20</sup>. Tonic current ( $I_{\text{hold}}$ ) was measured respect to the average baseline level of all the events detected in each experimental condition.

### **Toxins and drugs used**

The standard of CTX 3C was synthesized by Dr. Masahiro Hirama following previously described procedures<sup>21-23</sup> and dissolved at a concentration of 10  $\mu$ M in DMSO. Following dilutions were performed in deionized water. TTX was purchased from CIFGA (Lugo, Spain), APV and BIC were purchased from Sigma and CNQX was from Tocris. The final concentration of compound solvent (DMSO), was less than 0.01%. All other chemicals were reagent grade and purchased from Sigma.

#### **Statistical Analysis**

Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (s.e.m) of  $n$  determination. Statistical comparisons were made by paired Student's  $t$  test.  $p$  values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

The main mechanism of action of CTXs is the activation of VGSCs at hyperpolarizing membrane potentials causing cell membrane depolarization at rest and eventually irreversible blockade of neurotransmitter release<sup>5, 24-26</sup>. The effect of synthetic CTX 3C on VGSCs has been described in several cellular models including mouse taste cells, cerebellar granule neurons, cortical neurons and sodium channel cell lines<sup>24, 25, 27, 28</sup>. In addition, CTX 3C can activate TTX resistant sodium channels and this effect has been suggested to explain the neurological symptoms induced by CTXs in humans such as hyperalgesia and allodynia among others<sup>26</sup>. Moreover, in immature cortical neurons, 48 hours exposure to neurotoxins belonging to the group of sodium channel activators modified activity-dependent synaptic plasticity by increasing NMDA receptor function<sup>4</sup>.

In order to determine the toxin concentration that exerts an effect in cortical neurons and to provide a basis for further experiments, the effect of several concentrations of CTX 3C on VGSC was first evaluated. Voltage-dependent sodium currents were elicited in cortical neurons by applying a series of 25 ms depolarizing pulses (voltage steps), in 5 mV increments, from a holding potential of -100 mV<sup>18</sup>. As shown in Figure 1A, the activation of sodium channels was shifted in the hyperpolarizing direction after bath application of CTC 3C. Despite 0.1 nM CTX 3C did not affect the activation of voltage gated sodium channels (data not shown), bath application of 1 and 5 nM CTX 3C, shifted the activation threshold of sodium currents to more negative potentials, from  $-50.0 \pm 4.7$  mV ( $n = 5$ ) in control conditions to  $-64.0 \pm 3.6$  mV ( $n = 5$ ,  $p = 0.02$ ) at 1 nM CTX 3C and  $-76.0 \pm 2.9$  mV ( $n = 5$ ;  $p = 0.0008$ ) at 5 nM CTX 3C (Figure 1B). Furthermore, sodium current amplitude was decreased by ciguatoxin as previously described<sup>26, 28-30</sup>. Representative voltage-dependent sodium currents at a test potential of -10 mV in the absence and presence of 5 nM CTX 3C are shown in Figure 1C. A concentration of 5 nM CTX 3C decreased peak  $I_{Na}$  by  $55.8 \pm 8.4\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) as shown in Figure 1D. Taking into account these results, 5 nM CTX 3C was used in further experiments.

### CTX 3C depolarizes and silences cortical neurons

An increase in neuronal excitability resulting in membrane depolarization and repetitive action potential discharges elicited by CTXs has been previously described using several experimental preparations such as frog motor nerve terminals<sup>8</sup>, neuroblastoma

cells<sup>31</sup> and mammalian dorsal root ganglion neurons<sup>32</sup>. However, the effects of these CTXs have been described on evoked action potentials and there is only one report describing the effect of the Pacific CTX-1 (P-CTX1) on spontaneous activity in rat parasympathetic neurons<sup>6</sup>. In order to elucidate the effects of CTX 3C in membrane excitability and membrane potential ( $V_m$ ), whole-cell current clamp experiments were performed in 11-18 div cortical neurons, which exhibited spontaneous firing activity at rest. A threshold of 8 mV was established for considering neuronal spikes. Bath application of CTX 3C to isolated cortical neurons caused a rapid membrane depolarization maintained over several minutes resulting in a decrease in spontaneous firing which finally ceased in all the fourteen cells tested. A typical response of a cortical neuron to 5 nM CTX 3C on  $V_m$  and excitability is shown in Figure 2A. As shown in the upper panel of Figure 2B, the spontaneous firing rate was significantly decreased from  $2.3 \pm 1.8$  Hz in control conditions to  $0.17 \pm 0.1$  Hz ( $n = 10$ ;  $p = 0.0006$ ) in the presence of CTX 3C. This observation is in contrast with other reports where CTXs increased repetitive firing in other cellular preparations<sup>6, 32, 33</sup>, a fact that could be explained by the high prevalence of the inhibitory neurotransmitter GABA in cortical neurons<sup>34</sup> or by the large depolarization caused by the toxin in the present study. Moreover, the amplitude of spontaneous spikes (Figure 2B, lower panel) was decreased from  $21.3 \pm 3.8$  mV in the absence of toxin to  $2.6 \pm 1.3$  mV in the presence of 5 nM CTX 3C ( $n = 10$ ;  $p = 0.00008$ ). In order to know whether the decrease in neuronal firing caused by CTX 3C was a direct consequence of the cellular depolarization elicited by the toxin, membrane potential of cortical neurons was held at -55 mV through current injection. Under these conditions, as shown in Figure 2C, 5 nM CTX 3C also decreased spontaneous firing activity and, in parallel, the current necessary to maintain the membrane potential at -55 mV was enhanced after the administration of 5 nM CTX 3C. As shown in the upper panel of Figure 2D, at -55 mV spontaneous firing rate was  $2.1 \pm 1.2$  Hz in control conditions, whereas CTX 3C exposure reduced the firing rate to  $0.3 \pm 0.2$  Hz ( $n = 5$ ;  $p = 0.08$ ), although this result did not reach statistical significance probably due to the high variability in the spiking pattern of these neurons. However, as indicated in Figure 2D (lower panel), the spike amplitude was reduced from  $20.4 \pm 3.0$  mV in control conditions to  $6.2 \pm 2.5$  mV after CTX 3C exposure ( $n = 5$ ;  $p = 0.003$ ) indicating that the silencing effect of CTX 3C on neuronal spiking was not only due to the depolarization. Additionally, the effect of CTX 3C on membrane potential was studied in the absence and presence of TTX. Average resting membrane potential was

significantly depolarized from  $-53.7 \pm 2.9$  mV in control conditions to  $-31.7 \pm 4.9$  mV ( $n = 14$ ;  $p < 0.001$ ) in the presence of 5 nM CTX 3C (Figure 2E). The depolarizing effect of CTX 3C in cortical neurons was suppressed when 0.5  $\mu$ M TTX was added to the bath before CTX 3C (Figure 2F). In this condition resting membrane potential was  $-51.6 \pm 2.1$  mV in the presence of TTX and  $-48.4 \pm 2.5$  mV in the simultaneous presence of TTX and CTX ( $n = 5$ ), thus indicating that the depolarizing effect of CTX 3C in cortical neurons was mainly mediated by TTX-sensitive VGSCs.

### **CTX 3C induces a shift in $I_{\text{hold}}$ and increases the amplitude and area of mixed spontaneous postsynaptic currents**

To investigate the mechanisms underlying the increase in the current necessary to maintain  $V_m$  at -55 mV after CTX 3C administration (described in Figure 2C), the effect of CTX 3C under voltage clamp conditions (holding potential, -80 mV) was analyzed. A typical effect of 5 nM CTX 3C in the holding current ( $I_{\text{hold}}$ ) of a cortical neuron is shown in Figure 3A. CTX 3C elicited an increase in  $I_{\text{hold}}$  from  $-45.8 \pm 4.7$  pA in control conditions ( $n = 7$ ) to  $-236.6 \pm 48.8$  pA ( $n = 7$ ,  $p < 0.001$ ) after the addition of 5 nM CTX 3C (Figure 3B). During the course of these experiments we observed that spontaneous synaptic currents were affected by the administration of CTX 3C, so we further analyzed that effect. In neurons, spontaneous synaptic events may be divided into those resulting from a spontaneous action potential in a presynaptic neuron (spontaneous postsynaptic current, sPSC) which are involved in the regulation of postsynaptic firing and synapse homeostasis and those resulting from the release of a single transmitter vesicle in the absence of presynaptic activity (miniature postsynaptic current, mPSC)<sup>35, 36</sup>. To study the effect of the toxin on sPSCs, the effect of CTX 3C in the distribution and amplitude of sPSCs was analyzed. The amplitude and area of mixed inward sPSCs were increased after CTX 3C administration. A detailed image of sPSCs recorded before (control) and after administration of CTX 3C is shown in Figure 3C. Bath application of 5 nM CTX 3C shifted the frequency distribution of the sPSCs amplitudes to the right (Figure 3D), indicating an increase in the number of sPSCs with higher amplitudes. As shown in Figure 3E, 5 nM CTX 3C increased the normalized amplitude of sPSCs ( $199.3 \pm 34.2\%$  of control;  $n = 8$ ,  $p = 0.01$ ). Since amplitude shifts do not necessarily mean a change in charge transfer, the area of sPSCs was also measured and it was increased by 5 nM CTX 3C ( $212.1 \pm 38.9\%$  of control;  $n = 7$ ,  $p = 0.008$ ), as shown in Figure 3F.

**The tonic current induced by CTX 3C in cortical neurons is mainly GABAergic**

CTX 3C, at higher concentrations than those employed in this work induced a large leak current (more than 400 pA) in HEK cells expressing TTX-resistant sodium channels but not in HEK cells expressing TTX-sensitive sodium channels<sup>26</sup>. In contrast, other authors reported that P-CTX-1 induced a large leak current only in DRG cells expressing predominantly TTX-sensitive sodium channels<sup>29</sup>. However, none of these reports investigated the underlying mechanism for the leak current induced by CTX, thus the implication of TTX sensitive or resistant channels in this effect is controversial. However, it is known that GABA activates a persistent tonic current in several brain regions<sup>37</sup>. The standard method to reveal the presence of a GABAergic tonic current in a whole-cell recording is to apply a saturating concentration of a specific GABA<sub>A</sub> receptor antagonist like BIC<sup>38</sup>. Therefore, we analyzed whether the enhancement of  $I_{\text{hold}}$  by CTX 3C could be reversed by blocking TTX sensitive channels or GABA<sub>A</sub> receptors. For this purpose, a sequence of CTX 3C, TTX and the GABA<sub>A</sub> antagonist BIC were added to the bath (Figure 4A). In these conditions control  $I_{\text{hold}}$ ,  $-56.9 \pm 3.8$  pA, was increased by 5 nM CTX 3C to  $-214.0 \pm 28.5$  pA ( $n = 4$ ,  $p = 0.0007$ ) similarly to the results obtained in the set of experiments described in the previous section. Further addition of 0.5  $\mu\text{M}$  TTX caused only a small decrease in  $I_{\text{hold}}$  to  $-187.4 \pm 31.0$  pA ( $p = 0.27$ ) while addition of 20  $\mu\text{M}$  BIC significantly reversed  $I_{\text{hold}}$  to near control values ( $-77.9 \pm 11.6$  pA;  $p = 0.008$  respect to TTX) indicating that the tonic current induced by CTX 3C was mainly mediated by GABA<sub>A</sub> receptors. A representative trace of this effect is shown in Figure 4B. The tonic current activated by CTX 3C was composed of three components, a fast decay followed by a fast recovery (few seconds) which ended in a stable  $I_{\text{hold}}$  level resembling the tonic current activated by GABA in cortical neurons (supplementary Figure 1) as well as in other cellular models<sup>39</sup>. As shown in Figure 4C, the membrane depolarization caused by the toxin was simultaneously accompanied by a large increase in the inward tonic current, indicating that the effects of CTX 3C on membrane potential and  $I_{\text{hold}}$  were fully linked. Moreover, bath application of TTX after CTX 3C did not affect the depolarization induced by CTX 3C but bath application of BIC returned the membrane potential and the holding current to basal levels. This is in full agreement with previous studies reporting that extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors, which mediate tonic inhibition, are strongly modulated by membrane potential<sup>40</sup>. It is well known that TTX binding physically blocks the flow of sodium ions through the

channel, thereby preventing action potential generation and propagation<sup>41</sup>, however, after activation of VGSC by CTX and the consequent membrane depolarization, TTX lacked an effect either on the recovery of  $I_{\text{hold}}$  or  $V_m$ . Therefore, we further studied whether the order of drug administration could influence the effect of CTX 3C on  $I_{\text{hold}}$ , so VGSC and GABA<sub>A</sub> receptors were blocked prior the addition of CTX 3C. In these conditions, the toxin did not modify  $I_{\text{hold}}$ . As shown in Figure 4D upper panel,  $I_{\text{hold}}$  was  $-55.3 \pm 8.5$  pA, in the presence of TTX and BIC, and  $-61.2 \pm 8.8$  pA after the administration of 5 nM CTX 3C ( $n = 8$ ,  $p = 0.32$ ). A representative recording showing the effects of 5 nM CTX 3C on  $I_{\text{hold}}$  after blockade of GABA<sub>A</sub> receptors and VGSC is shown in Figure 4D lower panel.

### **CTX 3C increases the amplitude and frequency of miniature inhibitory postsynaptic current**

Since neurons maintain stable firing rates through homeostatic regulation of many aspects of neuronal excitability such as the regulation of inhibitory and/or excitatory synaptic strength<sup>42</sup>, the effect of the toxin on miniature inhibitory and excitatory synaptic events was analyzed. Miniature events are assumed to report synaptic function at the level of a single terminal, representing the postsynaptic response to the release of individual vesicles of neurotransmitter and can be considered a measure of the unit strength of a synapse<sup>43</sup>. Firstly, mIPSCs were pharmacologically isolated as described in the material and methods section. These mIPSC in cortical neurons were GABAergic as indicated by their complete inhibition by the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist BIC at 20  $\mu\text{M}$  (Supplementary Figure 2). A representative trace showing the effect of 5 nM CTX 3C on mIPSCs is shown in Figure 5A. Bath application of CTX 3C elicited not only an inward tonic current (discussed in the previous section) but also an increase in the amplitude and frequency of mIPSCs. In these conditions, blockade of VGSC and glutamatergic transmission, CTX 3C increased the tonic current from  $-45.6 \pm 9.0$  pA in the absence of toxin to  $-77.9 \pm 13.2$  pA ( $n = 5$ ,  $p = 0.038$ ) in the presence of 5 nM CTX 3C (data not shown). This effect accounts for approximately 32 pA of tonic current, and is much lower than the tonic current elicited by CTX 3C in the absence of TTX + APV + CNQX (around 190 pA). This could be explained due to the fact that the blockade of VGSC by TTX decreases the tonic GABAergic current<sup>44</sup>. A detailed image of mIPSCs in both conditions (control and presence of CTX 3C) as well as a histogram of the amplitudes of mIPSCs from the same cell in each condition is shown in Figure 5B,

indicating an increase in the number of inhibitory events of higher amplitude in the presence of CTX 3C. Similarly, Figure 5C shows a histogram of average mIPSC amplitude from 5 neurons (the same number of events per condition were pooled), reflecting that the average population of mIPSCs with lower amplitudes decreased in the presence of CTX 3C whereas the population of mIPSCs with higher amplitudes was enhanced by the toxin. As illustrated in Figure 5D, 5 nM CTX 3C significantly increased the amplitude ( $148.93 \pm 19.0\%$  of control;  $n = 4$ ,  $p = 0.04$ ), the frequency ( $173.2 \pm 24.1\%$  of control;  $n = 4$ ,  $p = 0.03$ ) and the area ( $146.4 \pm 17.2$  of control;  $n = 4$ ,  $p = 0.04$ ) of mIPSCs. The averaged traces for mIPSCs obtained in control conditions and after CTX 3C treatment are shown in Figure 5E. Since both, amplitude and frequency of mIPSCs were significantly affected by CTX 3C, we conclude that the toxin potentiates GABAergic transmission through both postsynaptic and presynaptic mechanisms.

#### **CTX 3C decreases the amplitude but not the frequency of miniature excitatory postsynaptic currents**

It is known that changes in neuronal activity usually regulate inhibition and excitation in opposite directions<sup>42</sup>. Thus, we next examined the effect of CTX 3C on glutamatergic miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) as described in the materials and methods section. mEPSCs were confirmed by their complete inhibition in the presence of 20  $\mu$ M CNQX and 100  $\mu$ M APV (Supplementary Figure 3). A representative trace showing the effect of CTX 3C on mEPSCs is shown in Figure 6A. In the presence of TTX and BIC, CTX 3C decreased the amplitude of mEPSCs. A more detailed image of mEPSCs from the same recording is shown in Figure 6B. A histogram of the amplitudes from the same cell in each condition reflected that the population of mEPSCs with lower amplitudes was enhanced in the presence of CTX 3C whereas the population of mEPSCs with higher amplitudes tended to disappear (Figure 6B, inset). As illustrated in Figure 6C, the distribution of mEPSC amplitudes recorded from 8 neurons in absence (control) and presence of CTX 3C showed a leftward shift indicating an increase in the number of events with lower amplitude in the presence of the toxin. Plotted average mEPSCs amplitude and frequency indicated that 5 nM CTX 3C significantly decreased the amplitude and the area of mEPSC by  $32.3 \pm 7.8\%$  ( $p = 0.006$ ,  $n = 8$ ) and  $63.9 \pm 12.4\%$  ( $p = 0.012$ ,  $n = 8$ ), respectively, without affecting their frequency (Figure 6D). Representative traces of averaged excitatory events recorded from 8 individual neurons,

as well as the CTX 3C sensitive current obtained by subtracting the remaining current in the presence of CTX 3C from the control excitatory current, are shown in Figure 6E. In this case, the normalized area decreased from  $100 \pm 21.8$  % in control conditions to  $36.1 \pm 12.5$  % in the presence of CTX 3C ( $p = 0.012$ ).

### Discussion and conclusions

Cortical circuits are susceptible of instability when the balance between excitation and inhibition is perturbed so, in order to prevent neuronal networks from runaway excitation, a homeostatic negative feedback regulation is necessary<sup>43</sup>. Compensatory mechanisms are generally considered to operate in a slow time course<sup>43</sup>, however, synaptic transmission can be regulated in a short time scale after an stimulus<sup>16, 17, 45</sup>. To our knowledge, this is the first study that provides direct evidence for a rapid modulation of excitatory and inhibitory transmission by the VGSC activator CTX 3C. Here, we show that the effects of CTX 3C in cortical neurons are reflected on rapid changes in membrane potential, electrical activity, GABAergic tonic current, the amplitude of mEPSCs and the frequency and amplitude of mIPSCs.

It is broadly known that ciguatoxins induce membrane depolarization in excitable cells, due to their ability to activate VGSC. As expected, in cortical neurons CTX 3C elicited a hyperpolarizing shift in the activation potential of VGSC which is a typical effect of ciguatoxins<sup>29</sup> also described for the synthetic toxin CTX 3C<sup>24, 25</sup>. Moreover, the toxin caused a decrease in the peak amplitude of sodium currents similar to the effects previously described for CTX 3C<sup>24, 25, 28</sup> and for other ciguatoxins<sup>46</sup>. However, the consequences of a massive depolarization by CTX 3C on neuronal transmission had never been investigated so far. It is normally assumed that depolarization, for example that induced by an increase in intracellular sodium, is related to an increase in neuronal firing, however, in cortical neurons CTX 3C caused a large depolarization (about 20 mV) that was accompanied by a complete silencing of neuronal firing. It has been described that certain VGSC modifiers, such as veratridine, generate depolarization block which abolishes firing by inducing persistent sodium currents<sup>47</sup>. However, in our study, when membrane potential was held at -55 mV, the firing properties of cortical neurons were still abolished by CTX 3C indicating that the decrease in the neuronal firing properties produced by the toxin was not only a consequence of membrane depolarization and suggested that additional mechanisms activated by the toxin were

inhibiting neuronal activity. In this direction, an increase in inhibitory neurotransmission is known to decrease neuronal activity<sup>42</sup>. The main inhibitory neurotransmitter receptors in the central nervous system, GABA<sub>A</sub> receptors, mediate two distinct forms of inhibition depending on their location. On the one hand, synaptic GABA<sub>A</sub> receptors mediate phasic inhibition, which is reflected as rapid inward currents that are generated by postsynaptic GABA<sub>A</sub> receptors in response to vesicular GABA release. On the other hand, extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors are activated by ambient GABA and mediate tonic inhibition<sup>48-50</sup>. The level of tonic inhibition can rapidly change due to factors associated with intense neural activity, including increased ambient GABA, extracellular K<sup>+</sup> accumulation, and neuronal depolarization<sup>17, 40, 44</sup>. GABAergic tonic currents regulate neuronal excitability by setting the threshold for action potential generation<sup>50</sup>. Here, CTX 3C induced a GABAergic vesicular release as evidenced by the increase in mIPSCs frequency (increase in phasic inhibition). We suggest that this effect caused an increase in ambient GABA, which in turn activated extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors as indicated by the GABAergic tonic current induced by CTX 3C. We suggest that the activation of GABAergic tonic currents contributed to the reduction of neuronal spiking produced by CTX 3C. In this sense, other toxins affecting VGSC such as veratridine induced a sustained membrane depolarization reducing neuronal firing<sup>51</sup> and elicited a GABAergic tonic current in several neuronal preparations<sup>44</sup>. Furthermore, other sodium channel activators such as brevetoxin have been reported to increase GABAergic activity<sup>52</sup>. The modulation of GABAergic tonic currents represents a mechanism of homeostatic plasticity, allowing a neuron to control its excitability in response to changes in synaptic activity in a short-term time scale<sup>53</sup>. Furthermore, other homeostatic mechanisms such as the maintenance of the balance between excitation and inhibition are essential to maintain neuronal stability<sup>54</sup>. In response to changes in activity cortical neurons need to adjust their synaptic strengths up or down to compensate these alterations, a mechanism generally considered to be a very slow<sup>42</sup>. However, it has been reported that an acute blockade of synaptic activity (4 hours), induced rapid synaptic scaling mechanisms very similar to those observed at 24 h increasing mEPSCs amplitude and the accumulation of AMPA receptors<sup>45</sup>. While changes in the amplitude of mEPSCs and mIPSCs indicate actions on postsynaptic receptors, changes in the frequency of mEPSCs and mIPSCs are indicative of actions on presynaptic neurotransmitter release<sup>55</sup>. Here, the effect of CTX 3C was associated with opposite actions on excitatory and inhibitory postsynaptic receptors as evidenced by a

decrease in mEPSC amplitude and an increase in mIPSC amplitude. Moreover, the increase in the frequency of mIPSCs indicates that CTX 3C increased the rate of spontaneous GABA release as mentioned before, while the toxin did not affect the release of glutamate. Altogether these results indicate that an immediate perturbation of neuronal activity by acute exposure of cortical neurons to CTX 3C might induce rapid disturbances in neuronal homeostasis, as evidenced by the alterations on GABAergic tonic currents and on the shift towards inhibition that CTX 3C induced in the balance between excitation and inhibition. Furthermore, the alteration of neuronal synaptic homeostasis by CTX 3C could probably be involved in some of the neurological disturbances observed after ciguatera food poisoning in humans. Interestingly, the enhancement of the tonic GABA<sub>A</sub> conductance leads to altered body temperature and ataxia<sup>13</sup>, both observed in ciguatera<sup>10, 14</sup>. In addition, the effects of CTX 3C described here, are probably related to some others symptoms common in ciguatera food poisoning such as fatigue, weakness and depression<sup>56</sup>. In fact, fatigue has been related with central nervous system depression caused by decreased excitatory activity, increased inhibitory activity or both<sup>15</sup>, which is the effect caused by CTX 3C in cortical neurons. All these data strengthen the hypothesis that a rapid modulation of neurotransmission by CTX3C, specifically by up-regulating phasic and tonic GABA<sub>A</sub> inhibition and by decreasing excitatory transmission, could contribute to some of the neurological symptoms observed in ciguatera food poisoning.

It has been reported that CTXs have cellular targets other than TTX-sensitive VGSC<sup>9, 26, 32</sup>. However, in our cellular model, 5 nM CTX 3C did not affect voltage gated calcium or potassium currents and did not induce calcium influx from extracellular media or calcium release from intracellular stores<sup>28</sup>. Therefore, one possible explanation for the effects of CTX 3C on synaptic transmission could be a possible activity of CTX 3C on TTX-resistant sodium channels. In this sense, several studies have demonstrated that TTX-resistant VGSC channels are also activated by ciguatoxins in other cells different from central neurons<sup>26, 29</sup>. However, other cellular mechanisms such as the activation of transient receptor potential channels could potentially contribute to the neurological effects of ciguatoxins, since these channels are involved in the symptomatology of ciguatera<sup>10</sup> and in synaptic plasticity<sup>57</sup>. In the present study while the effect of CTX 3C on membrane depolarization was mediated by VGSC since it was blocked by TTX, the modulatory effects of CTX 3C on miniature excitatory and inhibitory postsynaptic

currents (recorded in the presence of TTX) and on the GABAergic tonic were independent of VGSC activation.

Overall, our results indicate that CTX 3C potentiates inhibition in cortical neurons both by an increase in tonic and phasic GABAergic inhibition and through a decrease in excitatory postsynaptic activity. The novel finding that an acute exposure of cortical neurons to CTX 3C induces an immediate modification of excitatory and inhibitory transmission constitutes the first approach that evaluates the effect of a neurotoxin activating sodium channels on neuronal homeostasis. Although the cellular mechanisms involved in the modification of synaptic strength by CTX 3C remain to be determined the results presented here provide new hypothesis for the possible neuronal mechanisms involved in the physiopathology of ciguatera.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the following FEDER cofounded-grants: From Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain: [AGL2009-13581-CO2-01 and AGL2012-40485-CO2-01]. From Xunta de Galicia, Spain: [10PXIB261254 PR]. From the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA-Research Executive Agency <http://ec.europa.eu/research/rea> (FP7/2007-2013) under grant agreement Nos. 211326-CP (CONFIDENCE), 265896 BAMMBO, 265409  $\mu$ AQUA, and 262649 BEADS, 315285 Ciguatools and 312184 PharmaSea. From the Atlantic Area Programme (Interreg IVB Trans-national): 2009-1/117 Pharmatlantic.

### **Supporting information available**

**Figure S1. Tonic current induced by GABA in cortical neurons.** Representative recording showing the effect of an acute administration of 500  $\mu$ M GABA on Ihold.

**Figure S2. Pharmacological isolation of mIPSCs.** **A**, representative trace of spontaneous postsynaptic currents (sPSCs) in control conditions measured at -80 mV. This cell received some large amplitude, presumably action potential-dependent synaptic inputs. **B**, mIPSCs were isolated by the addition of TTX + APV + CNQX. **C**, GABAergic mIPSCs were confirmed by the addition of BIC.

**Figure S3. Pharmacological isolation of mEPSCs.** **A**, representative trace of spontaneous postsynaptic currents (sPSCs) in control conditions measured at -80 mV.

**B**, mEPSCs were isolated by the addition of TTX + BIC. **C**, Glutamatergic mEPSCs were confirmed by the addition of APV and CNQX.

### Abbreviations

CTX, ciguatoxin; rT PCR, real time polymerase chain reaction; IEGs, immediate early genes; VGSC, voltage-gated sodium channels; TTX, tetrodotoxin; mIPSCs, miniature postsynaptic inhibitory currents; mEPSCs, miniature postsynaptic excitatory currents; PbTx, brevetoxin; NMDA, N-methyl-D-aspartate receptor; BIC, bicuculline; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; APV, D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid;  $V_m$ , membrane potential; sPSC spontaneous postsynaptic current;  $I_{hold}$ , holding current;  $I_{Na}$ , sodium current amplitude; TTX-R, tetrodotoxin resistant.

### References

- (1) Burrone, J., O'Byrne, M., and Murthy, V. N. (2002) Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature*, *420*, 414-418.
- (2) Turrigiano, G. (2007) Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback. *Curr Opin Neurobiol*, *17*, 318-324.
- (3) Rose, C. R., Kovalchuk, Y., Eilers, J., and Konnerth, A. (1999) Two-photon Na<sup>+</sup> imaging in spines and fine dendrites of central neurons. *Pflugers Arch*, *439*, 201-207.
- (4) George, J., Baden, D. G., Gerwick, W. H., and Murray, T. F. (2012) Bidirectional influence of sodium channel activation on NMDA receptor-dependent cerebrocortical neuron structural plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*, 19840-19845.
- (5) Meunier, F. A., Mattei, C., and Molgo, J. (2009) Marine toxins potently affecting neurotransmitter release. *Prog Mol Subcell Biol*, *46*, 159-186.
- (6) Hogg, R. C., Lewis, R. J., and Adams, D. J. (1998) Ciguatoxin (CTX-1) modulates single tetrodotoxin-sensitive sodium channels in rat parasympathetic neurones. *Neurosci Lett*, *252*, 103-106.
- (7) Manger, R., Woodle, D., Berger, A., Dickey, R. W., Jester, E., Yasumoto, T., Lewis, R., Hawryluk, T., and Hungerford, J. (2014) Flow cytometric-membrane potential

- detection of sodium channel active marine toxins: application to ciguatoxins in fish muscle and feasibility of automating saxitoxin detection. *J AOAC Int*, *97*, 299-306.
- (8) Molgo, J., Comella, J. X., and Legrand, A. M. (1990) Ciguatoxin enhances quantal transmitter release from frog motor nerve terminals. *Br J Pharmacol*, *99*, 695-700.
- (9) Molgo, J., Shimahara, T., and Legrand, A. M. (1993) Ciguatoxin, extracted from poisonous morays eels, causes sodium-dependent calcium mobilization in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Neurosci Lett*, *158*, 147-150.
- (10) Vetter, I., Touska, F., Hess, A., Hinsbey, R., Sattler, S., Lampert, A., Sergejeva, M., Sharov, A., Collins, L. S., Eberhardt, M., Engel, M., Cabot, P. J., Wood, J. N., Vlachova, V., Reeh, P. W., Lewis, R. J., and Zimmermann, K. (2012) Ciguatoxins activate specific cold pain pathways to elicit burning pain from cooling. *EMBO J*, *31*, 3795-3808.
- (11) Zimmermann, K., Deuis, J. R., Inserra, M. C., Collins, L. S., Namer, B., Cabot, P. J., Reeh, P. W., Lewis, R. J., and Vetter, I. (2013) Analgesic treatment of ciguatoxin-induced cold allodynia. *Pain*, *154*, 1999-2006.
- (12) Pearn, J. (2001) Neurology of ciguatera. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *70*, 4-8.
- (13) Chiu, C. S., Brickley, S., Jensen, K., Southwell, A., McKinney, S., Cull-Candy, S., Mody, I., and Lester, H. A. (2005) GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *J Neurosci*, *25*, 3234-3245.
- (14) Jones, H. R., Jr. (1980) Acute ataxia associated with ciguatera-type (grouper) tropical fish poisoning. *Ann Neurol*, *7*, 491.
- (15) Zlott, D. A., and Byrne, M. (2010) Mechanisms by which pharmacologic agents may contribute to fatigue. *PM R*, *2*, 451-455.
- (16) Lissin, D. V., Carroll, R. C., Nicoll, R. A., Malenka, R. C., and von Zastrow, M. (1999) Rapid, activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, *19*, 1263-1272.
- (17) Ransom, C. B., Tao, W., Wu, Y., Spain, W. J., and Richerson, G. B. (2013) Rapid regulation of tonic GABA currents in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, *109*, 803-812.
- (18) Martin, V., Vale, C., Bondu, S., Thomas, O. P., Vieytes, M. R., and Botana, L. M. (2013) Differential Effects of Crambescins and Crambescidin 816 in Voltage-Gated Sodium, Potassium and Calcium Channels in Neurons. *Chem Res Toxicol*.
- (19) Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C., and Nelson, S. B. (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, *391*, 892-896.

- 
- (20) Watt, A. J., van Rossum, M. C., MacLeod, K. M., Nelson, S. B., and Turrigiano, G. G. (2000) Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses. *Neuron*, 26, 659-670.
- (21) Hirama, M. (2005) Total synthesis of ciguatoxin CTX3C: a venture into the problems of ciguatera seafood poisoning. *Chem Rec*, 5, 240-250.
- (22) Inoue, M., Uehara, H., Maruyama, M., and Hirama, M. (2002) Practical total synthesis of ciguatoxin CTX3C by improved protective group strategy. *Org Lett*, 4, 4551-4554.
- (23) Hirama, M., Oishi, T., Uehara, H., Inoue, M., Maruyama, M., Oguri, H., and Satake, M. (2001) Total synthesis of ciguatoxin CTX3C. *Science*, 294, 1904-1907.
- (24) Ghiaroni, V., Fuwa, H., Inoue, M., Sasaki, M., Miyazaki, K., Hirama, M., Yasumoto, T., Rossini, G. P., Scalera, G., and Bigiani, A. (2006) Effect of ciguatoxin 3C on voltage-gated Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents in mouse taste cells. *Chem Senses*, 31, 673-680.
- (25) Yamaoka, K., Inoue, M., Miyahara, H., Miyazaki, K., and Hirama, M. (2004) A quantitative and comparative study of the effects of a synthetic ciguatoxin CTX3C on the kinetic properties of voltage-dependent sodium channels. *Br J Pharmacol*, 142, 879-889.
- (26) Yamaoka, K., Inoue, M., Miyazaki, K., Hirama, M., Kondo, C., Kinoshita, E., Miyoshi, H., and Seyama, I. (2009) Synthetic ciguatoxins selectively activate Nav1.8-derived chimeric sodium channels expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem*, 284, 7597-7605.
- (27) Perez, S., Vale, C., Alonso, E., Alfonso, C., Rodriguez, P., Otero, P., Alfonso, A., Vale, P., Hirama, M., Vieytes, M. R., and Botana, L. M. (2011) A comparative study of the effect of ciguatoxins on voltage-dependent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in cerebellar neurons. *Chem Res Toxicol*, 24, 587-596.
- (28) Martin, V., Vale, C., Antelo, A., Hirama, M., Yamashita, S., Vieytes, M. R., and Botana, L. M. (2014) Differential effects of ciguatoxin and maitotoxin in primary cultures of cortical neurons. *Chem Res Toxicol*.
- (29) Strachan, L. C., Lewis, R. J., and Nicholson, G. M. (1999) Differential actions of pacific ciguatoxin-1 on sodium channel subtypes in mammalian sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 288, 379-388.
- (30) Mattei, C., Marquais, M., Schlumberger, S., Molgo, J., Vernoux, J. P., Lewis, R. J., and Benoit, E. (2010) Analysis of Caribbean ciguatoxin-1 effects on frog myelinated axons and the neuromuscular junction. *Toxicon*, 56, 759-767.
- (31) Bidard, J. N., Vijverberg, H. P., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A. M., Bagnis, R., and Lazdunski, M. (1984) Ciguatoxin is a novel type of Na<sup>+</sup> channel toxin. *J Biol Chem*, 259, 8353-8357.

- 
- (32) Birinyi-Strachan, L. C., Gunning, S. J., Lewis, R. J., and Nicholson, G. M. (2005) Block of voltage-gated potassium channels by Pacific ciguatoxin-1 contributes to increased neuronal excitability in rat sensory neurons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204, 175-186.
- (33) Hogg, R. C., Lewis, R. J., and Adams, D. J. (2002) Ciguatoxin-induced oscillations in membrane potential and action potential firing in rat parasympathetic neurons. *Eur J Neurosci*, 16, 242-248.
- (34) Sunol, C., Babot, Z., Fonfria, E., Galofre, M., Garcia, D., Herrera, N., Iraola, S., and Vendrell, I. (2008) Studies with neuronal cells: From basic studies of mechanisms of neurotoxicity to the prediction of chemical toxicity. *Toxicol In Vitro*, 22, 1350-1355.
- (35) Carter, A. G., and Regehr, W. G. (2002) Quantal events shape cerebellar interneuron firing. *Nat Neurosci*, 5, 1309-1318.
- (36) Frank, C. A., Kennedy, M. J., Goold, C. P., Marek, K. W., and Davis, G. W. (2006) Mechanisms underlying the rapid induction and sustained expression of synaptic homeostasis. *Neuron*, 52, 663-677.
- (37) Bai, D., Zhu, G., Pennefather, P., Jackson, M. F., MacDonald, J. F., and Orser, B. A. (2001) Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*, 59, 814-824.
- (38) Bright, D. P., and Smart, T. G. (2013) Methods for recording and measuring tonic GABAA receptor-mediated inhibition. *Front Neural Circuits*, 7, 193.
- (39) McCartney, M. R., Deeb, T. Z., Henderson, T. N., and Hales, T. G. (2007) Tonic active GABAA receptors in hippocampal pyramidal neurons exhibit constitutive GABA-independent gating. *Mol Pharmacol*, 71, 539-548.
- (40) Ransom, C. B., Wu, Y., and Richerson, G. B. (2010) Postdepolarization potentiation of GABAA receptors: a novel mechanism regulating tonic conductance in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 30, 7672-7684.
- (41) Lee, C. H., and Ruben, P. C. (2008) Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels (Austin)*, 2, 407-412.
- (42) Turrigiano, G. G., and Nelson, S. B. (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 5, 97-107.
- (43) Turrigiano, G. G. (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, 135, 422-435.
- (44) Wu, Y., Wang, W., and Richerson, G. B. (2006) The transmembrane sodium gradient influences ambient GABA concentration by altering the equilibrium of GABA transporters. *J Neurophysiol*, 96, 2425-2436.

- 
- (45) Ibata, K., Sun, Q., and Turrigiano, G. G. (2008) Rapid synaptic scaling induced by changes in postsynaptic firing. *Neuron*, *57*, 819-826.
- (46) Schlumberger, S., Mattei, C., Molgo, J., and Benoit, E. (2010) Dual action of a dinoflagellate-derived precursor of Pacific ciguatoxins (P-CTX-4B) on voltage-dependent K(+) and Na(+) channels of single myelinated axons. *Toxicon*, *56*, 768-775.
- (47) Bikson, M., Hahn, P. J., Fox, J. E., and Jefferys, J. G. (2003) Depolarization block of neurons during maintenance of electrographic seizures. *J Neurophysiol*, *90*, 2402-2408.
- (48) Farrant, M., and Nusser, Z. (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*, *6*, 215-229.
- (49) Glykys, J., and Mody, I. (2007) Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron*, *56*, 763-770.
- (50) Semyanov, A., Walker, M. C., Kullmann, D. M., and Silver, R. A. (2004) Tonicity active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci*, *27*, 262-269.
- (51) Kohama, M., Miyahara, S., Nakano, S., and Wakisaka, S. (2001) Long-term enhancement of synaptic transmission induced by veratridine in rat CA3 hippocampal neurons. *Neurosci Res*, *39*, 463-468.
- (52) Singh, J. N., and Deshpande, S. B. (2003) Involvement of the GABAergic system for Ptychodiscus brevis toxin-induced depression of synaptic transmission elicited in isolated spinal cord from neonatal rats. *Brain Res*, *974*, 243-248.
- (53) Vardya, I., Drasbek, K. R., Dosa, Z., and Jensen, K. (2008) Cell type-specific GABA A receptor-mediated tonic inhibition in mouse neocortex. *J Neurophysiol*, *100*, 526-532.
- (54) Kilman, V., van Rossum, M. C., and Turrigiano, G. G. (2002) Activity deprivation reduces miniature IPSC amplitude by decreasing the number of postsynaptic GABA(A) receptors clustered at neocortical synapses. *J Neurosci*, *22*, 1328-1337.
- (55) Engelman, H. S., and MacDermott, A. B. (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci*, *5*, 135-145.
- (56) Pearn, J. H. (1997) Chronic fatigue syndrome: chronic ciguatera poisoning as a differential diagnosis. *Med J Aust*, *166*, 309-310.
- (57) Sun, Y., Sukumaran, P., Bandyopadhyay, B. C., and Singh, B. B. (2014) Physiological Function and Characterization of TRPCs in Neurons. *Cells*, *3*, 455-475.

**Figure legends**

**Figure 1. Concentration-dependent effects of CTX 3C on sodium currents ( $I_{Na}$ ).** **A**, I-V relationship for the effect of 1 nM and 5 nM CTX 3C on  $I_{Na}$  in cortical neurons. **B**, pooled results for the concentration dependent effects of CTX 3C on  $I_{Na}$  activation. Note that both 1 nM and 5 nM CTX 3C shifted the activation of  $I_{Na}$  to more hyperpolarized potentials. **C**, representative peak sodium currents in the absence and presence of 5 nM CTX 3C. **D**, pooled results of  $I_{Na}$  measured at -10 mV in the absence and presence of 5 nM CTX 3C. The number of cells tested is indicated in parentheses. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

**Figure 2. CTX 3C decreases spontaneous neuronal spiking and depolarizes cortical neurons.** **A**, example of voltage traces of a neuron showing spontaneous firing activity when  $V_m$  was permitted to fluctuate freely. Addition of 5 nM CTX 3C (arrow) depolarized the membrane potential and abolished the firing activity. **B**, pooled results of the frequency (upper panel) and amplitude (lower panel) of the spikes in the absence (control) and presence of 5 nM CTX 3C ( $n = 10$ ). **C**, example of voltage and current traces of a neuron showing spontaneous firing activity when  $V_m$  was clamped at -55 mV indicating that the current necessary to maintain  $V_m$  at -55 mV was enhanced after 5 nM CTX 3C administration. Amplified recordings from the same neuron, before and after addition of the toxin, are shown in the lower panel. **D**, pooled results showing spike frequency (upper panel) and amplitude (lower panel) in the absence (control) and presence of 5 nM CTX 3C when  $V_m$  was held at -55 mV ( $n = 5$ ). **E**, histogram showing the mean membrane potential before and after addition of 5 nM CTX 3C ( $n = 14$ ). **F**, in the presence of TTX, the depolarizing effect of CTX 3C was abolished. The number of cells tested is indicated in parentheses. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

**Figure 3. CTX 3C effects on  $I_{hold}$  and spontaneous postsynaptic currents in cortical neurons.** CTX 3C activated a tonic inward current. **A**, representative trace of the effect of 5 nM CTX 3C on the holding current ( $I_{hold}$ ) when  $V_m$  was clamped at -80 mV. **B**, CTX 3C, at 1 and 5 nM, produced a rapid rise in  $I_{hold}$ . **C**, detailed traces of mixed sPSCs recorded before (control) and after 5 nM CTX 3C administration at a holding potential of -80 mV. **D**, distribution of the sPSCs from 7 neurons one minute before (left) and 4 minutes after 5 nM CTX 3C administration (381 events per condition were pooled). Note the shift to the right in sPSCs amplitude in the presence of the toxin. **E**, plotted

average values of sPSCs amplitude in the absence (control) and presence of 5 nM CTX 3C. **F**, plotted values of sPSCs area in the absence (control) and in the presence of nM CTX 3C. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . The number of the cells analyzed is in parenthesis.

**Figure 4. The tonic current induced by CTX 3C is mainly GABAergic.** **A**, plotted values of the shift in  $I_{\text{hold}}$  produced by the addition of CTX 3C, TTX and BIC. Note that the shift on  $I_{\text{hold}}$  produced by CTX 3C was not reversed by TTX, but it was completely blocked by BIC. **B**, a representative recording of this effect is shown. **C**, values of a representative cell indicating the relationship between shifts in  $I_{\text{hold}}$  (upper panel) and  $V_m$  (lower panel). **D**, pooled results for the effect of CTX 3C on  $I_{\text{hold}}$  in the presence of TTX and BIC (upper panel) and representative recording showing that in the presence of TTX and BIC  $I_{\text{hold}}$  was not modified by CTX 3C (lower panel). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . The number of the cells analyzed is in parenthesis. Dashed lines indicate baseline  $I_{\text{hold}}$ .

**Figure 5. CTX 3C potentiates GABA activity.** **A**, an example of mIPSCs (in the presence of TTX, APV and CNQX) recorded as inward currents at a holding potential of -80 mV. The arrow indicates the administration of 5 nM CTX 3C. Dashed line shows baseline holding current. **B**, detailed traces of mIPSCs from the cell in **A** recorded before (left) and after 5 nM CTX 3C administration (right). Distribution of the mIPSCs from the same neuron one minute before (left) and 4 minutes after administration of 5 nM CTX 3C are shown (25 events per condition were pooled). **C**, histogram showing the distribution of mIPSCs from 5 neurons one minute before (control) and 4 minutes after 5 nM CTX 3C administration (130 events per condition were pooled). **D**, normalized values of amplitude, frequency and area of mIPSCs in the absence (control) and presence of 5 nM CTX 3C ( $n = 4$ , \* $p < 0.05$ ). **E**, average traces of mIPSCs in the absence (control) and presence of CTX 3C obtained from 4 cells.

**Figure 6. CTX 3C reduces mEPSCs amplitude.** **A**, An example of mEPSCs (in the presence of TTX and BIC) recorded as inward currents at a holding potential of -80 mV. The arrow indicates the administration of 5 nM CTX 3C. **B**, detailed traces of mEPSCs from the cell in **A**, recorded before (left) and after 5 nM CTX 3C administration (right). Distribution of the mEPSCs recorded from the same neuron one minute before (left) and 4 minutes after administration of 5 nM CTX 3C are shown (50 events per condition

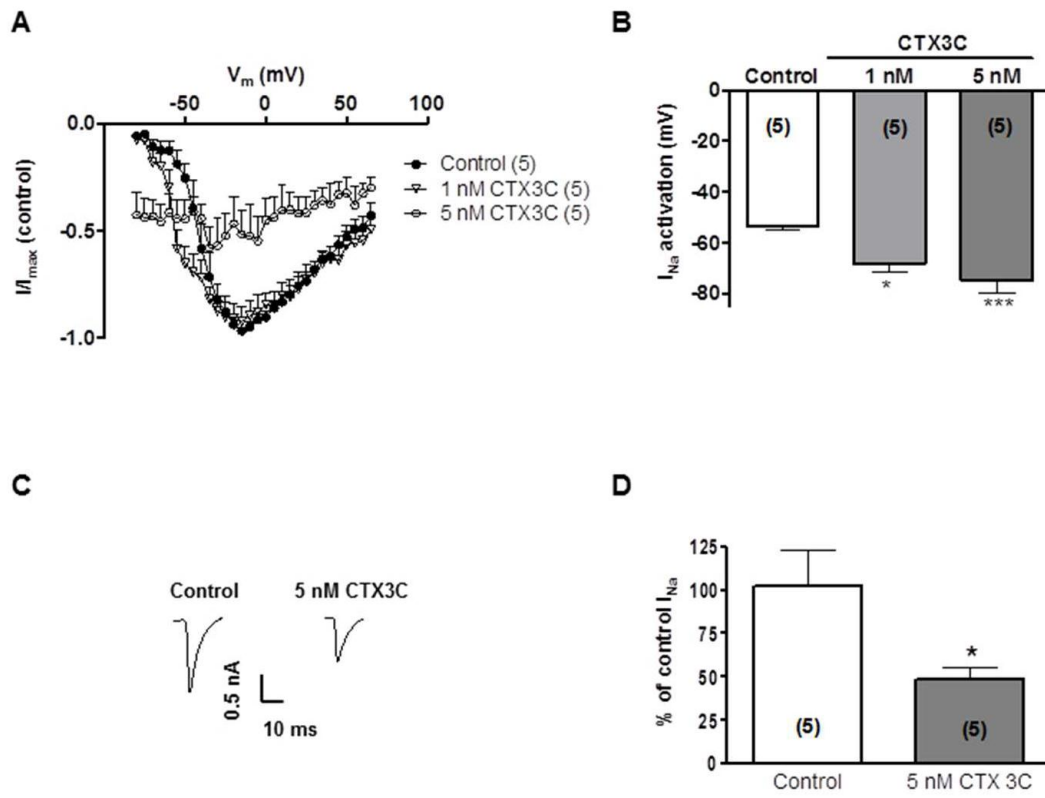


Figure 1

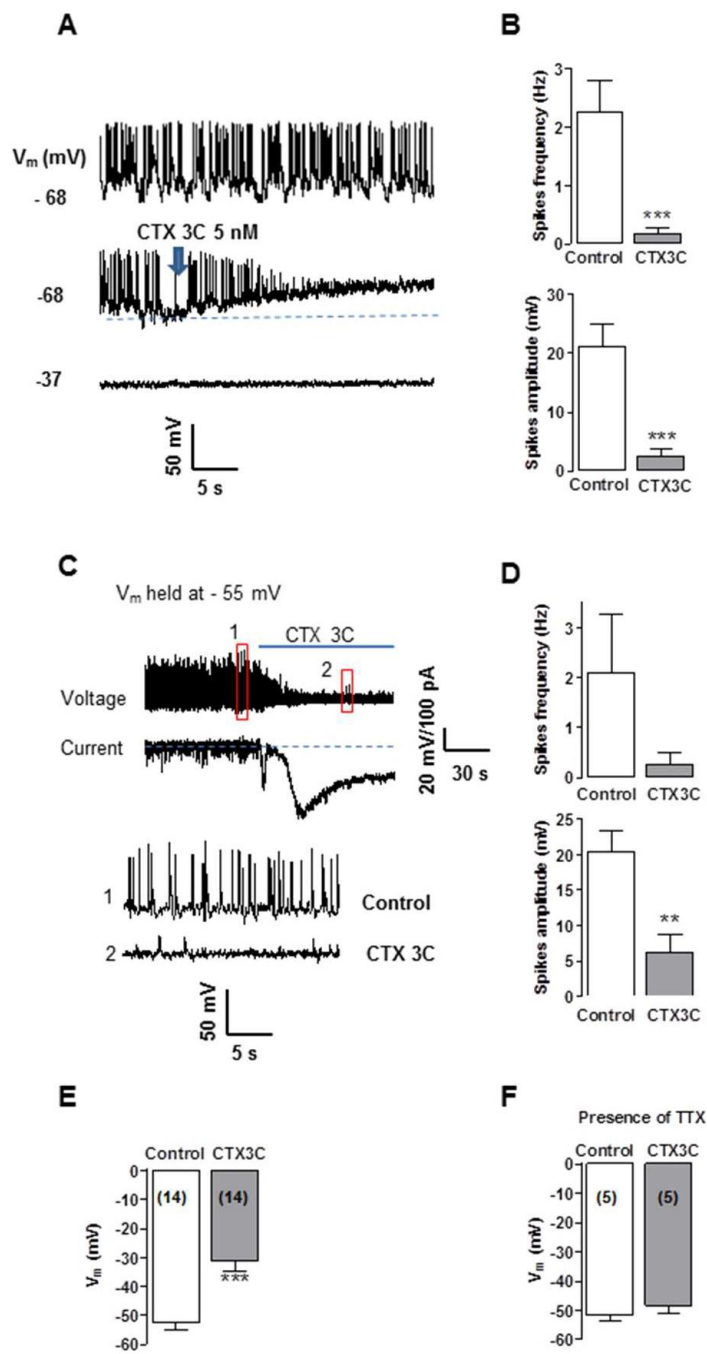


Figure 2

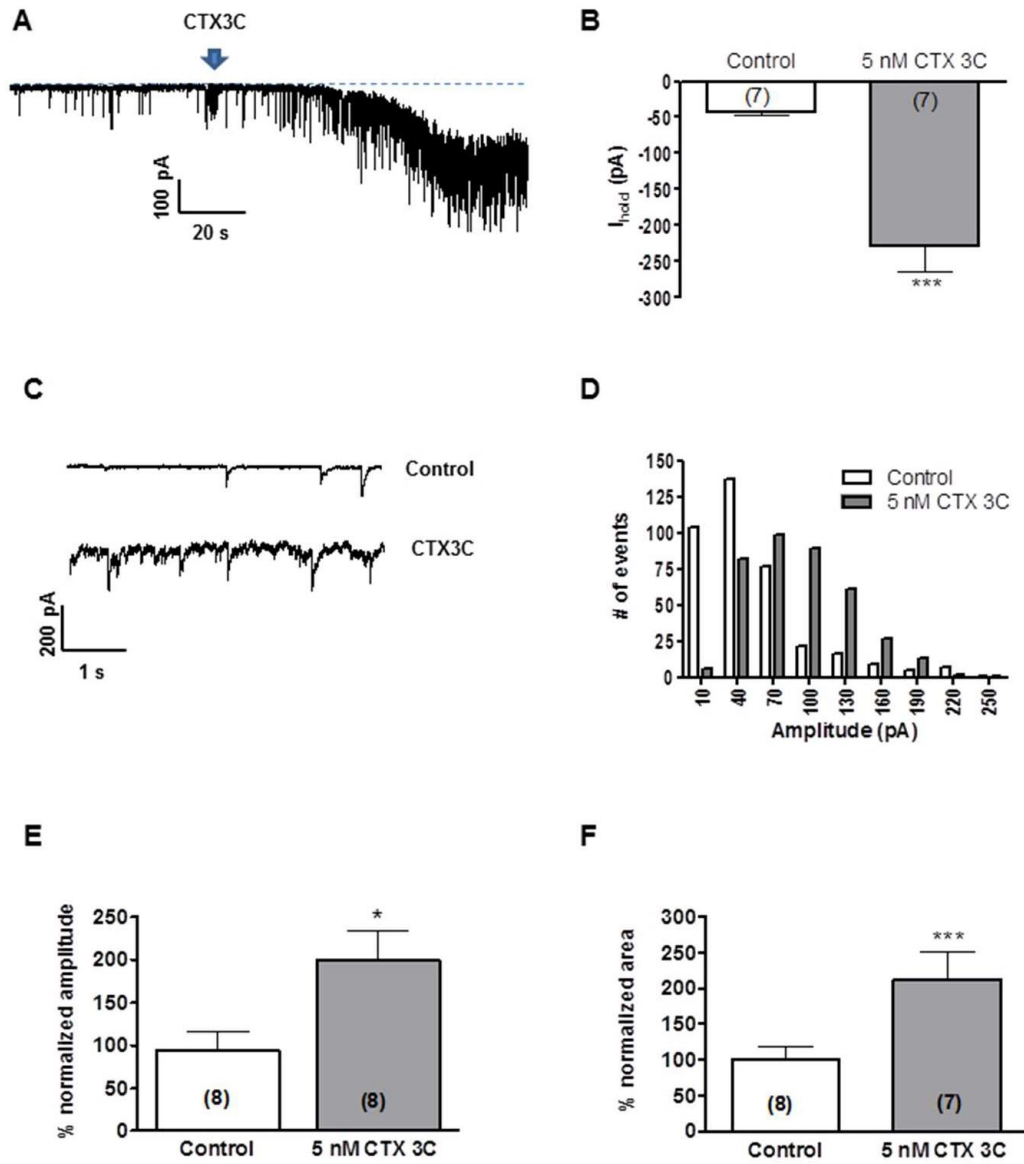


Figure 3

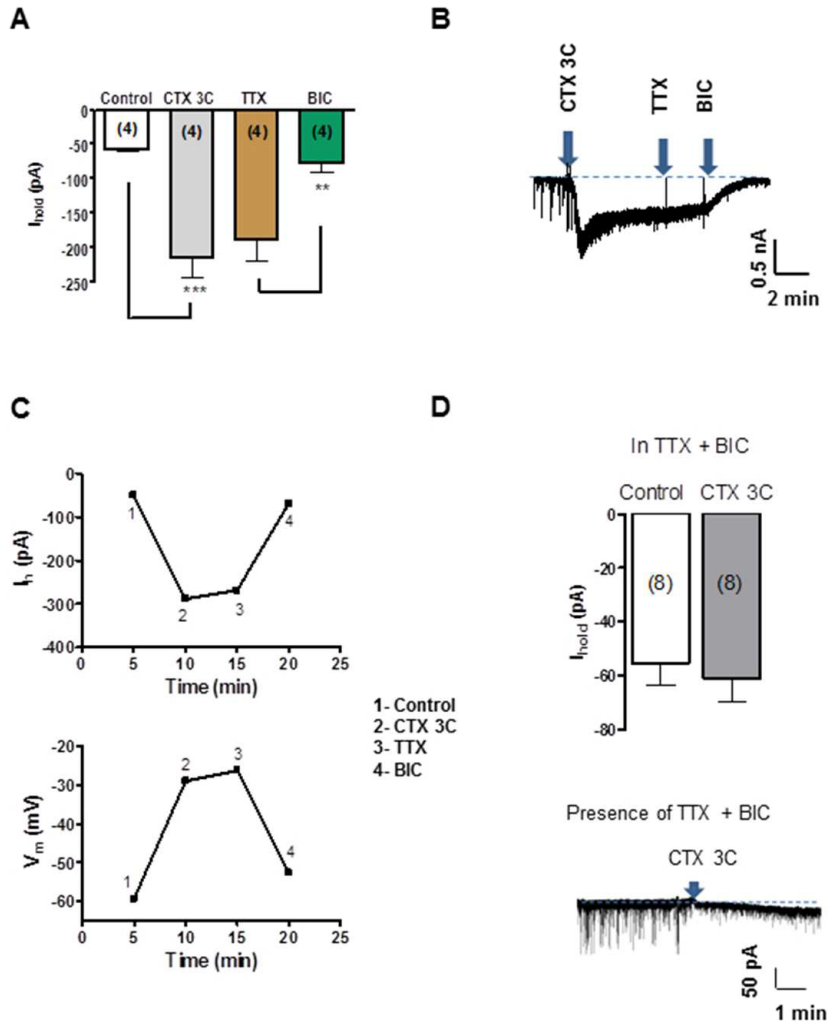


Figure 4

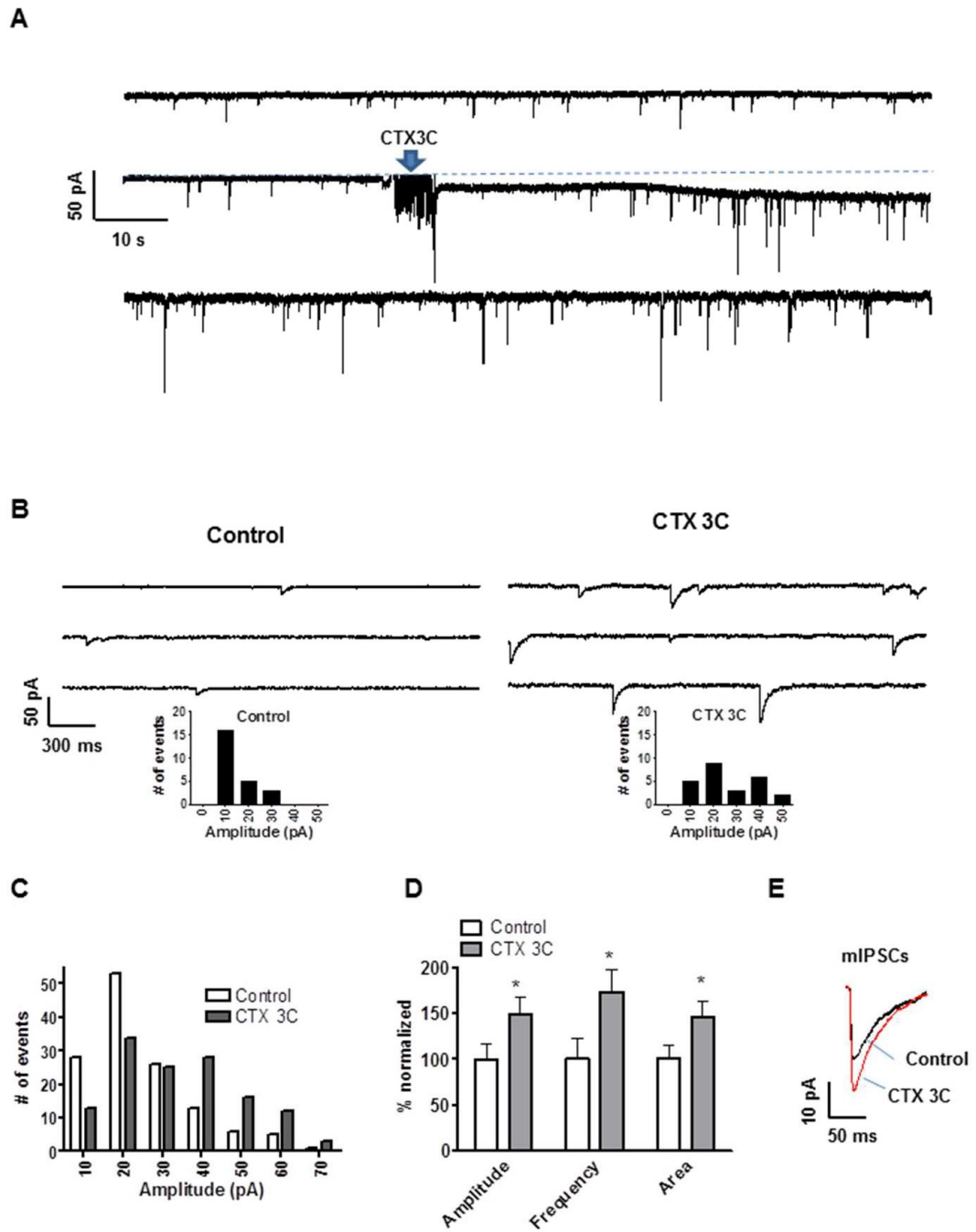


Figure 5

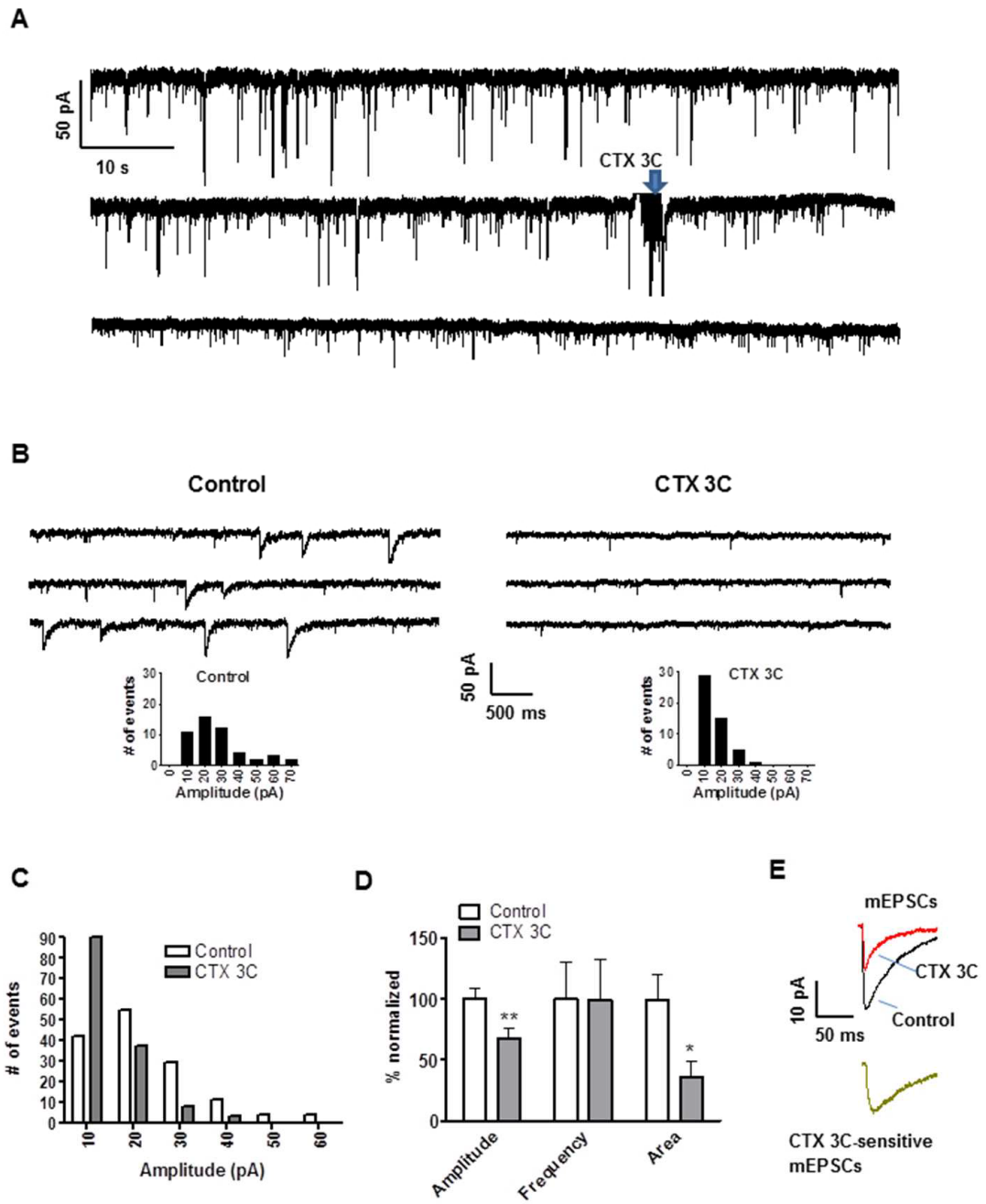


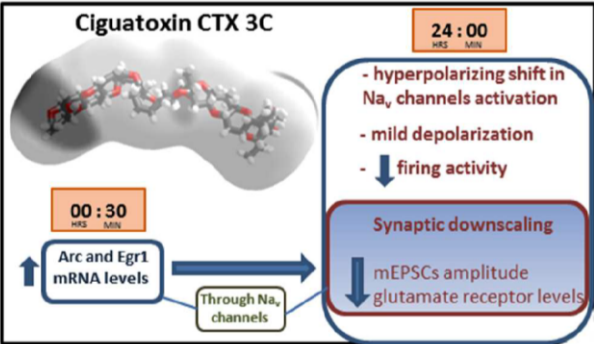
Figure 6

### **II.3. Chronic ciguatoxin treatment induces synaptic scaling through voltage gated sodium channels in cortical neurons**

#### **RESUMEN**

Las ciguatoxinas son moléculas poliéter con forma de escalera que activan los canales de sodio dependientes de voltaje y producen ciguatera, una intoxicación alimentaria que cursa con alteraciones neurológicas crónicas. En neuronas centrales, los cambios crónicos en la actividad inducen mecanismos de plasticidad sináptica homeostática que ajustan la fuerza de las sinápsis excitadoras con el fin de estabilizar la actividad neuronal. Por otra parte, los genes de expresión temprana como Arc y Egr1 son inducidos por un aumento en la actividad neuronal y modulan la expresión de los receptores glutamato. En este trabajo se evaluó la expresión de los genes de expresión temprana asociados a cambios en la actividad neuronal, Arc y Egr1. Posteriormente se estudió el efecto de una exposición de neuronas corticales a la ciguatoxina sintética CTX 3C durante 24 h sobre los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje, potencial de membrana, disparo neuronal, modulación de las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura y expresión de receptores de glutamato en neuronas corticales de 10-13 días en cultivo. La CTX 3C produjo un aumento en la expresión de Arc y Egr1, el cual fue bloqueado con tetrodotoxina. Además, una exposición crónica a CTX 3C produjo la activación de canales de sodio a potenciales más negativos, la despolarización del potencial de membrana, la disminución del disparo neuronal e indujo mecanismos de equilibrio sináptico que fueron evidenciados por una disminución de la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura y una disminución de los niveles de expresión de subunidades de receptores AMPA y NMDA que también fue bloqueado con tetrodotoxina. Estos resultados ponen de manifiesto que la ciguatoxina regula la plasticidad sináptica homeostática en neuronas centrales de un modo dependiente a los canales de sodio dependientes de voltaje e indican que parte de la sintomatología neurológica de ciguatera puede estar asociada a esos mecanismos compensatorios.

TABLE OF CONTENTS



**ABSTRACT**

Ciguatoxins are sodium channels activators that cause ciguatera, one of the most widespread nonbacterial forms of food poisoning, which presents with long term neurological alterations. In central neurons, chronic perturbations in activity induce homeostatic synaptic mechanisms that adjust the strength of excitatory synapses and modulate glutamate receptors expression in order to stabilize the overall activity. Immediate early genes, such as Arc and Egr1, are induced in response to activity changes and underlie the trafficking of glutamate receptors in neuronal homeostasis. To better understand the long lasting neurological consequences of ciguatera, it is important to establish the role that chronic changes in activity produced by ciguatoxins represent to central neurons. Here, the effect of a 30 min exposure of 10-13 DIV cortical neurons to the synthetic ciguatoxin CTX 3C on Arc and Egr1 expression was evaluated by using real time polymerase chain reaction approaches. Then, the effect of CTX 3C in cortical neurons for 24 hours was evaluated in Nav channels, membrane potential, firing activity, miniature excitatory postsynaptic currents and glutamate receptors expression by using electrophysiological and western blot approaches. CTX 3C induced an upregulation of Arc and Egr1 that was prevented by the Na<sub>v</sub> channels antagonist tetrodotoxin. In addition, chronic CTX 3C shifted the activation of Na<sub>v</sub> channels to more negative potentials and produced membrane potential depolarization, decreased neuronal firing and induced synaptic scaling mechanisms as evidenced by a decrease in mEPSCs amplitude and downregulation of the protein levels of glutamate receptors protein levels that was prevented by tetrodotoxin. These findings identify an unanticipated role for ciguatoxin in the regulation of homeostatic plasticity in central neurons involving Na<sub>v</sub> channels and raise the possibility that some of the neurological symptoms of ciguatera might be explained by these compensatory mechanisms.

## INTRODUCTION

Ciguatera fish poisoning is a seafood-borne illness caused by the consumption of contaminated fish that have accumulated toxins produced by the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. Ciguatoxin (CTX), the most prevalent toxin in ciguatera, has a long semirigid ladder-shaped polyether structure with fused ether rings of different size and its main mechanism of action consists in activating  $\text{Na}_v$  channels producing cell membrane depolarization at rest <sup>1-3</sup>. In humans ciguatera fish poisoning presents with neurological symptoms, that may last for several months or even years, including paraesthesia, headache, weakness, heightened nociception and sensory abnormalities such as pruritus, arthralgia, myalgia, and dental pain <sup>4</sup>. However, the underlying cellular alterations for these symptoms are not understood so far. It has been reported that the high lipid solubility of CTX and its long retention in neuronal membranes can account for the chronic nature of these neurological sequelae <sup>4</sup>, which, traditionally, have been related to the direct interaction of CTX with  $\text{Na}_v$  channels <sup>5, 6</sup>. However, there is a lack of information about the *in vitro* effects of a chronic exposure of neurons to CTX. On this respect, shifts in intracellular sodium concentration are good candidates for mediating forms of synaptic plasticity that depend on neuronal activity <sup>7-10</sup> and thus, we here hypothesized that some of the neurological perturbances of ciguatera could be related to chronic alterations in synaptic transmission induced by CTX 3C.

We recently described that an acute administration of 5 nM CTX 3C to cortical neurons shifts the I-V curve of  $\text{Na}_v$  channels in the hyperpolarizing direction without affecting  $\text{K}_v$  channels, voltage gated calcium channels or calcium influx <sup>11</sup>. Moreover, CTX 3C caused a large membrane depolarization that was prevented by tetrodotoxin and accompanied by a suppression in firing activity, a decrease in excitatory synaptic transmission and an increase in inhibitory synaptic transmission (submitted article). However, in that study it remained unclear whether neuronal activity was reduced by CTX 3C or, in contrast, if it was activated but this activation was masked (suppression of firing activity) due to the strong depolarization produced by the toxin. Since a depolarizing stimulus should enhance firing activity, spike counting is a potentially ambiguous measure because low levels of depolarization (that are below threshold for

spike generation) and saturating levels of depolarization (that inactivate sodium channels), both result in the abolishment of action potential generation <sup>12</sup>.

Other indicators of changes in neuronal activity are immediate early genes (IEGs). These are the first group of genes to be expressed following synaptic activation and encode a diverse range of proteins including regulatory transcription factors, structural proteins, signal transduction proteins, growth factors, and enzymes <sup>13</sup> and can be divided into direct effector IEGs and regulatory transcription factors IEGs (RTF IEG). Direct effector IEGs, such as Arc (activity regulated cytoskeleton-associated protein), act directly to modulate specific cellular functions (synaptic structure and function), whereas RTF IEGs like Egr1 (early growth response protein 1), influence cellular physiology by increasing expression of specific downstream genes <sup>14</sup>. Both Egr1 and Arc are increased by heightened neuronal activity and are implicated in homeostatic synaptic mechanisms <sup>15-17</sup>.

Homeostatic mechanisms play an essential role in the formation, maintenance and modification of neuronal circuits allowing neurons to adapt to changes in activity <sup>18-20</sup>. One of the best-characterized form of neuronal adaptation to activity perturbations, are the homeostatic responses occurring at excitatory synapses of the mammalian central nervous system, a process called synaptic scaling <sup>21</sup>. By this mechanism neurons upregulate or downregulate the amplitude of miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs, in an activity-dependent manner and in the direction needed to maintain stability <sup>22</sup>. mEPSCs are a valuable tool to measure changes in synaptic strength since they represent the postsynaptic response to the release of individual neurotransmitter vesicles <sup>21</sup>. While changes in the frequency of mEPSCs indicate actions on presynaptic neurotransmitter release <sup>23</sup>, changes in the amplitude of mEPSCs are indicative of changes in the number of postsynaptic AMPA and NMDA glutamate receptors <sup>21, 22, 24, 25</sup>. However, homeostatic synaptic mechanisms, such as synaptic scaling, have a slow time course and require hours to days of altered activity to produce changes in synaptic strength and to scale up or down proportionally all excitatory synapses <sup>21</sup>.

The main objective of this work was to know whether CTX 3C produced an elevation of network activity through Na<sub>v</sub> channels and to analyze the effect of a chronic exposure of 10-13 DIV cortical neurons to CTX 3C in. A 30 min

exposure of cortical neurons to CTX 3C induced an upregulation of the IEGs Arc and Egr1, which was prevented by the Na<sub>v</sub> channels antagonist tetrodotoxin. At 24 h of treatment, CTX 3C produced activation of Na<sub>v</sub> and depolarization of membrane potential, decreased neuronal firing activity, increased the frequency but decreased the amplitude of mEPSCs and reduced the expression of NMDA and AMPA receptor subunits which was also prevented by tetrodotoxin. Overall, these results indicate that CTX 3C induce synaptic scaling in cortical neurons involving activity-induced gene expression and glutamate receptors modulation in a Na<sub>v</sub> channels dependent manner and provide new insights into the possible neurobiological basis of ciguatera food poisoning.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Primary cultures of cortical neurons**

Swiss mice were used to obtain primary cultures of cortical neurons. All protocols were approved by the University of Santiago de Compostela Institutional animal care and use committee. Primary cortical neurons were obtained from embryonic day 16–18 swiss mice as previously described (Martin et al., 2013). All data were obtained in parallel from drug-treated and age-matched sister control cultures treated with DMSO 0.1% as a vehicle.

### **RNA purification and real time PCR**

RNA from control and treated cells was purified using the Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined with a NanoDrop 2000 (Fisher Scientific). Equal amounts of total RNA from each sample were reverse transcribed using an oligo-dT (Fisher Scientific) and a RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase (Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. The ARC and EGR1 and RPL13A (housekeeper) cDNAs were amplified in a StepOne real time PCR (Applied Biosystems) using the iTaq™ Universal SYBR(R) Green Supermix (Bio-Rad), following the manufacturer's instructions (Table 1 shows primers and targets sequences). Results were analyzed using the StepOne software (Applied Biosystems) and relative quantification between treatments was performed

using the  $\Delta\Delta C_t$  method (Livak, Schmittgen). Each treatment was performed in triplicate.

### **Electrophysiology**

Whole cell patch-clamp recordings, achieved by gentle mechanical suction of the membrane patch, were performed on cortical neurons between 10-13 days in culture, at room temperature (22-25°C). A computer-controlled current and voltage clamp amplifier (Multiclamp 700B, Molecular Devices) was used. Signals were recorded and analyzed using a Pentium computer equipped with Digidata 1440 data acquisition system and pClamp10 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). pClamp10 was used to generate current and voltage-clamp commands and to record the resulting data. Signals were filtered at 10 kHz and digitized at 20  $\mu$ s intervals. Culture medium was exchanged with several washes of recording solution immediately prior to the experiment. After establishing the whole-cell configuration, neurons were allowed to stabilize for at least 5 min before experiments were initiated to ensure adequate equilibration between the internal pipette solution and the cell interior. Recording electrodes were fabricated from borosilicate glass micro capillaries (outer diameter 1.5 mm), and the tip resistance was 5-10 M $\Omega$ . Only recordings with stable access resistance and stable holding current for at least 3 min were included in the analysis. The external solution in all the experiments contained (in mM): 119 NaCl, 5.9 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 22.8 NaHCO<sub>3</sub> and 0.1% glucose, (pH 7.4 adjusted with CO<sub>2</sub> prior to use) while intracellular pipette solutions contained (in mM): 150 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 1.1 EGTA and 2 Na<sub>2</sub>ATP (pH 7.2). Data were rejected if the initial resting potential was more depolarized than -50 mV. In current clamp experiments a threshold of 8 mV was established for considering neuronal spikes. Spontaneous postsynaptic currents were recorded in voltage-clamp mode while holding the postsynaptic neuron at -80 mV. Events were counted and analyzed for a 2 min period per cell in each condition. Miniature excitatory postsynaptic currents were recorded in the presence of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline (BIC) 20  $\mu$ M, and the Na<sub>v</sub> channels blocker TTX (0.5  $\mu$ M) and were confirmed by their complete inhibition in the presence of 20  $\mu$ M CNQX and 100  $\mu$ M APV. Both miniature and spontaneous postsynaptic currents were detected using an automatic template detection program (pCLAMP; Molecular Devices) and verified manually. To

generate the average trace of mEPSC for a given experimental condition, all the events from every neuron recorded for two minutes per condition were averaged<sup>22</sup>. 24 h immediately before use, half of the dishes in a set of cultures were treated with 5 nM CTX 3C, whereas the other half were left untreated. All data were obtained in parallel from CTX 3C-treated and age-matched sister control cultures.

### **Western Blotting**

After 24 hours of treatment with either TTX, CTX 3C or a co-incubation of both compounds, 10 DIV neurons were lysed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing a phosphatase/protease cocktail inhibitor (Roche). The protein concentration in the lysates was determined by the Bradford assay. Samples of cell lysates containing 20 µg of total protein were resolved in gel loading buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 20% glycerol, 0.05% bromophenol blue, pH 6.8) by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (Millipore). The Snap i.d. protein detection system was used for blocking and antibody incubation as previously described<sup>26</sup>. The concentrations of primary antibodies employed in this work are shown in Table 1. The immunoreactive bands were detected using the Supersignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) and the Diversity 4 gel documentation and analysis system (Syngene, Cambridge, U.K.). Chemiluminescence was measured with the Diversity GeneSnap software (Syngene). β-Actin was used as control for lane loading and to normalize chemiluminescence values. Each condition was analyzed per duplicate in each experiment and at least 4 experiments were performed per antibody.

### **Toxins and drugs used**

The standard of CTX 3C was synthesized by Dr. Masahiro Hirama following previously described procedures (Hirama, 2005; Hirama et al., 2001; Inoue et al., 2002) and dissolved at a concentration of 10 µM in DMSO. Following dilutions were performed in deionized water. TTX was purchased from CIFGA (Lugo, Spain), D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV) and BIC were purchased from Sigma and 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) was from Tocris. The final concentration of compound solvent (DMSO) was less than 0.01%. All other chemicals were reagent grade and purchased from Sigma.

### **Statistical Analysis**

Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (s.e.m) of  $n$  determination. Error bars on the graphs represent s.e.m. Statistical comparisons between two groups were made by two tailed paired Student's  $t$  test.  $p$  values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **CTX 3C enhances the expression of Arc and Egr1 through $Na_v$ channels**

The first genes that undergo modulation of expression after neuronal stimulation are IEGs such as Arc and Egr1, whose induction occur within minutes and is transient in nature<sup>27-29</sup>. Since the induction of Arc mRNA peaks within 30 min and 2h of elevated network activity<sup>29</sup>, the effect on Arc and Egr1 mRNA expression was measured after 30 min of exposure of cortical neurons to CTX 3C. As shown in Figure 1, CTX 3C produced a fivefold increase in Arc mRNA levels and a threefold increase in Egr1 mRNA levels compared to control conditions ( $p < 0.01$  in both cases). However, when cells were incubated for 10 minutes with TTX before the 30 min CTX 3C treatment, Arc or Egr1 mRNA levels were not affected by CTX 3C indicating that the effect of this toxin on the levels of these IEGs primarily depends on TTX-sensitive  $Na_v$  channels.

### **Effect of chronic CTX 3C treatment in voltage gated potassium and sodium channel currents**

Once confirmed that CTX 3C produces activation of cortical networks, the effect of a chronic exposure of cortical neurons to the toxin was evaluated. First, the effect of a 24 h exposure of cortical neurons to CTX 3C was evaluated in  $Na_v$  and  $K_v$  channels since the primary target of CTXs are  $Na_v$  channels but CTXs can also act on  $K_v$  channels in some neuronal preparations<sup>30</sup>. However, the effect of a chronic exposure of cortical neurons to CTXs on these channels has not been previously evaluated. In all experiments neurons were treated with the synthetic ciguatoxin CTX 3C at 5 nM, a concentration that acutely activates  $Na_v$  channels leading to membrane depolarization and is not neurotoxic at 24 hours<sup>11</sup>. To measure voltage gated  $K^+$  currents ( $I_K$ ), neurons were voltage clamped at a membrane holding potential of -60 mV, and total  $I_K$  was evoked by 200 ms

depolarizing pulses from  $V_m$  to +75 mV in 15 mV steps (Figure 2, inset). Voltage gated potassium currents were not studied in isolation during the course of these experiments, but the effect of CTX 3C on voltage-gated sodium currents ( $I_{Na}$ ) was evaluated in parallel (see materials and methods). Thus, whole-cell currents consisted of voltage-gated sodium currents (downward deflection in the current recording) and voltage-gated potassium currents. Representative potassium and sodium currents in control cells and in neurons treated with 5 nM CTX 3C for 24 h are shown in Figure 2A and Figure 2B, respectively. As illustrated in Figure 2C, the current-voltage curve of  $K_V$  was not affected by the toxin ( $n = 10$  control cells and  $n = 17$  cells treated with 5 nM CTX 3C for 24 hours) neither it was the  $I_K$  activation threshold (about -45 mV). However, as shown in the left panel of Figure 2D, in treated neurons  $I_{Na}$  was decreased by  $62.9 \pm 5.8 \%$  ( $p < 0.001$ ;  $n = 10$  control cells and  $n = 17$  treated cells). Moreover, CTX 3C shifted the  $I_{Na}$  activation threshold to more negative membrane potentials. As shown in the right panel of Figure 2D, the  $I_{Na}$  activation threshold was shifted from  $-36.2 \pm 3.9$  mV in control cells to  $-54.4 \pm 5.6$  mV in CTX 3C treated cells ( $p = 0.002$ ;  $n = 12$  control cells and  $n = 11$  cells treated for 24 h with 5 nM CTX 3C).

### **Chronic CTX 3C exposure induces depolarization and decreases neuronal spiking in cortical neurons**

Ciguatoxins cause membrane depolarization in several cellular models<sup>31</sup>. In order to evaluate the effect of 24 h exposure of cortical neurons to CTX 3C on membrane potential and spiking activity, whole-cell current clamp experiments were performed in 10-13 DIV cortical neurons. As shown in Figure 3, the firing activity of treated cortical neurons was reduced. A typical spiking pattern of a control neuron and a neuron treated with 5 nM CTX 3C for 24 h and the resting membrane potential in both cases are shown in Figure 3A upper and lower panel, respectively. As shown in Figure 3B (left panel), the firing rate was  $1.0 \pm 0.2$  Hz in control conditions whereas in neurons treated with CTX 3C, this rate was reduced to  $0.5 \pm 0.1$  Hz ( $n = 20$  and  $n = 19$  respectively;  $p = 0.03$ ). Moreover, as indicated in the middle panel and right panel of Figure 3B the amplitude of the spikes was reduced from  $16.4 \pm 1.8$  mV in control conditions to  $8.6 \pm 1.6$  mV after CTX 3C exposure ( $n = 20$  and  $n = 19$  respectively;  $p = 0.002$ )

and the membrane potential was significantly depolarized from  $-54.4 \pm 1.0$  mV in control to  $-42.5 \pm 2.1$  mV in cells treated with 5 nM CTX 3C for 24 h ( $p < 0.001$ ).

### **Chronic CTX 3C do not alter mixed spontaneous postsynaptic currents in cortical neurons**

Spontaneous postsynaptic currents, sPSCs, result from a spontaneous action potential in a presynaptic neuron<sup>32</sup> and are involved in the regulation of postsynaptic firing and synapse homeostasis<sup>33, 34</sup>. A typical recording of mixed sPSCs of a control neuron and a neuron treated with 5 nM CTX 3C for 24 h is shown in Figure 4A upper and lower panel, respectively. As shown in Figure 4B, the amplitude, the frequency and the area of mixed sPSCs were not affected in treated neurons ( $n = 25$ ) when compared to control neurons ( $n = 31$ ).

### **Chronic CTX 3C increases the frequency but decreases the amplitude of miniature excitatory postsynaptic currents**

Neurons maintain stable firing rates through homeostatic regulation of many aspects of neuronal excitability such as the regulation of excitatory synaptic strength<sup>35</sup>. The enhancement in the levels of Arc and Egr1 mRNA by CTX 3C were indicative of an increase in synaptic activity. These IEGs are implicated in the molecular mechanisms of homeostatic plasticity<sup>15, 29</sup> and it has been reported that Arc mediates the homeostatic response to increased activity by a pathway that ultimately downscales excitatory synaptic strength<sup>36</sup>. For the purpose of evaluating the effect of CTX 3C on mEPSCs, these events (isolated as described in the materials and methods section) were analyzed in control and CTX 3C treated neurons. In Figure 5A representative recordings of mEPSCs from control neurons (left panel) and neurons exposed to 5 nM CTX 3C for 24 h (right panel) are shown. As shown in the left panel of Figure 5B, neurons exposed for 24 hours to CTX 3C exhibited an increase in the frequency of mEPSCs from  $0.7 \pm 0.2$  Hz in control conditions to  $2.1 \pm 0.6$  Hz in treated neurons ( $n = 6$  and  $n = 7$  respectively,  $p < 0.05$ ). However, as shown in the right panel of Figure 5B, 5 nM CTX 3C significantly decreased mEPSCs amplitude from  $33.8 \pm 4.0$  pA in control conditions to  $24.8 \pm 2.6$  pA in treated neurons ( $n = 6$  and  $n = 7$  respectively,  $p < 0.05$ ). Average mEPSCs of control neurons and

CTX 3C-treated neurons are shown in the left panel of Figure 5C. mEPSC kinetics were examined by scaling and overlaying average mEPSCs waveforms. This revealed no differences in the rise time kinetics, however, the decay time was slightly slower in treated neurons (Figure 5C right panel).

### **Chronic treatment with CTX 3C reduces the levels of AMPA and NMDA receptors and this effect is blocked by TTX**

The decrease in mEPSCs amplitude after a chronic neuron exposure to CTX 3C indicated changes in postsynaptic glutamate receptors. Indeed, Arc-mediated endocytosis of surface glutamate receptors is a key part of the homeostatic response to elevated activity<sup>37, 38</sup> so it seemed likely that the chronic CTX 3C treatment would have consequences in glutamate receptors expression. In order to confirm that hypothesis, the effect of a 24 h exposure of cortical neurons to CTX 3C in the expression of AMPA and NMDA receptors was evaluated. Thus, cortical neurons were exposed for 24 hours to three different conditions: 5 nM CTX 3C alone, 5 nM CTX 3C + 0.5  $\mu$ M TTX and 0.5  $\mu$ M TTX alone was used as a positive control. When combined with CTX 3C, TTX was added 10 minutes prior to the addition of CTX 3C in order to ensure that Na<sub>v</sub> channels were blocked. TTX alone was used as a positive control since a chronic treatment with this Na<sub>v</sub> channels blocker has been shown to enhance the expression of AMPA and NMDA receptors<sup>24</sup>. As illustrated in Figure 6, pretreatment of cortical neurons with CTX 3C, induced a decrease in the NMDA receptor subunits NR2A and NR2B and in the AMPA receptor GluR2/3 subunit. As shown in Figure 6A, protein levels of NMDA receptor subunits NR2B were decreased 24 h after CTX 3C treatment by  $16.9 \pm 5.5\%$  respect to control ( $p < 0.01$ ). Conversely, activity blockade with TTX increased total levels of NR2B protein by  $25.5 \pm 11.4\%$  ( $p < 0.05$ ) and when CTX 3C and TTX were co-incubated, the band intensity of NR2B antibody was enhanced by  $32.3 \pm 11.4\%$  ( $p < 0.05$ ) indicating that the effect of TTX prevailed to that of CTX 3C. As shown in Figure 6B protein levels of NMDA receptor subunit NR2A were decreased 24 h after CTX 3C treatment by  $30.4 \pm 17.0\%$  respect to control ( $p < 0.05$ ). However, activity blockade with TTX or a co-incubation of TTX and CTX 3C did not affect NR2A levels compared to control conditions. As shown in Figure 6C, protein levels of the AMPA receptor subunits GluR2/3 were

decreased 24 h after CTX 3C treatment by  $21.3 \pm 8.5\%$  ( $p < 0.05$ ). This effect was prevented by co-incubation with TTX. Moreover, treatment with TTX alone increased the expression of this protein by  $42.9 \pm 14.1\%$  ( $p < 0.05$ ). These results show that, the  $\text{Na}_v$  channels activator CTX 3C and the  $\text{Na}_v$  channels blocker TTX produce opposite effects on the expression of NMDA and AMPA receptors indicating a bidirectional homeostatic compensation at the level of receptor surface expression. Furthermore, in all cases the blockade of  $\text{Na}_v$  channels with TTX prevented the decrease in the level of NMDA and AMPA receptor surface expression produced by CTX 3C.

## DISCUSSION

Ciguatera is a widespread and severe form of food poisoning that cause clinically important long term neurological features that are believed to be a direct consequence of the interaction of CTX with  $\text{Na}_v$  channels<sup>1, 2</sup>. Although ciguatera poisoning is rarely fatal, morbidity may be high, and in some cases symptomatology, that is neurologic in more than 80% of cases, may be prolonged for several months or even years<sup>4</sup>. Neurological features of ciguatera food poisoning include peripheral sensory or motor symptoms and central symptoms such as severe or prolonged distressing headache, confusion, memory disturbance, convulsions and coma<sup>4</sup>. Some authors argue that the unique effects of ciguatoxins on  $\text{Na}_v$  channels do not fully explain the wide range of neurological symptoms elicited by this toxin<sup>39</sup>, however, the chronic effect of ciguatoxins on  $\text{Na}_v$  channels and its involvement in other underlying mechanisms leading to chronic perturbations in activity has not been elucidated in central neurons so far. Therefore, in order to better understand the molecular basis of the neurological symptoms of ciguatera, it is important to determine the effects that a chronic CTX treatment represents to central neurons.

Immediate early genes act as messengers in coupling short-term neuronal activity with changes at the level of gene transcription<sup>40</sup>. Our data clearly shows that CTX 3C enhanced cortical network activity in a  $\text{Na}_v$  channels dependent manner as evidenced by an increase in the mRNA level of Arc and Egr1 that was prevented by TTX. Egr1 is a regulatory transcription factor IEG and has a

strong influence on long-term cellular homeostasis by regulating the expression of other genes<sup>28</sup>. On the other hand, Arc is a direct effector IEG that is induced as soon as 5 min after neuronal activity stimulation and last about 8 h<sup>27</sup>. Arc has a wide range of cellular functions including those related to synaptic modifications that underlie synaptic plasticity<sup>13, 40</sup>. In this sense Arc is responsible for scaling synaptic glutamate receptors following chronic activity manipulations<sup>29, 41</sup>.

Here, the ability of CTX 3C to shift the activation curve of Na<sub>v</sub> channels to more hyperpolarizing potentials leading to membrane depolarization of cortical neurons<sup>11</sup> was maintained 24 hours after of CTX 3C exposure. Despite the fact that spiking activity in CTX 3C-treated neurons was significantly decreased compared to control conditions, it was not completely abolished. The same occurred with the depolarization observed after a chronic exposure cortical neurons to CTX 3C that accounted for about 8 mV against the stronger depolarization elicited by an acute administration of CTX 3C. However, the sPSCs of CTX 3C treated neurons did not reveal differences when compared to sPSCs of control neurons again indicating a restoration in neuronal activity since in our previous report evaluating an acute exposure of cortical neurons to CTX 3C, sPSCs amplitude was increased after toxin administration. In theory, if a compensatory mechanism occurs it would be expected that the firing activity should return to basal levels. In this direction, depolarization is an important signal to trigger homeostatic plasticity in central neurons<sup>12</sup>. The fact that membrane potential and electrical activity were only partially restored when the treatment was chronic indicated that neurons used compensatory mechanisms in an attempt to return neuronal activity into normal levels but probably neurons need more than 24 hours to fully restore their basal firing activity and membrane potential.

In order to avoid falling silent or runaway excitation, cortical networks use different homeostatic mechanisms that can regulate synaptic strength or neurotransmitter function in neurons. One of these mechanisms is synaptic scaling and produces an up-regulation or down-regulation of the amplitude of all of their excitatory synapses in an activity-dependent manner<sup>21, 22</sup>. In this sense pharmacological manipulations of neuronal activity induce compensatory changes in the strength of glutamatergic synapses. Decreased activity (for

example due to the blockade of action potential generation with TTX) enhances the strength of excitatory synapses and is reflected by an increase in the amplitude of mEPSCs<sup>21, 22, 24, 41, 42</sup>. On the contrary when neuronal activity is heightened, homeostatic mechanisms operate down-regulating the strength of all excitatory synapses<sup>35</sup> by removing glutamate receptors from synapses<sup>22</sup> which is reflected by a reduction in mEPSCs amplitude<sup>12, 21</sup>. However, as far as we know, there is no evidence of whether a chronic activation of Na<sub>v</sub> channels, which in theory means the opposite manipulation than treating cells with TTX (CTX activates Na<sub>v</sub> channels whereas TTX blocks these channels), mediates synaptic scaling in an opposite manner than TTX does. Here the amplitudes of mixed AMPA and NMDA mEPSCs were significantly decreased in treated neurons when compared to control neurons, indicating that glutamatergic synaptic strength was scaled down by chronic CTX 3C. Possible signals that transduce high levels of activity into a reduction in mEPSC amplitude are changes in firing rate, changes in glutamate receptor activation and changes in neuronal depolarization<sup>12, 24, 25</sup>. Taking into account that this is the first time that a downscaling of mEPSCs is achieved by a Na<sub>v</sub> channels activator, since the vast majority of pharmacological manipulations use bicuculline to downscale mEPSCs, we hypothesize that the CTX 3C induced depolarization, which is maintained after 24 hours of treatment, may have contributed to this effect. In this sense, it has been previously suggested that depolarization alone, in the absence of action-potential generation, is sufficient to down-regulate the amplitude of mEPSC<sup>12</sup> and, for example, a 24 h depolarizing stimulus with KCl produces a decrease of AMPA receptor levels in rat cortical neurons<sup>43</sup>.

The electrophysiological evidence that CTX 3C induced synaptic scaling suggesting down-regulation of glutamate receptors was confirmed at the biochemical level since protein levels of AMPA and NMDA receptors were decreased after CTX 3C treatment. These results are in full agreement with other studies reporting that chronically elevated network activity (by picrotoxin), decreased the levels of the NMDA receptor subunits NR2A and NR2B and the AMPA receptor subunit GluR1 and GluR2<sup>29</sup>. Also consistent with our results, activity blockade with TTX increased total protein levels of the NMDA receptor subunit NR2B without affecting NR2A subunit<sup>29</sup>. In that study, 48 h activity blockade with TTX did not increase the levels of AMPA receptor subunits<sup>29</sup>.

However, in our study AMPA receptor subunit GluR2/3 was increased in neurons treated with TTX for 24 h which is agreement with other report indicating that a 24 h of activity blockade by TTX in cultured neurons results in an increase of the AMPA receptors accumulation as revealed by immunocytochemistry experiments <sup>44</sup>. Overall, the effects of CTX 3C on excitatory transmission, including the reduction in the amplitude of mEPSCs that was consistent with a decrease in the levels of glutamate receptors, are supported by the enhancement of neuronal activity produced by CTX 3C evidenced by an induction of Arc mRNA. In this direction, in order to normalize excitatory drive under heightened levels of network activity, Arc mRNA levels increase and Arc mRNA is made into the protein Arc, which interacts with endophilins of the postsynaptic endocytic machinery reducing cell surface levels of glutamate receptors <sup>29, 37, 41, 45, 46</sup>, which is in accordance to our results.

Interestingly, a chronic CTX 3C treatment produced several effects in cortical neurons that can be related to certain long-term symptoms observed in ciguatera food poisoning in humans. In this sense, Arc and Egr1 play important roles in synaptic plasticity and memory functions <sup>28, 47</sup> so the novel finding that CTX 3C enhances the mRNA expression of these IEGs could be associated to the memory dysfunction that can appear in some cases of ciguatera <sup>4</sup>. On the other hand, chronic pain is a common symptom of ciguatera <sup>4</sup>. While peripheral and spinal sensitization contribute to early phases of chronic pain, late and persistent changes in cortical regions are necessary for maintaining chronic pain <sup>48, 49</sup>. Here, the increase in the frequency of mEPSCs in CTX 3C treated neurons indicates an increase of glutamate vesicles release and this presynaptic alteration is associated with chronic pain <sup>50, 51</sup>. Furthermore, other neurological alterations that are common in ciguatera food poisoning such as fatigue, weakness and depression <sup>52</sup> are related to alterations in synaptic transmission resulting from decreased excitatory activity <sup>53</sup> that, here, was reflected by a decrease in mEPSCs amplitude and a decrease in the protein levels of glutamate receptors.

Understanding the neuronal behavior after long term exposure to ciguatoxins may help to better understand the neurological symptoms of the threatening food poisoning ciguatera. In this direction, the results presented in this work indicate that ciguatoxin enhances neuronal activity via Na<sub>v</sub> channels and in

order to prevent over-excitation neurons use long term homeostatic mechanisms that tend to restore neuronal activity to basal levels.

## FUNDING

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofounded-grants: From Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain: AGL2009-13581-CO2-01, AGL2012-40485-CO2-01. From Xunta de Galicia, Spain: 10PXIB261254 PR. From the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA-Research Executive Agency <http://ec.europa.eu/research/rea> (FP7/2007-2013) under grant agreement Nos. 211326-CP (CONFIDENCE), 265896 BAMMBO, 265409  $\mu$ AQUA, and 262649 BEADS, 315285 Ciguatools and 312184 PharmaSea. From the Atlantic Area Programme (Interreg IVB Trans-national): 2009-1/117 Pharmatlantic.

## ABBREVIATIONS

CTX, ciguatoxin; mEPSCs, miniature excitatory postsynaptic currents; Nav channels, voltage-dependent sodium channels; TTX, tetrodotoxin; GluRs, postsynaptic glutamate receptors; BIC, bicuculline; APV, D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione;  $K_v$ , voltage gated potassium channels; sPSC, spontaneous postsynaptic current,  $V_m$ , membrane potential; NR2A, NMDA receptor 2A; NR2B, NMDA receptor 2B.

## REFERENCES

- (1) Lombet, A., Bidard, J. N., and Lazdunski, M. (1987) Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent  $Na^+$  channel. *FEBS Lett*, *219*, 355-359.
- (2) Bidard, J. N., Vijverberg, H. P., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A. M., Bagnis, R., and Lazdunski, M. (1984) Ciguatoxin is a novel type of  $Na^+$  channel toxin. *J Biol Chem*, *259*, 8353-8357.
- (3) Catterall, W. A., Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., and Scheuer, T. (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, *49*, 124-141.
- (4) Pearn, J. (2001) Neurology of ciguatera. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *70*, 4-8.
- (5) Lehane, L., and Lewis, R. J. (2000) Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int J Food Microbiol*, *61*, 91-125.
- (6) Lewis, R. J. (2001) The changing face of ciguatera. *Toxicon*, *39*, 97-106.
- (7) Rose, C. R., and Konnerth, A. (2001) NMDA receptor-mediated  $Na^+$  signals in spines and dendrites. *J Neurosci*, *21*, 4207-4214.

- (8) George, J., Dravid, S. M., Prakash, A., Xie, J., Peterson, J., Jabba, S. V., Baden, D. G., and Murray, T. F. (2009) Sodium channel activation augments NMDA receptor function and promotes neurite outgrowth in immature cerebrocortical neurons. *J Neurosci*, *29*, 3288-3301.
- (9) Rose, C. R., Kovalchuk, Y., Eilers, J., and Konnerth, A. (1999) Two-photon Na<sup>+</sup> imaging in spines and fine dendrites of central neurons. *Pflugers Arch*, *439*, 201-207.
- (10) George, J., Baden, D. G., Gerwick, W. H., and Murray, T. F. (2012) Bidirectional influence of sodium channel activation on NMDA receptor-dependent cerebrocortical neuron structural plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*, 19840-19845.
- (11) Martin, V., Vale, C., Antelo, A., Hirama, M., Yamashita, S., Vieytes, M. R., and Botana, L. M. (2014) Differential Effects of Ciguatoin and Maitotoxin in Primary Cultures of Cortical Neurons. *Chem Res Toxicol*.
- (12) Leslie, K. R., Nelson, S. B., and Turrigiano, G. G. (2001) Postsynaptic depolarization scales quantal amplitude in cortical pyramidal neurons. *J Neurosci*, *21*, RC170.
- (13) Guzowski, J. F. (2002) Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*, *12*, 86-104.
- (14) Tischmeyer, W., and Grimm, R. (1999) Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci*, *55*, 564-574.
- (15) Penke, Z., Morice, E., Veyrac, A., Gros, A., Chagneau, C., LeBlanc, P., Samson, N., Baumgartel, K., Mansuy, I. M., Davis, S., and Laroche, S. (2014) Zif268/Egr1 gain of function facilitates hippocampal synaptic plasticity and long-term spatial recognition memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *369*, 20130159.
- (16) Tzingounis, A. V., and Nicoll, R. A. (2006) Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron*, *52*, 403-407.
- (17) Guzowski, J. F., Timlin, J. A., Roysam, B., McNaughton, B. L., Worley, P. F., and Barnes, C. A. (2005) Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr Opin Neurobiol*, *15*, 599-606.
- (18) Burrone, J., O'Byrne, M., and Murthy, V. N. (2002) Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature*, *420*, 414-418.
- (19) Turrigiano, G. (2007) Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback. *Curr Opin Neurobiol*, *17*, 318-324.
- (20) Turrigiano, G. G. (1999) Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci*, *22*, 221-227.
- (21) Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C., and Nelson, S. B. (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, *391*, 892-896.
- (22) Watt, A. J., van Rossum, M. C., MacLeod, K. M., Nelson, S. B., and Turrigiano, G. G. (2000) Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses. *Neuron*, *26*, 659-670.
- (23) Engelman, H. S., and MacDermott, A. B. (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci*, *5*, 135-145.
- (24) O'Brien, R. J., Kamboj, S., Ehlers, M. D., Rosen, K. R., Fischbach, G. D., and Huganir, R. L. (1998) Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron*, *21*, 1067-1078.
- (25) Lissin, D. V., Gomperts, S. N., Carroll, R. C., Christine, C. W., Kalman, D., Kitamura, M., Hardy, S., Nicoll, R. A., Malenka, R. C., and von Zastrow, M. (1998) Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*, 7097-7102.

- (26) Vale, C., Alonso, E., Rubiolo, J. A., Vieytes, M. R., LaFerla, F. M., Gimenez-Llort, L., and Botana, L. M. (2010) Profile for amyloid-beta and tau expression in primary cortical cultures from 3xTg-AD mice. *Cell Mol Neurobiol*, 30, 577-590.
- (27) Cirelli, C., and Tononi, G. (2000) Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle. *Brain Res*, 885, 303-321.
- (28) Knapska, E., and Kaczmarek, L. (2004) A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Prog Neurobiol*, 74, 183-211.
- (29) Bateup, H. S., Denefrio, C. L., Johnson, C. A., Saulnier, J. L., and Sabatini, B. L. (2013) Temporal dynamics of a homeostatic pathway controlling neural network activity. *Front Mol Neurosci*, 6, 28.
- (30) Perez, S., Vale, C., Alonso, E., Alfonso, C., Rodriguez, P., Otero, P., Alfonso, A., Vale, P., Hiram, M., Vieytes, M. R., and Botana, L. M. (2011) A comparative study of the effect of ciguatoxins on voltage-dependent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in cerebellar neurons. *Chem Res Toxicol*, 24, 587-596.
- (31) Meunier, F. A., Mattei, C., and Molgo, J. (2009) Marine toxins potentially affecting neurotransmitter release. *Prog Mol Subcell Biol*, 46, 159-186.
- (32) Clements, J. D., and Bekkers, J. M. (1997) Detection of spontaneous synaptic events with an optimally scaled template. *Biophys J*, 73, 220-229.
- (33) Carter, A. G., and Regehr, W. G. (2002) Quantal events shape cerebellar interneuron firing. *Nat Neurosci*, 5, 1309-1318.
- (34) Frank, C. A., Kennedy, M. J., Goold, C. P., Marek, K. W., and Davis, G. W. (2006) Mechanisms underlying the rapid induction and sustained expression of synaptic homeostasis. *Neuron*, 52, 663-677.
- (35) Turrigiano, G. G., and Nelson, S. B. (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 5, 97-107.
- (36) Korb, E., Wilkinson, C. L., Delgado, R. N., Lovero, K. L., and Finkbeiner, S. (2013) Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity. *Nat Neurosci*, 16, 874-883.
- (37) Chowdhury, S., Shepherd, J. D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R. S., Plath, N., Kuhl, D., Hugarir, R. L., and Worley, P. F. (2006) Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 52, 445-459.
- (38) Rial Verde, E. M., Lee-Osbourne, J., Worley, P. F., Malinow, R., and Cline, H. T. (2006) Increased expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron*, 52, 461-474.
- (39) Kumar-Roine, S., Matsui, M., Chinain, M., Laurent, D., and Pauillac, S. (2008) Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatoxin. *Nitric Oxide*, 19, 21-28.
- (40) Lanahan, A., and Worley, P. (1998) Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol Learn Mem*, 70, 37-43.
- (41) Shepherd, J. D., Rumbaugh, G., Wu, J., Chowdhury, S., Plath, N., Kuhl, D., Hugarir, R. L., and Worley, P. F. (2006) Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron*, 52, 475-484.
- (42) Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Garner, C. C., Tsien, R. Y., Ellisman, M. H., and Malenka, R. C. (2004) Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci*, 7, 244-253.
- (43) Orlandi, C., La Via, L., Bonini, D., Mora, C., Russo, I., Barbon, A., and Barlati, S. (2011) AMPA receptor regulation at the mRNA and protein level in rat primary cortical cultures. *PLoS One*, 6, e25350.
- (44) Wierenga, C. J., Ibata, K., and Turrigiano, G. G. (2005) Postsynaptic expression of homeostatic plasticity at neocortical synapses. *J Neurosci*, 25, 2895-2905.

- (45) Flavell, S. W., and Greenberg, M. E. (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, *31*, 563-590.
- (46) Siddoway, B., Hou, H., and Xia, H. (2014) Molecular mechanisms of homeostatic synaptic downscaling. *Neuropharmacology*, *78*, 38-44.
- (47) Korb, E., and Finkbeiner, S. (2011) Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci*, *34*, 591-598.
- (48) Wang, H., Wu, L. J., Kim, S. S., Lee, F. J., Gong, B., Toyoda, H., Ren, M., Shang, Y. Z., Xu, H., Liu, F., Zhao, M. G., and Zhuo, M. (2008) FMRP acts as a key messenger for dopamine modulation in the forebrain. *Neuron*, *59*, 634-647.
- (49) Zhuo, M. (2008) Cortical excitation and chronic pain. *Trends Neurosci*, *31*, 199-207.
- (50) Zhuo, M. (2005) Targeting central plasticity: a new direction of finding painkillers. *Curr Pharm Des*, *11*, 2797-2807.
- (51) Descalzi, G., Kim, S., and Zhuo, M. (2009) Presynaptic and postsynaptic cortical mechanisms of chronic pain. *Mol Neurobiol*, *40*, 253-259.
- (52) Pearn, J. H. (1997) Chronic fatigue syndrome: chronic ciguatera poisoning as a differential diagnosis. *Med J Aust*, *166*, 309-310.
- (53) Zlott, D. A., and Byrne, M. (2010) Mechanisms by which pharmacologic agents may contribute to fatigue. *PM R*, *2*, 451-455.

## TABLES

**Table 1. List of antibodies and primer pairs used in western blot and qPCR experiments, respectively.**

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. CTX 3C effects on Arc and Egr1 gene expression.** Relative quantification of Arc, and Egr1 mRNAs by real time PCR. RQ in control, CTX, and CTX+TTX treated cells (30 min). RQ: relative quantification using the ribosomal protein coding mRNA RPL13A as housekeeper. \*\* p < 0.01.

**Figure 2. Effect of 24 h CTX 3C on K<sub>v</sub> and Nav channels in cortical neurons.** Neurons were voltage clamped at a membrane holding potential (V<sub>m</sub>) of -60 mV and I<sub>K</sub> was evoked by a 200 ms depolarizing pulse from V<sub>m</sub> to + 75 mV in 15 mV steps (inset). **A and B**, representative recording from a single cortical neuron in control conditions or after 24 h exposure to 5 nM CTX 3C, respectively. Whole-cell currents consisted of voltage-gated sodium currents (downward deflection in the current recording) and voltage-gated potassium currents. Note that 24 h exposure of cortical neurons to 5 nM CTX 3C did not affect I<sub>K</sub>, however it inhibited I<sub>Na</sub>. **C**, current-voltage relationship for I<sub>K</sub> recorded

in control conditions and after 24 h exposure of cortical neurons to 5 nM CTX 3C. **D**, pooled results of all peak sodium currents measured at -15 mV. The effect of 24 h treatment with 5 nM CTX 3C was measured by plotting the percent of inhibition of the peak  $I_{Na}$  (left panel) and the activation threshold of  $I_{Na}$ . CTX 3C considerably reduced the peak  $I_{Na}$  and shifted the activation threshold of  $I_{Na}$  towards more negative values. The number of cells tested is indicated in parentheses. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 3. Effect of 24 h exposure of cortical neurons to CTX 3C in neuronal spiking and membrane potential.** **A**, representative voltage traces of a neuron showing spontaneous firing activity when  $V_m$  was permitted to fluctuate freely in control neurons (upper panel) and in neurons treated for 24 h with 5 nM CTX 3C (lower panel). The presence of 5 nM CTX 3C for 24 h depolarizes the membrane potential (indicated by arrows) and decreases the frequency and amplitude of spontaneous spikes. **B**, pooled results for the effect of a chronic exposure of cortical neurons in the frequency (left panel), amplitude (middle panel) and membrane potential (right panel) of spontaneous neuronal spikes. The number of cells tested is indicated in parentheses. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

**Figure 4. Effect of 24 h CTX 3C in mixed spontaneous postsynaptic currents.** **A**, detailed traces of mixed sPSCs recorded in control and 24 h after 5 nM CTX 3C administration at a holding potential of -80 mV. **B**, pooled results for the effect of a chronic exposure of cortical neurons to CTX 3C in the frequency, amplitude and area of spontaneous mixed postsynaptic currents. The number of cells tested is indicated in parentheses.

**Figure 5. A chronic exposure of cortical neurons to CTX 3C increases the frequency but decreases the amplitude of mEPSCs.** **A**, representative traces of mEPSCs recorded in control neurons (left panel) and in neurons treated for 24 h with 5 nM CTX 3C (right panel). **B**, pooled results for the effect of a chronic exposure of cortical neurons to CTX 3C in frequency and amplitude of mEPSCs; left and right panels respectively. **C**, averaged traces (left panel) and scaled average traces (right panel) of mEPSCs in control neurons and in neurons treated for 24 h with CTX 3C obtained from 7 different cells in each condition. The number of cells tested is indicated in parentheses. \*  $p < 0.05$ .

**Figure 6. Chronic treatment with 5 nM CTX 3C induced changes in glutamate receptors expression.** **A**, representative experiment showing Western blot bands for N2B subunit levels in control and treated neurons (left panel) and the corresponding histogram showing N2B expression levels in controls and neurons treated for 24 hours with 5 nM CTX 3C alone, coincubated with TTX and TTX alone (right panel). The same was done for N2A antibody. **(B)** and GluR2/3 antibody **(C)**. Quantification of the data as obtained from at least 3 independent experiments from 3 different cellular cultures. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (respect to control); #  $< 0.05$ , ##  $p < 0.01$  (respect to CTX 3C).

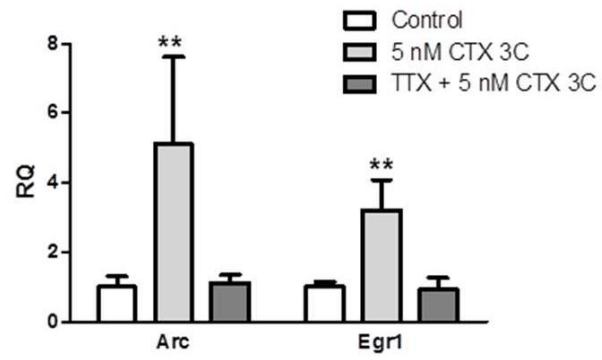


Figure 1



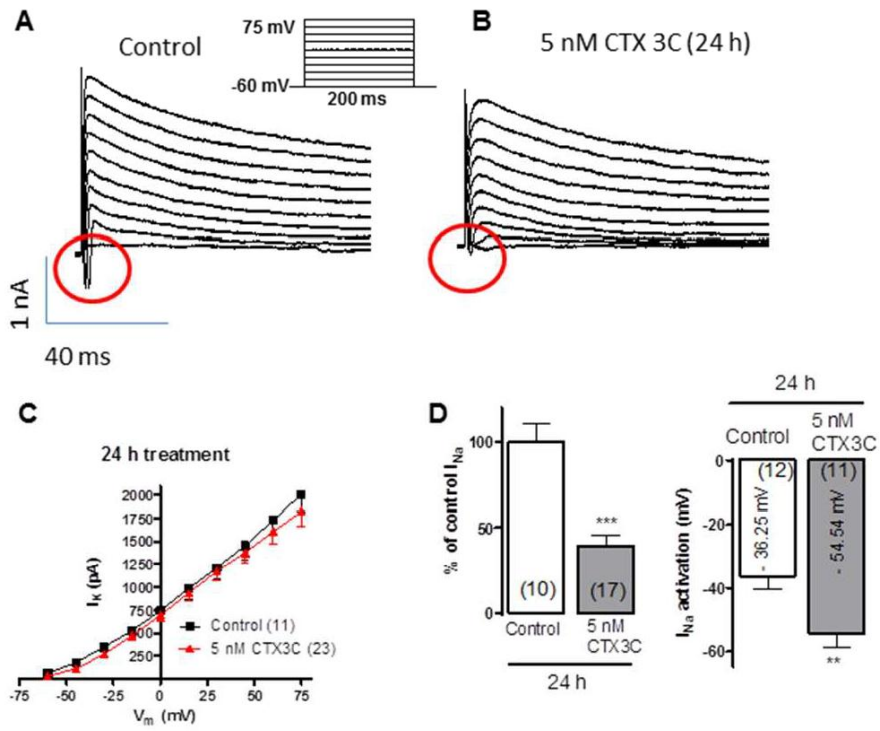


Figure 2



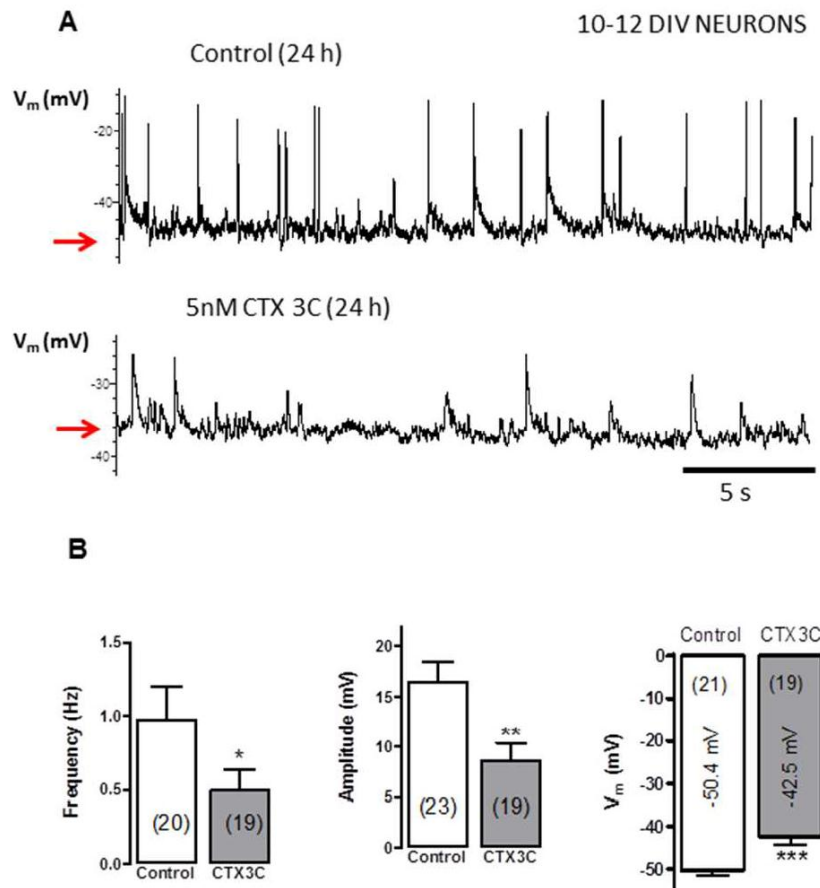


Figure 3



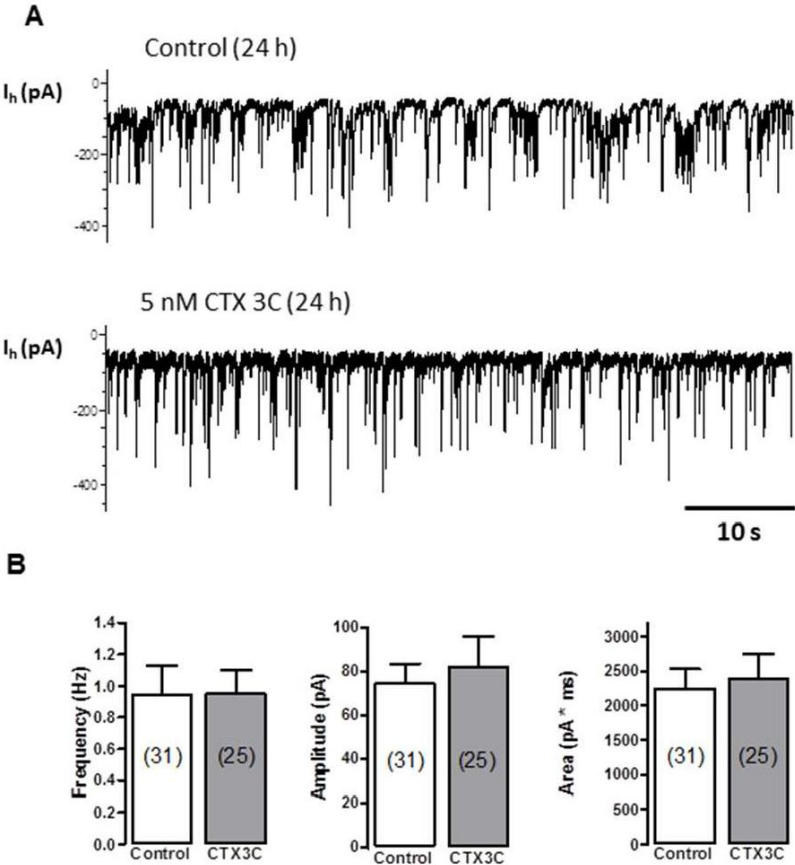


Figure 4



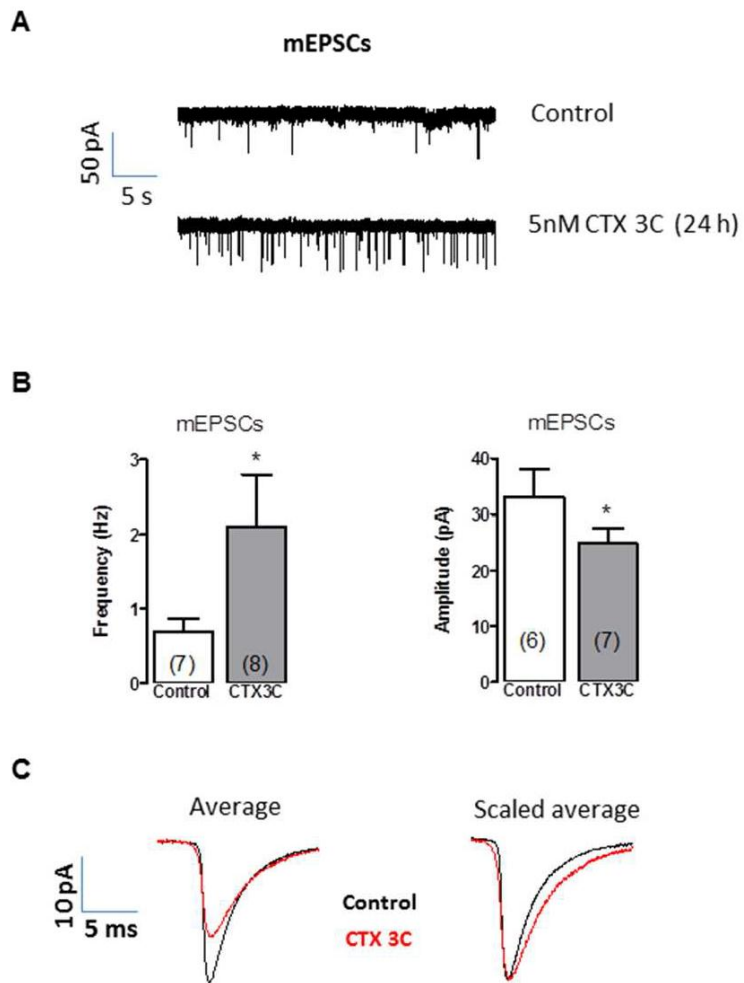


Figure 5



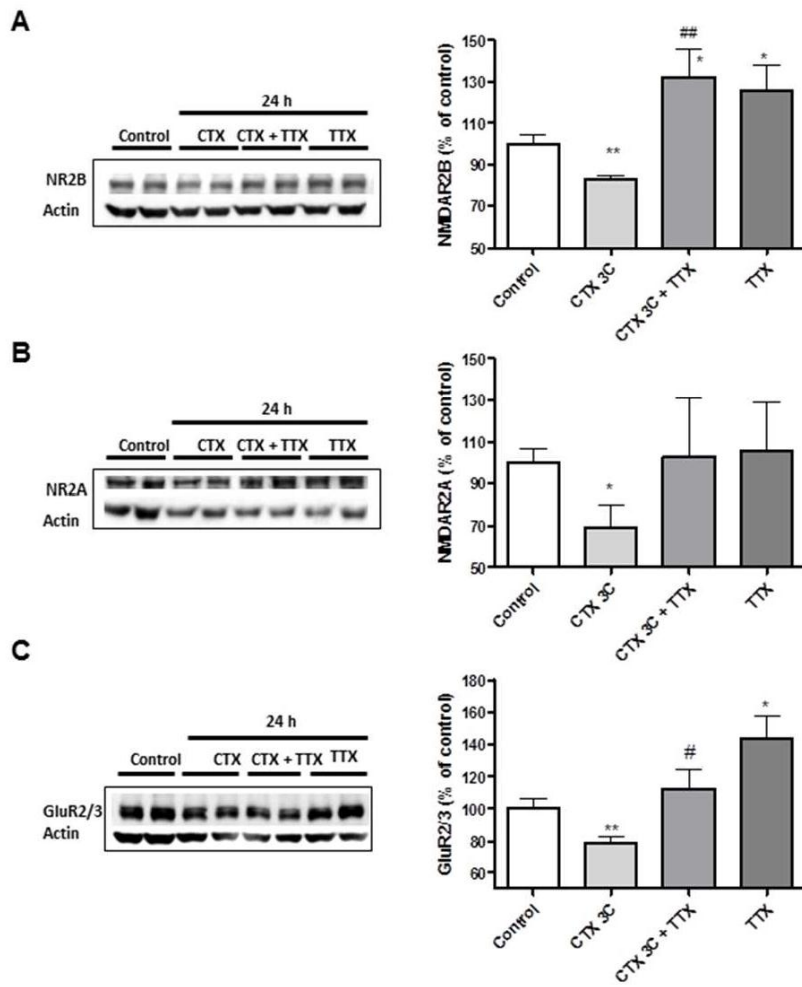


Figure 6



Antibody	Inmunogen	Host	Dilution	Source
NMDA 2A	C-terminal fusion protein rat NMDAR2A aa.1253-1391	rabbit	1:1000	Millipore
NMDA 2B	NMDAR2B aa. 892-1051	mouse	1:500	BD Bioscience
GluR2/3	GluR2/3 aa 864-883	rabbit	1:500	Millipore
Actin	C-terminal actin fragment, clone C4	mouse	1:3000	Millipore

Target <sup>1</sup>	Gene Bank Accession <sup>2</sup>	Sequence <sup>3</sup>	Product length	Melting temperature <sup>4</sup>
ARC	NM_018790.3	GGTGAGCTGAAGCCACAAATG GTATGAATCACTGCTGGGGGC	80	60.07 61.09
EGR1	NM_007913.5	AGCAGCGCCTTCAATCCTCA TCTCCACCATCGCCTTCTCA	109	62.19 60.61
RPL13A <sup>5</sup>	NM_009438.5	GCAAGTTCACAGAGGTCCTCAAGGCATGAGG CAAACAGTCITTA	72	60.49 59.18

**Table 1.** List of antibodies and primer pairs used in western blot and qPCR experiments, respectively.

1 Official gene symbol.

2 Sequences used as templates for primer design.

3 Sequences are 5'->3'. For each target, the first sequence correspond to the forward primer, and the second to the reverse primer.

4 According to NCBI-primer blast.

5 Housekeeping gene.



### **III.1. Potassium currents inhibition by gambierol analogs prevents human T lymphocyte activation**

#### **RESUMEN**

El gambierol es una toxina marina, con estructura de éter policíclico, producida por el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*. Recientemente se describió que los análogos truncados del esqueleto del gambierol, que poseen los anillos EFGH y BCDEFGH del compuesto parental, mostraron una potencia similar al gambierol en la inhibición de los canales de potasio dependientes de voltaje ( $K_v$ ) en neuronas. El gambierol y sus análogos truncados comparten los principales elementos para desarrollar su actividad biológica que son los C28=C29 de doble unión con el anillo H y la cadena lateral insaturada. Dado que los canales  $K_v$  participan en la regulación de la señalización de calcio, la proliferación, la secreción y la migración de linfocitos T humanos, en este trabajo, se evaluó la actividad de los análogos tetracíclico y heptacíclico del gambierol sobre las corrientes de potasio en linfocitos T en reposo y activados así como sus efectos sobre la liberación de interleuquina-2 (IL-2) y sobre la expresión génica en linfocitos T activados. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que los análogos del gambierol inhiben los canales  $K_v$  de linfocitos T tanto en reposo como activados por concanavalina A y previenen la activación de los linfocitos con concanavalina A. Además, estos compuestos afectan negativamente a la expresión de genes involucrados en la proliferación celular y en la respuesta inmune en linfocitos activados por concanavalina. Estos resultados junto con la ausencia de toxicidad en este modelo celular, indican que los análogos heptacíclico y tetracíclico del gambierol podrían tener interés para el desarrollo de fármacos en enfermedades autoinmunes.

---

**Potassium currents inhibition by gambierol analogs prevents human T lymphocyte activation**

Rubiolo, J.A.<sup>1</sup>, Vale, C.<sup>1</sup>, Fuwa, H.<sup>2</sup>, Sasaki, M.<sup>2</sup>, Botana, LM<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain, <sup>2</sup>Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan

*\*Corresponding author: Luis M Botana, Dpto de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27003 Lugo, Spain. e-mail: [Luis.Botana@usc.es](mailto:Luis.Botana@usc.es), Phone/Fax:+34982822233.*

Keywords: gambierol, heptacyclic analogue of gambierol, tetracyclic analogue of gambierol, voltage-gated potassium channels, human T lymphocytes, ciguatoxin, autoimmune diseases.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25155189>



#### **4. DISCUSIÓN**

El fondo marino representa una fuente inagotable de compuestos bioactivos, lo cual, en las últimas décadas, ha despertado el interés de científicos e industrias farmacéuticas. Los compuestos marinos poseen características estructurales y químicas únicas, que dan lugar a diversos mecanismos de acción. Estas moléculas ejercen su actividad sobre una gran variedad de dianas celulares por lo que pueden representar valiosas herramientas farmacológicas en diferentes áreas terapéuticas (cáncer, enfermedades neurodegenerativas, epilepsia, dolor, antivirales, etc.). En este sentido, existen diferentes moléculas de origen marino comercializadas como fármacos y muchas otras en fases avanzadas de desarrollo (Gerwick *et al.*, 2012). El grupo de investigación del Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de Lugo se ha centrado durante años en el estudio de los mecanismos de acción de muchos de estos compuestos, especialmente de las ficotoxinas marinas. Esto ha servido no sólo para desarrollar y optimizar métodos de detección funcionales basados en los mecanismos de acción, sino también para establecer las dianas celulares tanto de nuevos compuestos de origen marino como de ficotoxinas que suponen una amenaza para la salud pública y sobre las que todavía queda mucho por conocer.

En la presente tesis doctoral se han empleado dos modelos celulares *in vitro* ya que estos modelos evitan muchas de las complicaciones de los modelos animales *in vivo* y facilitan los estudios toxicológicos, electrofisiológicos y las manipulaciones farmacológicas empleados en investigación básica (Lesuisse *et al.*, 2002; Schousboe *et al.*, 1985). En primer lugar se empleó como modelo celular el cultivo primario de neuronas de la corteza cerebral, un modelo *in vitro* ampliamente utilizado y caracterizado para el estudio de la diferenciación neuronal, la función sináptica y homeostasis neuronal, la liberación de neurotransmisores, los ensayos de neurotoxicidad y los modelos de enfermedad (Lesuisse *et al.*, 2002; Pozo *et al.*, 2010; Schousboe *et al.*, 1985). Generalmente, los cultivos primarios de neuronas corticales se realizan a partir de embriones de entre 16 a 18 días, ya que a esta edad del desarrollo embrionario el cerebro de ratón presenta una mayor neurogénesis (Bayer *et al.*, 1993). Las neuronas corticales expresan canales de sodio, de potasio y de calcio dependientes de voltaje y, además, generan actividad sináptica espontánea tras unos días en cultivo (Chiappalone *et al.*, 2006). En segundo lugar, se emplearon linfocitos T humanos procedentes de donantes sanos, ya que estas células expresan

canales de potasio dependientes de voltaje y su bloqueo previene la activación de los linfocitos T, lo cuál puede ser beneficioso en el tratamiento de enfermedades inmunomediadas. Por ello, éste es un modelo adecuado para el estudio de los efectos de las ficotoxinas que actúan sobre los canales de potasio dependientes de voltaje, como el gambierol y sus análogos.

En primer lugar, utilizando como base el modelo celular de neuronas corticales, en esta tesis doctoral se analizó el efecto de diversos alcaloides guanidina, producidos por la esponja *Crambe crambe*, sobre los principales canales iónicos dependientes de voltaje en neuronas ya que, previamente, se había descrito que uno de estos compuestos, la Cramb816, bloqueaba los canales de calcio con mayor potencia que la nifedipina, un conocido bloqueante de estos canales (Berlinck *et al.*, 1993). Sin embargo, este efecto no había sido asociado a ningún subtipo de canal de calcio en concreto. Por ello, en la publicación titulada **“Differential effects of crambescins and crambescidin 816 in voltage gated sodium, potassium and calcium channels in neurons”**, se aislaron farmacológicamente los principales subtipos de canales de calcio en neuronas y se demostró que la Cramb816 bloquea principalmente los canales de calcio de la familia  $Ca_v1$ , también conocidos como canales de calcio tipo L. Estos canales participan en la generación de potenciales de acción, en fenómenos de plasticidad sináptica y en la transcripción génica dependiente de la actividad neuronal (Catterall *et al.*, 2005b) y su bloqueo ha sido relacionado con la mejora de la sintomatología de patologías neurodegenerativas asociadas a una edad avanzada, ya que la regulación de estos canales está aumentada en neuronas de ratas adultas (Veng *et al.*, 2003). Por otra parte, a diferencia de la Cramb816, todos los compuestos de la familia crambescina bloquearon los canales de potasio dependientes de voltaje, un efecto que es neuroprotector y ha sido propuesto como estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer (Lavretsky *et al.*, 1992; Wiseman *et al.*, 1991). Estos resultados ofrecen una posible explicación a que la Cramb816 presente una mayor citotoxicidad que la CrambC1 en neuronas corticales (Bondu *et al.*, 2012) ya que la exposición prolongada a bloqueantes de canales de calcio dependientes de voltaje (efecto producido por la Cramb816) es citotóxica (Koh *et al.*, 1992; Takadera *et al.*, 1990) mientras que la disminución de las corrientes de potasio (efecto producido por la CrambC1) reduce la apoptosis neuronal (Yu *et al.*, 1998a; Yu *et al.*, 1997). En general, los resultados presentados

en este trabajo suponen una primera aproximación a los diferentes efectos de los alcaloides de la esponja *Crambe crambe* en canales iónicos dependientes de voltaje en neuronas y sirven de base para estudios futuros.

Indudablemente, las toxinas marinas representan herramientas de gran interés a nivel farmacológico dado el potencial terapéutico de algunos de estos compuestos. Sin embargo, también es importante ampliar la información referente a las dianas celulares de las ficotoxinas marinas, como la ciguatoxina o la maitotoxina, que suponen un elevado riesgo para la salud humana. Se estima que las intoxicaciones por ciguatera suponen entre 50.000 y 200.000 casos anuales, afectando especialmente a las zonas costeras de los océanos Pacífico e Índico y mar Caribe (Dickey *et al.*, 2010). En los últimos años, la prevalencia y la distribución geográfica de esta enfermedad ha aumentado considerablemente y han aparecido casos de intoxicación por ciguatera en Europa, incluyendo las costas españolas (Nunez *et al.*, 2012). La limitación de estudios farmacológicos de las toxinas implicadas en la enfermedad de ciguatera reside, principalmente, en la dificultad de obtención de los compuestos naturales que producen esta intoxicación. Gracias a la colaboración establecida entre el Departamento de Farmacología y la Universidad de Tohoku en Japón, en la presente tesis doctoral se han podido emplear diferentes análogos sintéticos de toxinas involucradas en la enfermedad de ciguatera como la ciguatoxina sintética CTX 3C, la maitotoxina y los análogos heptacíclico y tetracíclico del gambierol. Inicialmente se evaluó el efecto de dos de las toxinas marinas producidas por el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* más relevantes para la intoxicación por ciguatera, la ciguatoxina y la maitotoxina (Satake *et al.*, 1993b) ya que la mayoría de estudios existentes evaluaban los efectos de estas toxinas por separado y en modelos celulares diferentes, lo que dificultaba la identificación de los efectos de cada toxina en un modelo celular común. Por ese motivo y en el contexto de que los dos compuestos son producidos por el mismo dinoflagelado y que parte de la región lipofílica de la maitotoxina es similar a la estructura de la ciguatoxina, en el trabajo titulado "**Differential effects of ciguatoxin and maitotoxin in primary cultures of cortical neurons**" se comparó la actividad de la ciguatoxina sintética CTX 3C con la actividad de la MTX en neuronas corticales. En este trabajo, se obtuvo que la CTX 3C y la MTX comparten algunos mecanismos de acción en un mismo modelo celular, ya que ninguna de las dos toxinas afectó a los canales  $K_v$  o  $Ca_v$  pero ambas

afectaron a los canales  $Na_v$ . Sin embargo, se encontraron diferencias notables, como la entrada de calcio, la acidificación intracelular y la muerte neuronal producidos por la MTX y no por la CTX 3C. Aunque el efecto de la CTX 3C sobre los canales  $Na_v$  ya se había descrito para esta toxina sintética en otros modelos celulares (Ghiaroni *et al.*, 2006; Yamaoka *et al.*, 2004), el hecho de que la MTX también disminuyera la corriente máxima de sodio es un efecto atípico para esta toxina, por lo que pudo tratarse de un efecto inespecífico debido a que el aumento de la concentración de calcio citosólico inducido por la MTX produjera la inactivación dependiente de calcio de los canales de sodio dependientes de voltaje (Torreano *et al.*, 2003). Por otra parte, aunque se sabe que la entrada de calcio al interior celular es el principal efecto de la MTX, existe una gran controversia respecto al mecanismo que lo produce (Cataldi *et al.*, 1999; Gutierrez *et al.*, 1997; Kakizaki *et al.*, 2006; Konoki *et al.*, 1999; Taglialatela *et al.*, 1990). En este trabajo, además de la entrada de calcio al interior celular, la MTX produjo acidificación intracelular. Dado que el pH intracelular es posiblemente el factor fisiológico más importante para la regulación del intercambiador sodio/hidrógeno, es probable que la activación de dicho intercambiador por parte de la MTX (Wang *et al.*, 2009) sea el resultado de un mecanismo celular para compensar la acidificación intracelular producida por la MTX. Aparte de esto, aunque el efecto de los bloqueantes de canales de  $Na_v$  sobre la muerte neuronal mediada por ficotoxinas marinas ya había sido descrito (Vale *et al.*, 2007a), en el presente trabajo la tetrodotoxina retrasó la entrada de calcio, la acidificación intracelular y el efecto citotóxico de la MTX. Considerando estos resultados, se puede concluir que aunque ambos compuestos siguen una misma ruta biosintética y presentan una región lipofílica parecida, la MTX es estructuralmente mucho más compleja que la CTX y posiblemente las diferencias entre los efectos biológicos tengan que ver con el carácter anfifílico de la MTX y únicamente lipofílico de la CTX, mientras que las analogías encontradas puedan atribuirse a que la región lipofílica de la MTX sea similar a la estructura de la CTX 3C.

La sintomatología de la ciguatera es neurológica en más del 80 % de los casos (Pearn, 2001). Aunque tradicionalmente ha sido asociada a la interacción de la CTX con los canales de sodio dependientes de voltaje (Holmes *et al.*, 2001), algunos autores sostienen que ese efecto no es suficiente para desencadenar la diversidad de síntomas neurológicos producidos por una intoxicación con ciguatoxina (Kumar-

Roine *et al.*, 2008). La mayor parte de la bibliografía que aborda los efectos de las ciguatoxinas en la transmisión sináptica se centra en el sistema nervioso periférico (Meunier *et al.*, 2009; Molgo *et al.*, 1990), del cuál derivan síntomas como parestesias en extremidades y prurito (Pearn, 2001). No obstante, la ciguatera también incluye síntomas con origen en el sistema nervioso central y cursa con cefalea, malestar, depresión, fatiga, confusión, alteraciones en la memoria y en algunos casos convulsiones (Friedman *et al.*, 2008; Pearn, 2001). Pese a ello, hasta ahora no se había descrito el efecto de la ciguatoxina sobre la transmisión y plasticidad sináptica en neuronas centrales, lo que consideramos que podría aportar nueva información sobre las bases celulares de la sintomatología neurológica de la ciguatera. Por ello, en la presente tesis se evaluaron los efectos agudos y crónicos de la ciguatoxina sintética CTX 3C sobre la transmisión sináptica en neuronas corticales. En el trabajo titulado **“Synthetic ciguatoxin CTX 3C induces a rapid imbalance of neuronal excitability”**, sometido para revisión en la revista *Chemical Research in Toxicology*, el tratamiento agudo con CTX 3C produjo una rápida despolarización acompañada de un bloqueo total del disparo de potenciales de acción espontáneos. Normalmente, la despolarización celular aumenta la capacidad de disparo neuronal. Sin embargo, se ha descrito que despolarizaciones muy fuertes pueden silenciar el disparo de potenciales de acción (Leslie *et al.*, 2001). En este sentido otras moléculas que modulan los canales  $Na_v$ , como la veratridina, generan lo que se conoce como bloqueo por despolarización, lo cual elimina la capacidad de disparo neuronal al inducir corrientes de sodio persistentes (Bikson *et al.*, 2003). Sin embargo, en el presente estudio cuando el potencial de membrana se fijó a  $-55$  mV, las propiedades de disparo neuronal también disminuyeron tras la adición de la CTX 3C, indicando que dicho efecto no se producía solamente por la despolarización celular sino que otros mecanismos adicionales, activados por la toxina, estaban inhibiendo la actividad neuronal. En esta línea, los circuitos neuronales son susceptibles de inestabilidad cuando el equilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal se ven alterados (Turrigiano, 2008), así, un aumento de la neurotransmisión inhibitoria o una disminución de la neurotransmisión excitadora reducen la actividad neuronal (Turrigiano *et al.*, 2004). En el presente trabajo la CTX 3C moduló la actividad neuronal excitadora e inhibitoria en direcciones opuestas. Por un lado la CTX 3C aumentó la amplitud y la frecuencia de las mIPSCs, reflejando un aumento

de la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> postsinápticos y un aumento de la liberación de GABA al espacio sináptico, respectivamente (Engelman *et al.*, 2004). De acuerdo con esto, la CTX 3C indujo una corriente tónica GABAérgica indicando también la activación de receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos (Farrant *et al.*, 2005), lo cual representa un mecanismo de plasticidad homeostática a corto plazo en la corteza cerebral (Vardya *et al.*, 2008). Por otro lado, la CTX 3C disminuyó la amplitud de las mEPSCs sin alterar su frecuencia, indicando una disminución de la activación de los receptores de glutamato postsinápticos sin cambios en la liberación de vesículas glutamatérgicas. En resumen, la fuerte despolarización y bloqueo de potenciales de acción espontáneos producidos por una exposición aguda de neuronas corticales a CTX 3C, puede tener su explicación en la modulación rápida que la CTX ejerce sobre la neurotransmisión, aumentando las corrientes GABAérgicas inhibitorias y disminuyendo la neurotransmisión excitadora. Resulta interesante que algunos síntomas de la ciguatera, como las alteraciones en la temperatura corporal y la ataxia (Vetter *et al.*, 2012), están relacionados con un aumento de la transmisión GABAérgica (Chiu *et al.*, 2005). A su vez, síntomas como la fatiga, la debilidad y la depresión, también comunes en ciguatera (Pearn, 2001; Pearn, 1997), están producidos por una disminución de la transmisión excitadora, un aumento de la transmisión inhibitoria o ambas (Zlott *et al.*, 2010) lo cual ocurre en neuronas corticales tras una administración aguda de CTX 3C. Aunque por lo general la sintomatología neurológica de ciguatera dura unos días, algunos pacientes pueden sufrir sus secuelas durante varias semanas o incluso meses (Friedman *et al.*, 2008; Pearn, 2001). Por ello resulta importante establecer los efectos a largo plazo de la ciguatoxina en neuronas centrales. Además, como se indicó en la introducción, los mecanismos de homeostasis sináptica necesarios para compensar perturbaciones producidas en la actividad neuronal, suelen ser procesos lentos y son medibles a las 24 h (Turrigiano *et al.*, 2004). Por ello, en el trabajo titulado **“Chronic ciguatoxin treatment induces synaptic scaling in cortical neurons”**, sometido para revisión en la revista *Chemical Research in Toxicology*, se estudió el efecto de una exposición a CTX 3C durante 24 horas sobre la actividad eléctrica y la transmisión sináptica excitadora en neuronas corticales. En primer lugar se estableció el efecto de la CTX 3C sobre la actividad neuronal ya que aunque en el anterior trabajo se obtuvo que una administración aguda de la toxina disminuía la producción de potenciales de

acción espontáneos además de potenciar la transmisión inhibitoria y disminuir la excitadora indicando una disminución de la actividad sináptica, estos indicadores podrían presentar una naturaleza transitoria. Por otra parte, aunque la medición de los potenciales de acción puede emplearse para medir la actividad neuronal, este método puede dar lugar a ambigüedad dado que tanto niveles muy bajos de despolarización (por debajo del umbral necesario para la generación de potenciales de acción) como niveles muy altos de despolarización (que inactivan los canales  $Na_v$ ) eliminan la posibilidad de generación de potenciales de acción (Leslie *et al.*, 2001). Por ello, en el presente trabajo se emplearon como indicadores de actividad neuronal los genes de expresión temprana cuyos niveles de ARNm aumentan rápidamente ante un incremento de la actividad neuronal y son transitorios, manteniéndose elevados durante unas horas (Cirelli *et al.*, 2000). La CTX 3C aumentó los niveles de ARNm de dos genes de expresión temprana, Arc (un gen que codifica para una proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad, del inglés *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*) y Egr1 (del inglés *early growth response 1*) de un modo dependiente de los canales de sodio dependientes de voltaje. En este sentido, se ha descrito que el aumento de actividad de los circuitos neuronales aumentan los niveles de ARNm de Arc y la expresión de la proteína Arc que interacciona con las endofilinas de la maquinaria endocítica postsináptica y reduce los niveles de expresión de los receptores de glutamato (Chowdhury *et al.*, 2006; Flavell *et al.*, 2008). Además, la capacidad de la CTX 3C de desplazar la curva de activación de los canales de sodio dependientes de voltaje a potenciales más negativos (Martin *et al.*, 2014) se mantuvo a las 24 h de tratamiento. Sin embargo, la despolarización neuronal y la disminución de la actividad eléctrica observadas tras la exposición aguda de neuronas corticales a CTX 3C, fueron parcialmente reestablecidas tras el tratamiento crónico, indicando que las neuronas emplean mecanismos compensatorios pero posiblemente necesiten más tiempo que 24 h para restablecer completamente el potencial de membrana y la capacidad de disparo neuronal. Se identificaron varios mecanismos conducentes al restablecimiento de la actividad neuronal tras una exposición crónica a CTX 3C. Por un lado, las amplitudes de los mEPSCs disminuyeron en neuronas tratadas con CTX 3C durante 24 h respecto a las neuronas control, lo cual indicaba una disminución de la expresión de los receptores glutamato. Por otro lado, la evidencia electrofisiológica de que la CTX 3C inducía

equilibrio sináptico se demostró por western blot, pues los niveles de proteína de diferentes subunidades de receptores AMPA y NMDA disminuyeron tras el tratamiento con CTX 3C de un modo dependiente de los canales de sodio dependientes de voltaje. Dado que estos resultados fueron similares a los que se obtienen tras una estimulación crónica de la actividad y opuestos a los que se obtienen tras un bloqueo crónico de la actividad (Ju *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 1998; Turrigiano *et al.*, 1998; Watt *et al.*, 2000) se concluye que las neuronas emplean mecanismos de equilibrio sináptico para compensar la alteración en la actividad neuronal inducida por el efecto de la CTX 3C sobre los canales de sodio dependientes de voltaje. Otro resultado que indirectamente evidencia el mecanismo compensatorio fue el incremento de la actividad neuronal producida por la CTX 3C indicado por el aumento de ARNm de genes de expresión temprana. Conviene destacar que varios de los efectos obtenidos con el tratamiento crónico con CTX 3C en neuronas corticales pueden estar relacionados con algunos síntomas neurológicos crónicos de la ciguatera en humanos. Así, los genes de expresión temprana están involucrados en procesos de plasticidad sináptica y memoria (Knapska *et al.*, 2004; Korb *et al.*, 2011) con lo cuál el hallazgo de que la CTX 3C aumenta los niveles de ARNm de estos genes podría estar asociado con las alteraciones en la memoria a veces presente en pacientes que padecen ciguatera (Pearn, 2001). Por otra parte, la CTX 3C produjo un aumento de la frecuencia de las mEPSCs indicando un incremento de la liberación de vesículas glutamatérgicas en las terminales presinápticas, fenómeno que está asociado al mecanismo celular que produce dolor crónico (Descalzi *et al.*, 2009; Zhuo, 2005), un síntoma común en ciguatera (Pearn, 2001). Aunque las primeras fases del dolor crónico se deben a alteraciones del sistema nervioso periférico, los cambios tardíos y persistentes de la corteza cerebral están asociados a la cronicidad del dolor (Wang *et al.*, 2008; Zhuo, 2008). Otras alteraciones neurológicas comunes en la intoxicación por ciguatoxina como fatiga, debilidad y depresión (Pearn, 2001) están relacionadas con una disminución de la actividad sináptica excitadora (Zlott *et al.*, 2010) que aquí se reflejó en una disminución de la amplitud de las mEPSCs y una disminución de los niveles de proteína de receptores de glutamato. En resumen, este bloque de resultados sobre los efectos agudos y crónicos de la ciguatoxina en la transmisión sináptica de neuronas centrales aportan nueva información acerca del comportamiento de las neuronas tras

dichas exposiciones a CTX 3C y da lugar a una posible explicación sobre la etiopatogenia de algunos de los síntomas neurológicos de ciguatera en humanos. Además, las ciguatoxinas pueden representar una nueva estrategia farmacológica para evaluar la regulación de la homeostasis del sistema nervioso central en futuros estudios.

Otro de los compuestos producido por *G. toxicus* es el gambierol. En la presente tesis doctoral se estudiaron los efectos de los análogos tetracíclico y heptacíclico del gambierol que contienen en su estructura los anillos EFGH y BCDEFGH respectivamente y además poseen los elementos necesarios para ejercer su actividad biológica que son el doble enlace C28=C29 del anillo H y una cadena lateral insaturada (Fuwa *et al.*, 2004). En el trabajo titulado "**Potassium currents inhibition by gambierol analogs prevents human T lymphocyte activation**" se evaluó la actividad biológica de los análogos heptacíclico y tetracíclico del gambierol en linfocitos T humanos. Aunque en el Departamento de Farmacología se había descrito que los dos análogos del gambierol presentan una potencia similar a la del gambierol en el bloqueo de canales de potasio dependientes de voltaje en neuronas (Alonso *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2012) y que, en un modelo *in vitro*, reducen la expresión de proteínas implicadas en la enfermedad de Alzheimer (Alonso *et al.*, 2013), éste es el primer trabajo que evalúa el efecto de los análogos del gambierol en canales de potasio de células humanas. Como se mencionó en la introducción, los canales de potasio en linfocitos humanos son los canales  $K_v1.3$  y los canales  $K_{Ca3.1}$ . El bloqueo de estos canales supone una estrategia para prevenir la activación de los linfocitos T, por lo que los bloqueantes de estos canales han sido propuestos como nuevas alternativas en la terapia de diversas enfermedades como el asma (Bradding *et al.*, 2009). Dado que las citoquinas también están involucradas en las respuestas inmune (Glimcher *et al.*, 2000) y además en la patogénesis del asma (O'Garra, 1998), en el presente estudio también se evaluó el efecto de los análogos del gambierol en la liberación de interleuquina 2. Para estudiar el efecto de los dos análogos del gambierol en linfocitos T activados, se trataron las células con concanavalina A sólo o en combinación con los análogos del gambierol o con TRAM-34, un antagonista de los canales  $K_{Ca3.1}$ . Los resultados obtenidos indican que los análogos del gambierol disminuyen el aumento de las corrientes de potasio así como la liberación de interleuquina 2 inducidos por la activación de los linfocitos con concanavalina A,

con una potencia similar a la del TRAM-34. Con el objetivo de caracterizar de un modo más completo el efecto de los análogos del gambierol en linfocitos humanos, se realizaron experimentos con microarrays en colaboración con investigadores del Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de Lugo. En estos experimentos se obtuvo que los análogos heptacíclico y tetracíclico del gambierol atenuaron el aumento de ARNm de diferentes citoquinas en linfocitos T activados. Por todo ello, los resultados obtenidos indican que los análogos heptacíclico y tetracíclico del gambierol pueden presentar interés potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos de trastornos inmunológicos en humanos.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral indican que los canales iónicos dependientes de voltaje son una importante diana celular tanto para los alcaloides guanidina producidos por la esponja *Crambe crambe* como para las toxinas producidas por el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* estudiadas. Mientras que las crambescinas y la Cramb816 actúan sobre los canales de potasio y los canales de calcio tipo L de neuronas corticales respectivamente, la ciguatoxina y en menor medida la maitotoxina actúan sobre los canales de sodio dependientes de voltaje. Además, los análogos del gambierol bloquean los canales de potasio dependientes de voltaje de linfocitos T humanos. Por otra parte, uno de los aspectos más interesantes de la presente tesis doctoral, por su enfoque novedoso, así como por la información que aporta sobre las bases moleculares de los trastornos neurológicos producidos por ciguatera, es la actividad de la ciguatoxina sobre la regulación de la plasticidad sináptica neuronal. Los efectos descriptivos de la actividad aguda y crónica de la ciguatoxina sobre la transmisión sináptica, sugieren una posible explicación al mecanismo celular implicado en parte de la sintomatología neurológica de la ciguatera.



## **5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS**

1. La crambescidina 816 bloquea los canales de calcio tipo L con mayor potencia que la nifedipina mientras que las crambescinas inhiben las corrientes de potasio dependientes de voltaje.

Crambescidin 816 blocks L type calcium channels with higher potency than nifedipine whereas crambescins inhibit voltage gated potassium currents.

2. La CTX 3C y la MTX presentan similitudes en su actividad ya que no afectan a canales  $Ca_v$  ni  $K_v$  pero sí a canales  $Na_v$ . A diferencia de la CTX 3C, la MTX produce acidificación celular, entrada de calcio al citosol y es citotóxica en neuronas corticales, efectos parcialmente prevenidos por el bloqueo de canales  $Na_v$ .

CTX 3C and MTX share similarities on their activity since they did not affect  $Ca_v$  nor  $K_v$  channels but they affected  $Na_v$  channels. In contrast to CTX 3C, MTX produced cellular acidification, calcium influx and it is cytotoxic to cortical neurons, effects that are partially prevented by the blockade of  $Na_v$  channels.

3. Una exposición aguda a CTX 3C produce despolarización, suprime los potenciales de acción espontáneos e incrementa la transmisión sináptica inhibitoria disminuyendo la excitadora en neuronas corticales.

Acute ciguatoxin exposure produces depolarization, suppress spontaneous firing activity and enhances inhibitory synaptic transmission while decreases excitatory transmission in cortical neurons.

4. Una exposición crónica de neuronas corticales a ciguatoxina induce mecanismos de homeostasis sináptica de un modo dependiente de los canales de sodio dependientes de voltaje con el fin de compensar el aumento de actividad en neuronas corticales.

Chronic exposure of cortical neurons to ciguatoxin induces synaptic scaling through voltage gated sodium channels in an attempt to compensate for changes in activity in cortical neurons.

5. Los análogos tetracíclico y heptacíclico del gambierol inhiben los canales de potasio dependientes de voltaje en linfocitos T humanos y disminuyen la liberación de IL-2 en linfocitos activados.

The tetracyclic and heptacyclic analogues of gambierol inhibit voltage gated potassium channels in human T lymphocytes and prevent the release of IL-2 in activated lymphocytes.





## **6. BIBLIOGRAFÍA**

Achaibar KC, Moore S, Bain PG (2007). Ciguatera poisoning. *Pract Neurol* **7**(5): 316-322.

Ahmed Z (1988). Expression of membrane currents in rat neocortical neurons in serum-free culture. II. Outward currents. *Brain Res* **468**(2): 297-305.

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**(2): 193-208.

Alfonso A, Roman Y, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T, *et al.* (2005). Azaspiracid-4 inhibits Ca<sup>2+</sup> entry by stored operated channels in human T lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **69**(11): 1627-1636.

Alonso E, Fuwa H, Vale C, Suga Y, Goto T, Konno Y, *et al.* (2012). Design and synthesis of skeletal analogues of gambierol: attenuation of amyloid-beta and tau pathology with voltage-gated potassium channel and N-methyl-D-aspartate receptor implications. *J Am Chem Soc* **134**(17): 7467-7479.

Alonso E, Otero P, Vale C, Alfonso A, Antelo A, Gimenez-Llort L, *et al.* (2013). Benefit of 13-desmethyl spiroside C treatment in triple transgenic mouse model of Alzheimer disease: beta-amyloid and neuronal markers improvement. *Curr Alzheimer Res* **10**(3): 279-289.

Alonso E, Vale C, Sasaki M, Fuwa H, Konno Y, Perez S, *et al.* (2010). Calcium oscillations induced by gambierol in cerebellar granule cells. *J Cell Biochem* **110**(2): 497-508.

Alvarez G, Uribe E, Avalos P, Marino C, Blanco J (2010). First identification of azaspiracid and spiroside in *Mesodesma donacium* and *Mulinia edulis* from Northern Chile. *Toxicon* **55**(2-3): 638-641.

Anderson DM, Kulis DM, Keafer BA, Gribble KE, Marin R, Scholin CA (2005). Identification and enumeration of *Alexandrium* spp. from the Gulf of Maine using molecular probes. *Deep Sea Res Part 2 Top Stud Oceanogr*(52): 2467-2490.

Anderson W (1776). An Account of Some Poisonous Fish in The South Seas. In a Letter to Sir John Pringle, Bart. P. R. S. from Mr. William Anderson, Late Surgeon's Mate on Board His Majesty's Ship the Resolution, Now Surgeon of That Ship. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **66**: 544-574.

Aoki S, Kong D, Matsui K, Kobayashi M (2004). Erythroid differentiation in K562 chronic myelogenous cells induced by crambescidin 800, a pentacyclic guanidine alkaloid. *Anticancer Res* **24**(4): 2325-2330.

Armstrong CM, Matteson DR (1985). Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* **227**(4682): 65-67.

Aron ZD, Pietraszkiewicz H, Overman LE, Valeriote F, Cuevas C (2004). Synthesis and anticancer activity of side chain analogs of the crambescidin alkaloids. *Bioorg Med Chem Lett* **14**(13): 3445-3449.

Asakawa M, Toyoshima T, Ito K, Bessho K, Yamaguchi C, Tsunetsugu S, *et al.* (2003). Paralytic toxicity in the ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertea) in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan and the isolation of tetrodotoxin as a main component of its toxins. *Toxicon* **41**(7): 747-753.

Ashcroft FM, Rorsman P (2013). K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nat Rev Endocrinol* **9**(11): 660-669.

Aune T, Sorby R, Yasumoto T, Ramstad H, Landsverk T (2002). Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon* **40**(1): 77-82.

Baden D, Adams DJ (2000). Brevetoxins: chemistry, mechanism of action, and methods of detection. In: Botana LM (ed)^(eds). *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, edn. New York: Marcel Dekker. p^pp 505-532.

Baden DG, Bourdelais AJ, Jacocks H, Michelliza S, Naar J (2005). Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity, and effects. *Environ Health Perspect* **113**(5): 621-625.

Bane V, Lehane M, Dikshit M, O'Riordan A, Furey A (2014). Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins (Basel)* **6**(2): 693-755.

Bateup HS, Denefrio CL, Johnson CA, Saulnier JL, Sabatini BL (2013). Temporal dynamics of a homeostatic pathway controlling neural network activity. *Front Mol Neurosci* **6**: 28.

Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* **14**(1): 83-144.

Becerro M, Uriz M, Turon X (1997). Chemically-mediated interactions in benthic organisms: the chemical ecology of *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida). *Hydrobiologia* **356**: 77-89.

Belelli D, Lambert JJ (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* **6**(7): 565-575.

- Berlinck RG, Braekman JC, Daloze D, Bruno I, Riccio R, Ferri S, *et al.* (1993). Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca<sup>++</sup> channel blocker activity of crambescidin 816. *J Nat Prod* **56**(7): 1007-1015.
- Berlinck RG, Braekman JC, Daloze D, Bruno I, Riccio R, Rogeau D, *et al.* (1992). Crambines C1 and C2: Two Further Ichthyotoxic Guanidine Alkaloids from the Sponge *Crambe crambe*. *J Nat Prod* **55**(4): 528-532.
- Bialojan C, Takai A (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* **256**(1): 283-290.
- Bidard JN, Vijverberg HP, Frelin C, Chungue E, Legrand AM, Bagnis R, *et al.* (1984). Ciguatoin is a novel type of Na<sup>+</sup> channel toxin. *J Biol Chem* **259**(13): 8353-8357.
- Bikson M, Hahn PJ, Fox JE, Jefferys JG (2003). Depolarization block of neurons during maintenance of electrographic seizures. *J Neurophysiol* **90**(4): 2402-2408.
- Blunck R, Batulan Z (2012). Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Front Pharmacol* **3**: 166.
- Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR (2007). Marine natural products. *Nat Prod Rep* **24**(1): 31-86.
- Bondu S, Genta-Jouve G, Leiros M, Vale C, Guignon JM, Botana L, *et al.* (2012). Additional bioactive guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*. *The Royal Society of Chemistry* **2**: 2828-2835.
- Borys P, Grzywna ZJ (2008). On the role of ball and chain interactions in recovery from the inactivation of the shaker potassium channel. *Cell Mol Biol Lett* **13**(4): 526-534.
- Botana LM, Alfonso A, Botana A, Vieytes MR, Vale C, Vilarino N, *et al.* (2009). Functional assays for marine toxins as an alternative, high-throughput-screening solution to animal tests. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**(5): 603-611.
- Bourdelais AJ, Tomas CR, Naar J, Kubanek J, Baden DG (2002). New fish-killing alga in coastal Delaware produces neurotoxins. *Environ Health Perspect* **110**(5): 465-470.
- Bourne Y, Radic Z, Araoz R, Talley TT, Benoit E, Servent D, *et al.* (2010). Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(13): 6076-6081.
- Bradding P, Wulff H (2009). The K<sup>+</sup> channels K(Ca)3.1 and K(v)1.3 as novel targets for asthma therapy. *Br J Pharmacol* **157**(8): 1330-1339.

- Bright DP, Smart TG (2013). Methods for recording and measuring tonic GABAA receptor-mediated inhibition. *Front Neural Circuits* **7**: 193.
- Budde T, Meuth S, Pape HC (2002). Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci* **3**(11): 873-883.
- Buller AL, Larson HC, Schneider BE, Beaton JA, Morrisett RA, Monaghan DT (1994). The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J Neurosci* **14**(9): 5471-5484.
- Burgess JG (2012). New and emerging analytical techniques for marine biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **23**(1): 29-33.
- Buscema M, Van de Vyver G (1985). Cytotoxic rejection of xenografts between marine sponges. *J.Exp.Zool.* **235**: 297-308.
- Butera R, Prockop LD, Buonocore M, Locatelli C, Gandini C, Manzo L (2000). Mild ciguatera poisoning: Case reports with neurophysiological evaluations. *Muscle Nerve* **23**(10): 1598-1603.
- Cahalan MD, Chandy KG (2009). The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol Rev* **231**(1): 59-87.
- Cahalan MD, Chandy KG (1997). Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr Opin Biotechnol* **8**(6): 749-756.
- Cahalan MD, Chandy KG, DeCoursey TE, Gupta S (1985). A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J Physiol* **358**: 197-237.
- Caillaud A, de la Iglesia P, Darius HT, Pauillac S, Aligizaki K, Fraga S, *et al.* (2010). Update on methodologies available for ciguatoxin determination: perspectives to confront the onset of ciguatera fish poisoning in Europe. *Mar Drugs* **8**(6): 1838-1907.
- Campbell S, Harada RM, DeFelice SV, Bienfang PK, Li QX (2009). Bacterial production of tetrodotoxin in the pufferfish *Arothron hispidus*. *Nat Prod Res* **23**(17): 1630-1640.
- Cantrell AR, Catterall WA (2001). Neuromodulation of Na<sup>+</sup> channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat Rev Neurosci* **2**(6): 397-407.
- Carter AG, Regehr WG (2002). Quantal events shape cerebellar interneuron firing. *Nat Neurosci* **5**(12): 1309-1318.

Cataldi M, Secondo A, D'Alessio A, Tagliatela M, Hofmann F, Klugbauer N, *et al.* (1999). Studies on maitotoxin-induced intracellular Ca(2+) elevation in chinese hamster ovary cells stably transfected with cDNAs encoding for L-type Ca(2+) channel subunits. *J Pharmacol Exp Ther* **290**(2): 725-730.

Catterall WA (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Exp Physiol* **99**(1): 35-51.

Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 521-555.

Catterall WA (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(8): a003947.

Catterall WA, Cestele S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* **49**(2): 124-141.

Catterall WA, Few AP (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* **59**(6): 882-901.

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005a). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* **57**(4): 397-409.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005b). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* **57**(4): 411-425.

Cembella AD, Lewis NI, Quilliam MA (1999). Spirolide composition of micro-extracted pooled cells isolated from natural plankton assemblages and from cultures of the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Nat Toxins* **7**(5): 197-206.

Cestele S, Catterall WA (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* **82**(9-10): 883-892.

Ciminiello P, Fattorusso E (2006). Bivalve molluscs as vectors of marine biotoxins involved in seafood poisoning. *Prog Mol Subcell Biol* **43**: 53-82.

Ciminiello P, Fattorusso E, Forino M, Magno S, Poletti R, Satake M, *et al.* (1997). Yessotoxin in mussels of the northern Adriatic Sea. *Toxicon* **35**(2): 177-183.

Cirelli C, Tononi G (2000). Gene expression in the brain across the sleep-waking cycle. *Brain Res* **885**(2): 303-321.

- Clapham DE (2007). Calcium signaling. *Cell* **131**(6): 1047-1058.
- Codd GA (1984). Toxins of freshwater cyanobacteria. *Microbiol Sci* **1**(2): 48-52.
- Collingridge GL, Bliss TV (1995). Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* **18**(2): 54-56.
- Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**(12): 952-962.
- Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT (2010). Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* **11**(7): 459-473.
- Contractor A, Heinemann SF (2002). Glutamate receptor trafficking in synaptic plasticity. *Sci STKE* **2002**(156): re14.
- Chandy KG, Cahalan M, Pennington M, Norton RS, Wulff H, Gutman GA (2001). Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. *Toxicon* **39**(9): 1269-1276.
- Cheng YS, Zhou Y, Irvin CM, Pierce RH, Naar J, Backer LC, *et al.* (2005). Characterization of marine aerosol for assessment of human exposure to brevetoxins. *Environ Health Perspect* **113**(5): 638-643.
- Chiappalone M, Bove M, Vato A, Tedesco M, Martinoia S (2006). Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain Res* **1093**(1): 41-53.
- Chiu CS, Brickley S, Jensen K, Southwell A, McKinney S, Cull-Candy S, *et al.* (2005). GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *J Neurosci* **25**(12): 3234-3245.
- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, *et al.* (2006). Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* **52**(3): 445-459.
- de la Rosa LA, Alfonso A, Vilarino N, Vieytes MR, Yasumoto T, Botana LM (2001). Maitotoxin-induced calcium entry in human lymphocytes: modulation by yessotoxin, Ca(2+) channel blockers and kinases. *Cell Signal* **13**(10): 711-716.
- Deeds JR, Landsberg JH, Etheridge SM, Pitcher GC, Longan SW (2008). Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning. *Mar Drugs* **6**(2): 308-348.

DeFusco DJ, O'Dowd P, Hokama Y, Ott BR (1993). Coma due to ciguatera poisoning in Rhode Island. *Am J Med* **95**(2): 240-243.

Denac H, Mevissen M, Scholtysik G (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**(6): 453-479.

Descalzi G, Kim S, Zhuo M (2009). Presynaptic and postsynaptic cortical mechanisms of chronic pain. *Mol Neurobiol* **40**(3): 253-259.

Dickey RM (2008). Ciguatera toxins: chemistry, toxicology and detection. In: Botana L. *Seafood and Freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, edn. Boca Raton, FL: CRC Press. 479-500.

Dickey RW, Plakas SM (2010). Ciguatera: a public health perspective. *Toxicon* **56**(2): 123-136.

Dounay AB, Forsyth CJ (2002). Okadaic acid: the archetypal serine/threonine protein phosphatase inhibitor. *Curr Med Chem* **9**(22): 1939-1980.

Draisci R, Ferretti E, Palleschi L, Marchiafava C, Poletti R, Milandri A, *et al.* (1999). High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon* **37**(8): 1187-1193.

Draisci R, Lucentini L, Masciori A (2000). Pectenotoxins and yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology, and analysis. In: Botana L. *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology, and detection*, edn. New York: Marcel Dekker. 289-324.

Duran S, Giribet G, Turon X (2004). Phylogeographical history of the sponge *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida): range expansion and recent invasion of the Macaronesian islands from the Mediterranean Sea. *Mol Ecol* **13**(1): 109-122.

Eijkelkamp N, Linley JE, Baker MD, Minett MS, Cregg R, Werdehausen R, *et al.* (2012). Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain* **135**(Pt 9): 2585-2612.

Engelman HS, MacDermott AB (2004). Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci* **5**(2): 135-145.

Espina B, Rubiolo JA (2008). Marine toxins and the cytoskeleton: pectenotoxins, unusual macrolides that disrupt actin. *FEBS J* **275**(24): 6082-6088.

Etheridge SM (2010). Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives. *Toxicon* **56**(2): 108-122.

Everill B, Rizzo MA, Kocsis JD (1998). Morphologically identified cutaneous afferent DRG neurons express three different potassium currents in varying proportions. *J Neurophysiol* **79**(4): 1814-1824.

Fan X, Jin WY, Wang YT (2014). The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. *Front Cell Neurosci* **8**: 160.

Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, *et al.* (1999). Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem* **274**(9): 5746-5754.

Farrant M, Nusser Z (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* **6**(3): 215-229.

Fatt P, Katz B (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* **117**(1): 109-128.

Faust MA (1999). Three new ostreopsis species (Dinophyceae): *O. marinus* sp.nov. *O. belizeanus* sp. and *O. caribbeanus* sp.nov. *Phycologia* **38**: 92.

Faust MA, Morton SL, Quod JP (1996). Further SEM study of marine dinoflagellates: the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* **32**: 1053.

Fernandez-Ortega JF, Morales-de los Santos JM, Herrera-Gutierrez ME, Fernandez-Sanchez V, Rodriguez Loureo P, Rancano AA, *et al.* (2010). Seafood intoxication by tetrodotoxin: first case in Europe. *J Emerg Med* **39**(5): 612-617.

Fernandez ML (2006). Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rias (NW Spain). *Toxicon* **48**: 477.

Ferreiro SF, Vilarino N, Carrera C, Louzao MC, Santamarina G, Cantalapiedra AG, *et al.* (2014a). In vivo arrhythmogenicity of the marine biotoxin azaspiracid-2 in rats. *Arch Toxicol* **88**(2): 425-434.

Ferreiro SF, Vilarino N, Louzao MC, Nicolaou KC, Frederick MO, Botana LM (2014b). In vitro chronic effects on hERG channel caused by the marine biotoxin azaspiracid-2. *Toxicon*.

Finch SC, Wilkins AL, Hawkes AD, Jensen DJ, MacKenzie AL, Beuzenberg V, *et al.* (2005). Isolation and identification of (4*R,S*)-44,55-dihydroxyessotoxin from *Protoceratium reticulatum*, and its occurrence in extracts of shellfish from New Zealand, Norway and Canada. *Toxicon* **46**(2): 160-170.

Flavell SW, Greenberg ME (2008). Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **31**: 563-590.

Fowler PW, Sansom MS (2013). The pore of voltage-gated potassium ion channels is strained when closed. *Nat Commun* **4**: 1872.

Frank CA, Kennedy MJ, Goold CP, Marek KW, Davis GW (2006). Mechanisms underlying the rapid induction and sustained expression of synaptic homeostasis. *Neuron* **52**(4): 663-677.

Friedman MA, Fleming LE, Fernandez M, Bienfang P, Schrank K, Dickey R, *et al.* (2008). Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Mar Drugs* **6**(3): 456-479.

Furey A, Garcia J, O'Callaghan K, Lehane M, Fernandez M, James K (2004). Brevetoxins: Structure, Toxicology, and Origin. In: Botana L. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, edn: Blackwell. p<sup>^</sup>pp 19-46.

Fuwa H, Kainuma N, Tachibana K, Sasaki M (2002a). Total synthesis of (-)-gambierol. *J Am Chem Soc* **124**(50): 14983-14992.

Fuwa H, Kainuma N, Tachibana K, Tsukano C, Satake M, Sasaki M (2004). Diverted total synthesis and biological evaluation of gambierol analogues: elucidation of crucial structural elements for potent toxicity. *Chemistry* **10**(19): 4894-4909.

Fuwa H, Sasaki M, Satake M, Tachibana K (2002b). Total synthesis of gambierol. *Org Lett* **4**(17): 2981-2984.

George J, Baden DG, Gerwick WH, Murray TF (2012). Bidirectional influence of sodium channel activation on NMDA receptor-dependent cerebrocortical neuron structural plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(48): 19840-19845.

George J, Dravid SM, Prakash A, Xie J, Peterson J, Jabba SV, *et al.* (2009). Sodium channel activation augments NMDA receptor function and promotes neurite outgrowth in immature cerebrocortical neurons. *J Neurosci* **29**(10): 3288-3301.

Gerssen A, Pol-Hofstad IE, Poelman M, Mulder PP, van den Top HJ, de Boer J (2010). Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins (Basel)* **2**(4): 878-904.

Gerwick WH, Moore BS (2012). Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem Biol* **19**(1): 85-98.

Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, *et al.* (2000). Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* **275**(47): 37137-37149.

Ghasemi M, Phillips C, Trillo L, De Miguel Z, Das D, Salehi A (2014). The role of NMDA receptors in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **47C**: 336-358.

Ghiaroni V, Fuwa H, Inoue M, Sasaki M, Miyazaki K, Hiramama M, *et al.* (2006). Effect of ciguatoxin 3C on voltage-gated Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents in mouse taste cells. *Chem Senses* **31**(7): 673-680.

Ghiaroni V, Sasaki M, Fuwa H, Rossini GP, Scalera G, Yasumoto T, *et al.* (2005). Inhibition of voltage-gated potassium currents by gambierol in mouse taste cells. *Toxicol Sci* **85**(1): 657-665.

Gingold DB, Strickland MJ, Hess JJ (2014). Ciguatera fish poisoning and climate change: analysis of National Poison Center Data in the United States, 2001-2011. *Environ Health Perspect* **122**(6): 580-586.

Giudicessi JR, Ackerman MJ (2012). Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias--diagnosis and therapy. *Nat Rev Cardiol* **9**(6): 319-332.

Glimcher LH, Murphy KM (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* **14**(14): 1693-1711.

Goldin AL (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol* **13**(3): 284-290.

Goldin AL, Snutch T, Lubbert H, Dowsett A, Marshall J, Auld V, *et al.* (1986). Messenger RNA coding for only the alpha subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(19): 7503-7507.

Gribble GW (2003). The diversity of naturally produced organohalogenes. *Chemosphere* **52**(2): 289-297.

Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD (1993). Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* **102**(4): 601-630.

Gusovsky F, Daly JW (1990). Maitotoxin: a unique pharmacological tool for research on calcium-dependent mechanisms. *Biochem Pharmacol* **39**(11): 1633-1639.

Gutierrez D, Diaz de Leon L, Vaca L (1997). Characterization of the maitotoxin-induced calcium influx pathway from human skin fibroblasts. *Cell Calcium* **22**(1): 31-38.

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, *et al.* (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**(4): 473-508.

Habermehl GG, Krebs HC, Rasoanaivo P, Ramialiharisoa A (1994). Severe ciguatera poisoning in Madagascar: a case report. *Toxicon* **32**(12): 1539-1542.

Hackett JD, Wisecaver JH, Brosnahan ML, Kulis DM, Anderson DM, Bhattacharya D, *et al.* (2013). Evolution of saxitoxin synthesis in cyanobacteria and dinoflagellates. *Mol Biol Evol* **30**(1): 70-78.

Hallegraeff GM (1995). Harmful algae blooms: A global overview. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella A (ed)<sup>^</sup>(eds). *Manual and Harmful Marine Microalgae, International Oceanographic Commission Manuals and Guides*, edn. Paris. 1-22.

Hamilton B, Hurbungs M, Jones A, Lewis RJ (2002a). Multiple ciguatoxins present in Indian Ocean reef fish. *Toxicon* **40**(9): 1347-1353.

Hamilton B, Hurbungs M, Vernoux JP, Jones A, Lewis RJ (2002b). Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon* **40**(6): 685-693.

Hauser TA, Hepler CD, Kombo DC, Grinevich VP, Kiser MN, Hooker DN, *et al.* (2012). Comparison of acetylcholine receptor interactions of the marine toxins, 13-desmethylspirolide C and gymnodimine. *Neuropharmacology* **62**(7): 2239-2250.

Hidalgo J, Liberona JL, Molgo J, Jaimovich E (2002). Pacific ciguatoxin-1b effect over Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents, inositol 1,4,5-triphosphate content and intracellular Ca<sup>2+</sup> signals in cultured rat myotubes. *Br J Pharmacol* **137**(7): 1055-1062.

Hilgemann DW (2003). From a pump to a pore: how palytoxin opens the gates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 386-388.

Hirama M, Oishi T, Uehara H, Inoue M, Maruyama M, Oguri H, *et al.* (2001). Total synthesis of ciguatoxin CTX3C. *Science* **294**(5548): 1904-1907.

Hodgkin AL, Huxley AF (1952a). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**(4): 449-472.

Hodgkin AL, Huxley AF (1952b). Movement of sodium and potassium ions during nervous activity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **17**: 43-52.

- Hokama Y (1988). Ciguatera fish poisoning. *J.Lab.Anal* **2**: 44-50.
- Holmes MJ, Lewis RJ (1994). Purification and characterisation of large and small maitotoxins from cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Nat Toxins* **2**(2): 64-72.
- Holmes MJ, Lewis RJ (2001). Toxin-producing dinoflagellates. In: Menez A. *Perspectives in Molecular Toxinology*, edn. Chichester: Wiley and Sons. 39-65.
- How CK, Chern CH, Huang YC, Wang LM, Lee CH (2003). Tetrodotoxin poisoning. *Am J Emerg Med* **21**(1): 51-54.
- Hurley W, Wolterstorff C, MacDonald R, Schultz D (2014). Paralytic shellfish poisoning: a case series. *West J Emerg Med* **15**(4): 378-381.
- Hwang DF, Noguchi T (2007). Tetrodotoxin poisoning. *Adv Food Nutr Res* **52**: 141-236.
- Inoue M, Hiramata M, Satake M, Sugiyama K, Yasumoto T (2003). Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A. *Toxicon* **41**(4): 469-474.
- Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* **54**(6): 859-871.
- James KJ, Bishop AG, Carmody EP, Kelly SS (2002a). Detection methods for okadaic acid and analogues. In: Botana L. *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection.*, edn. New York: Marcel and Dekker. 217-234.
- James KJ, Bishop AG, Draisci R, Palleschi L, Marchiafava C, Ferretti E, *et al.* (1999). Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *J Chromatogr A* **844**(1-2): 53-65.
- James KJ, Furey A, Lehane M, Ramstad H, Aune T, Hovgaard P, *et al.* (2002b). First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon* **40**(7): 909-915.
- James KJ, Sierra MD, Lehane M, Brana Magdalena A, Furey A (2003). Detection of five new hydroxyl analogues of azaspiracids in shellfish using multiple tandem mass spectrometry. *Toxicon* **41**(3): 277-283.
- Jeffery B, Barlow T, Moizer K, Paul S, Boyle C (2004). Amnesic shellfish poison. *Food Chem Toxicol* **42**(4): 545-557.
- Johnson HW, Majumder U, Rainier JD (2005). The total synthesis of gambierol. *J Am Chem Soc* **127**(3): 848-849.

Johnson HW, Majumder U, Rainier JD (2006). Total synthesis of gambierol: subunit coupling and completion. *Chemistry* **12**(6): 1747-1753.

Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, *et al.* (2004). Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci* **7**(3): 244-253.

Kakizaki A, Takahashi M, Akagi H, Tachikawa E, Yamamoto T, Taira E, *et al.* (2006). Ca<sup>2+</sup> channel activating action of maitotoxin in cultured brainstem neurons. *Eur J Pharmacol* **536**(3): 223-231.

Katikou P, Georgantelis D, Sinouris N, Petsi A, Fotaras T (2009). First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* **54**(1): 50-55.

Katikou P, Vlamis A (2014). Palytoxin and Analogs: Ecobiology and Origin, Chemistry, and Chemical Analysis. In: Botana L (ed)<sup>(eds)</sup>. *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, edn. Boca Raton: Taylor and Francis. p<sup>pp</sup> 695-740.

Katz B (1979). Elementary components of synaptic transmission. *Naturwissenschaften* **66**(12): 606-610.

Kirkpatrick B, Fleming LE, Bean JA, Nierenberg K, Backer LC, Cheng YS, *et al.* (2011). Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma: Continued health effects after 1 hour beach exposure. *Harmful Algae* **10**(2): 138-143.

Kirkpatrick B, Fleming LE, Squicciarini D, Backer LC, Clark R, Abraham W, *et al.* (2004). Literature Review of Florida Red Tide: Implications for Human Health Effects. *Harmful Algae* **3**(2): 99-115.

Knapska E, Kaczmarek L (2004). A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Prog Neurobiol* **74**(4): 183-211.

Kodama M, Sato S, Sakamoto S, Ogata T (1996). Occurrence of tetrodotoxin in *Alexandrium tamarense*, a causative dinoflagellate of paralytic shellfish poisoning. *Toxicon* **34**(10): 1101-1105.

Koh JY, Cotman CW (1992). Programmed cell death: its possible contribution to neurotoxicity mediated by calcium channel antagonists. *Brain Res* **587**(2): 233-240.

Konoki K, Hashimoto M, Murata M, Tachibana K (1999). Maitotoxin-induced calcium influx in erythrocyte ghosts and rat glioma C6 cells, and blockade by gangliosides and other membrane lipids. *Chem Res Toxicol* **12**(10): 993-1001.

Koo GC, Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S, Sirotna A, *et al.* (1997). Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* **158**(11): 5120-5128.

Kopljar I, Labro AJ, Cuypers E, Johnson HW, Rainier JD, Tytgat J, *et al.* (2009). A polyether biotoxin binding site on the lipid-exposed face of the pore domain of Kv channels revealed by the marine toxin gambierol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(24): 9896-9901.

Korb E, Finkbeiner S (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci* **34**(11): 591-598.

Krasznai Z (2005). Ion channels in T cells: from molecular pharmacology to therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**(2): 127-135.

Kriegstein AR (1987). Synaptic responses of cortical pyramidal neurons to light stimulation in the isolated turtle visual system. *J Neurosci* **7**(8): 2488-2492.

Kumar-Roine S, Matsui M, Chinain M, Laurent D, Pauillac S (2008). Modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW 264.7 murine macrophages by Pacific ciguatoxin. *Nitric Oxide* **19**(1): 21-28.

Lam J, Wulff H (2011). The Lymphocyte Potassium Channels Kv1.3 and KCa3.1 as Targets for Immunosuppression. *Drug Dev Res* **72**(7): 573-584.

Lange WR (1987). Ciguatera toxicity. *Am Fam Physician* **35**(4): 177-182.

Lange WR, Snyder FR, Fudala PJ (1992). Travel and ciguatera fish poisoning. *Arch Intern Med* **152**(10): 2049-2053.

Lavretsky EP, Jarvik LF (1992). A group of potassium-channel blockers-acetylcholine releasers: new potentials for Alzheimer disease? A review. *J Clin Psychopharmacol* **12**(2): 110-118.

Lee J (1989). Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J Appl Phycol* **1**: 147.

Lee KF, Soares C, Beique JC (2014). Tuning into diversity of homeostatic synaptic plasticity. *Neuropharmacology* **78**: 31-37.

Leslie KR, Nelson SB, Turrigiano GG (2001). Postsynaptic depolarization scales quantal amplitude in cortical pyramidal neurons. *J Neurosci* **21**(19): RC170.

- Lesuisse C, Martin LJ (2002). Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J Neurobiol* **51**(1): 9-23.
- Lewis RJ (2006). Ciguatera: Australian perspectives on a global problem. *Toxicon* **48**(7): 799-809.
- Lewis RJ (1992a). Ciguatoxins are potent ichthyotoxins. *Toxicon* **30**(2): 207-211.
- Lewis RJ (2001). The changing face of ciguatera. *Toxicon* **39**(1): 97-106.
- Lewis RJ (1992b). Socioeconomic impacts and management ciguatera in the Pacific. *Bull Soc Pathol Exot* **85**(5 Pt 2): 427-434.
- Lewis RJ, Holmes MJ (1993). Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comp Biochem Physiol C* **106**(3): 615-628.
- Lewis RJ, Vernoux JP, Brereton IM (1998). Structure of Caribbean ciguatoxin isolated from *Caranx latius*. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 5914-5920.
- Lissin DV, Carroll RC, Nicoll RA, Malenka RC, von Zastrow M (1999a). Rapid, activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **19**(4): 1263-1272.
- Lissin DV, Gomperts SN, Carroll RC, Christine CW, Kalman D, Kitamura M, *et al.* (1998). Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 7097-7102.
- Lissin DV, Malenka RC, Von Zastrow M (1999b). An immunocytochemical assay for activity-dependent redistribution of glutamate receptors from the postsynaptic plasma membrane. *Ann N Y Acad Sci* **868**: 550-553.
- Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000). Intracellular Ion Environment and Membrane Electric Potential. In: Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology*, 4 th edn. New York: W H Freeman & Co.
- Lombet A, Bidard JN, Lazdunski M (1987). Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett* **219**(2): 355-359.
- Lopez-Rivera A, Pinto M, Insinilla A, Suarez Isla B, Uribe E, Alvarez G, *et al.* (2009). The occurrence of domoic acid linked to a toxic diatom bloom in a new potential vector: the tunicate *Pyura chilensis* (piure). *Toxicon* **54**(6): 754-762.

Louzao MC, Cagide E, Vieytes MR, Sasaki M, Fuwa H, Yasumoto T, *et al.* (2006). The sodium channel of human excitable cells is a target for gambierol. *Cell Physiol Biochem* **17**(5-6): 257-268.

Louzao MC, Vieytes MR, Botana LM (2005). Effect of okadaic acid on glucose regulation. *Mini Rev Med Chem* **5**(2): 207-215.

Llewellyn LE (2010). Revisiting the association between sea surface temperature and the epidemiology of fish poisoning in the South Pacific: reassessing the link between ciguatera and climate change. *Toxicon* **56**(5): 691-697.

Madigan TL (2006). Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in South Australian shellfish. *Harmful Algae*, edn, Vol. 5. p<sup>^</sup>pp 119.

Magdalena AB, Lehane M, Krys S, Fernandez ML, Furey A, James KJ (2003). The first identification of azaspiracids in shellfish from France and Spain. *Toxicon* **42**(1): 105-108.

Makkar SR, Zhang SQ, Cranney J (2010). Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology* **35**(8): 1625-1652.

Malenka RC, Bear MF (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**(1): 5-21.

Marrouchi R, Rome G, Kharrat R, Molgo J, Benoit E (2013). Analysis of the action of gymnodimine-A and 13-desmethyl spirolide C on the mouse neuromuscular system in vivo. *Toxicon* **75**: 27-34.

Martin V, Vale C, Antelo A, Hiramama M, Yamashita S, Vieytes MR, *et al.* (2014). Differential Effects of Ciguatoxin and Maitotoxin in Primary Cultures of Cortical Neurons. *Chem Res Toxicol*.

Mattei C, Molgo J, Marquais M, Vernoux J, Benoit E (1999). Hyperosmolar D-mannitol reverses the increased membrane excitability and the nodal swelling caused by Caribbean ciguatoxin-1 in single frog myelinated axons. *Brain Res* **847**(1): 50-58.

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984). Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**(5965): 261-263.

McCarron P, Kilcoyne J, Hess P (2008). Effects of cooking and heat treatment on concentration and tissue distribution of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon* **51**(6): 1081-1089.

McKinney RA, Capogna M, Durr R, Gähwiler BH, Thompson SM (1999). Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat Neurosci* **2**(1): 44-49.

McMahon T, Silke J (1995). Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae* **14**: 2.

McNabb P (2008). Chemistry, Metabolism and Chemical Analysis of Okadaic Acid Group Toxins. In: Botana LM (ed) (eds). *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection.*, edn. Boca raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group. pp 209-228.

Meunier FA, Mattei C, Molgo J (2009). Marine toxins potentially affecting neurotransmitter release. *Prog Mol Subcell Biol* **46**: 159-186.

Miles CO, Wilkins AL, Stirling DJ, MacKenzie AL (2003). Gymnodimine C, an isomer of gymnodimine B, from *Karenia selliformis*. *J Agric Food Chem* **51**(16): 4838-4840.

Miraglia M, Marvin HJ, Kleter GA, Battilani P, Brera C, Coni E, *et al.* (2009). Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food Chem Toxicol* **47**(5): 1009-1021.

Mody I (2005). Aspects of the homeostatic plasticity of GABAA receptor-mediated inhibition. *J Physiol* **562**(Pt 1): 37-46.

Molgo J, Araoz R, Benoit E, Iorga B (2014). Cyclic Imine Toxins: Chemistry, Origin, Metabolism, Pharmacology, Toxicology, and Detection. In: Botana L. *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology and detection*, edn. Boca Raton: Taylor&Francis.

Molgo J, Comella JX, Legrand AM (1990). Ciguatoxin enhances quantal transmitter release from frog motor nerve terminals. *Br J Pharmacol* **99**(4): 695-700.

Molgo J, Shimahara T, Legrand AM (1993). Ciguatoxin, extracted from poisonous morays eels, causes sodium-dependent calcium mobilization in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Neurosci Lett* **158**(2): 147-150.

Molleman A (2003). In: *Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology.*, edn. Chichester: Wiley. 0-471.

Morales-Tlalpan V, Vaca L (2002). Modulation of the maitotoxin response by intracellular and extracellular cations. *Toxicon* **40**(5): 493-500.

- Mori Y, Nogami K, Hayashi H, Noyori R (2003). Sulfonyl-stabilized oxiranyllithium-based approach to polycyclic ethers. Convergent synthesis of the ABCDEF-ring system of yessotoxin and adriatoxin. *J Org Chem* **68**(23): 9050-9060.
- Morohashi A, Satake M, Yasumoto T (1999). The absolute configuration of gambierol, a toxic marine polyether from the dinoflagellate, gambierdiscus toxicus. *Tetrahedron*: 40-97.
- 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**(4): 471-474.
- Mountfort DO, Suzuki T, Truman P (2001). Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. *Toxicon* **39**(2-3): 383-390.
- Munday R (2014). Toxicology of Seafood Toxins: A critical Review. In: Botana L. *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, edn. Boca Ratón Taylor and Francis. 200-259.
- Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T (1987). Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron* **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 *Bull.Jnp.Soc.Sci.Fish* **48**: 549-552.
- Murata M, Yasumoto T (2000). The structure elucidation and biological activities of high molecular weight algal toxins: maitotoxin, prymnesins and zooxanthellatoxins. *Nat Prod Rep* **17**(3): 293-314.
- Murray PM, Moane S, Collins C, Beletskaya T, Thomas OP, Duarte AW, *et al.* (2013). Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin. *N Biotechnol* **30**(6): 839-850.
- Nestler EJ (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* **8**(11): 1445-1449.
- Newman DJ, Cragg GM (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **70**(3): 461-477.
- Nicolaou KC, Frederick MO (2007). On the structure of maitotoxin. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**(28): 5278-5282.

Nicholson M, Lewis R (2006). Ciguatoxins: Cyclic Polyether Modulators of Voltage-gated Ion Channel Function. *Marine Drugs* **4**: 82-118.

Noguchi T, Arakawa O (2008). Tetrodotoxin--distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Mar Drugs* **6**(2): 220-242.

Noguchi T, Jeon JK, Arakawa O, Sugita H, Deguchi Y, Shida Y, *et al.* (1986). Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergatis floridus*. *J Biochem* **99**(1): 311-314.

Nunez D, Matute P, Garcia A, Garcia P, Abadia N (2012). Outbreak of ciguatera food poisoning by consumption of amberjack (*Seriola* spp.) in the Canary Islands, May 2012. *Euro Surveill* **17**(23).

O'Brien RJ, Kamboj S, Ehlers MD, Rosen KR, Fischbach GD, Huganir RL (1998). Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron* **21**(5): 1067-1078.

O'Garra A (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* **8**(3): 275-283.

O'Neill MJ, Bleakman D, Zimmerman DM, Nisenbaum ES (2004). AMPA receptor potentiators for the treatment of CNS disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**(3): 181-194.

Ogino H, Kumagai M, Yasumoto T (1997). Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat Toxins* **5**(6): 255-259.

Oishi T, Konoki K, Tamate R, Torikai K, Hasegawa F, Matsumori N, *et al.* (2012). Artificial ladder-shaped polyethers that inhibit maitotoxin-induced Ca<sup>2+</sup> influx in rat glioma C6 cells. *Bioorg Med Chem Lett* **22**(11): 3619-3622.

Okano H, Masuoka H, Kamei S, Seko T, Koyabu S, Tsuneoka K, *et al.* (1998). Rhabdomyolysis and myocardial damage induced by palytoxin, a toxin of blue humphead parrotfish. *Intern Med* **37**(3): 330-333.

Oshima Y (1995). Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. In: Lassuss P. *Harmful Marine Algal Blooms*, edn. Paris. 475.

Oshima Y, Kotaki Y, Harada T, Yasumoto T (1984). Paralytic shellfish toxins in tropical waters. In: Ragelis EP. *American Chemical Society Symposium*, edn. Washington D.C. 161-170.

Oufji K, Statake M, McMahon T, Silker J, James KJ, Naoki H (1999). Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat Toxins* **7**: 99-102.

Palmer CL, Cotton L, Henley JM (2005). The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev* **57**(2): 253-277.

Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* **14**(6): 383-400.

Paz B, Daranas AH, Norte M, Riobo P, Franco JM, Fernandez JJ (2008). Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Mar Drugs* **6**(2): 73-102.

Paz B, Riobo P, Ramilo I, Franco JM (2007). Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon* **50**(1): 1-17.

Pearn J (2001). Neurology of ciguatera. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **70**(1): 4-8.

Pearn JH (1997). Chronic fatigue syndrome: chronic ciguatera poisoning as a differential diagnosis. *Med J Aust* **166**(6): 309-310.

Perez-Otano I, Ehlers MD (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* **28**(5): 229-238.

Perez S, Vale C, Alonso E, Alfonso C, Rodriguez P, Otero P, *et al.* (2011). A comparative study of the effect of ciguatoxins on voltage-dependent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in cerebellar neurons. *Chem Res Toxicol* **24**(4): 587-596.

Perez S, Vale C, Alonso E, Fuwa H, Sasaki M, Konno Y, *et al.* (2012). Effect of gambierol and its tetracyclic and heptacyclic analogues in cultured cerebellar neurons: a structure-activity relationships study. *Chem Res Toxicol* **25**(9): 1929-1937.

Poon-King CM, Chen A, Poon-King T (2004). Ciguatera fish poisoning in industrial ship crewmembers: a retrospective study in a seaport general practice in Trinidad and Tobago. *West Indian Med J* **53**(4): 220-226.

Pottier I, Hamilton B, Jones A, Lewis RJ, Vernoux JP (2003). Identification of slow and fast-acting toxins in a highly ciguatoxic barracuda (*Sphyraena barracuda*) by HPLC/MS and radiolabelled ligand binding. *Toxicon* **42**(6): 663-672.

Pottier I, Vernoux JP, Lewis RJ (2001). Ciguatera fish poisoning in the Caribbean islands and Western Atlantic. *Rev Environ Contam Toxicol* **168**: 99-141.

Pozo K, Goda Y (2010). Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* **66**(3): 337-351.

Quilliam MA, Wright JL (1989). The amnesic shellfish poisoning mystery. *Anal Chem* **61**(18): 1053A-1106A.

Ramakers GJ, van Galen H, Feenstra MG, Corner MA, Boer GJ (1994). Activity-dependent plasticity of inhibitory and excitatory amino acid transmitter systems in cultured rat cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci* **12**(7): 611-621.

Ramos V, Vasconcelos V (2010). Palytoxin and analogs: biological and ecological effects. *Mar Drugs* **8**(7): 2021-2037.

Ramsdell JS (2007). The molecular and integrative basis to domoic acid toxicity. In: Botana LM. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, edn. Ames: Blackwell. 223-250.

Reguera B, Velo-Suarez L, Raine R, Park MG (2012). Harmful Dinophysis species: A review. *Harmful Algae*(14): 87-106.

Rogers SW, Hughes TE, Hollmann M, Gasic GP, Deneris ES, Heinemann S (1991). The characterization and localization of the glutamate receptor subunit GluR1 in the rat brain. *J Neurosci* **11**(9): 2713-2724.

Roman Y, Alfonso A, Louzao MC, de la Rosa LA, Leira F, Vieytes JM, *et al.* (2002). Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets. *Cell Signal* **14**(8): 703-716.

Roman Y, Alfonso A, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T, *et al.* (2004). Effects of Azaspiracids 2 and 3 on intracellular cAMP, [Ca<sup>2+</sup>], and pH. *Chem Res Toxicol* **17**(10): 1338-1349.

Rubiolo JA, Lopez-Alonso H, Martinez P, Millan A, Cagide E, Vieytes MR, *et al.* (2013). Yessotoxin Induces Er-Stress Followed By Autophagic Cell Death In Glioma Cells Mediated By mTOR and BNIP3. *Cell Signal*.

Rubiolo JA, Lopez-Alonso H, Martinez P, Millan A, Cagide E, Vieytes MR, *et al.* (2014a). Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3. *Cell Signal* **26**(2): 419-432.

Rubiolo JA, Lopez-Alonso H, Roel M, Vieytes MR, Thomas O, Ternon E, *et al.* (2014b). Mechanism of cytotoxic action of crambescidin-816 on human liver-derived tumour cells. *Br J Pharmacol* **171**(7): 1655-1667.

Rutherford LC, DeWan A, Lauer HM, Turrigiano GG (1997). Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci* **17**(12): 4527-4535.

Rutherford LC, Nelson SB, Turrigiano GG (1998). BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron* **21**(3): 521-530.

Sanchez-Perez A, Llansola M, Cauli O, Felipe V (2005). Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. II. Signaling pathways and physiological modulators regulating NMDA receptor function. *Cerebellum* **4**(3): 162-170.

Sands SB, Lewis RS, Cahalan MD (1989). Charybdotoxin blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human and murine T lymphocytes. *J Gen Physiol* **93**(6): 1061-1074.

Sankar R (2012). GABA(A) receptor physiology and its relationship to the mechanism of action of the 1,5-benzodiazepine clobazam. *CNS Drugs* **26**(3): 229-244.

Sasaki M, Cagide E, Louzao C (2007). Gambierol. In: Botana L (ed)^(eds). *Phycotoxins chemistry and biochemistry*, edn. Iowa: Blackwell.

Satake M (2007). Chemistry of Maitotoxin. In: Botana L. *Phycotoxins: chemistry and biochemistry*, edn. Iowa: Blackwell.

Satake M (1999). New toxic event caused by Irish mussels. In: *Proc.of the 8th International Conference on Harmful Algae*. Vigo: Regueira,B Blanco,J Fernandez,M.

Satake M, Ishimaru T, Legrand AM, Yasumoto T (1993a). Isolation of a ciguatoxin analog from cultures of *Gambierdiscus toxicus*. In: Smayda T, Shimizu Y. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, edn. Amsterdam: Elsevier. 575-579.

Satake M, MacKenzie L, Yasumoto T (1997a). Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat Toxins* **5**(4): 164-167.

Satake M, Murata M, Yasumoto T (1993b). Gambierol: A new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J.Am.Chem.Soc.*: 115-361.

Satake M, Tubaro A, Lee JS, Yasumoto T (1997b). Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat Toxins* **5**(3): 107-110.

Scheuer PJ, Takahashi W, Tsutsumi J, Yoshida T (1967). Ciguatoxin: isolation and chemical nature. *Science* **155**(767): 1267-1268.

Schlumberger S, Mattei C, Molgo J, Benoit E (2010). Dual action of a dinoflagellate-derived precursor of Pacific ciguatoxins (P-CTX-4B) on voltage-dependent K(+) and Na(+) channels of single myelinated axons. *Toxicon* **56**(5): 768-775.

Schousboe A, Drejer J, Hansen GH, Meier E (1985). Cultured neurons as model systems for biochemical and pharmacological studies on receptors for neurotransmitter amino acids. *Dev Neurosci* **7**(5-6): 252-262.

Shatz CJ (1990). Impulse activity and the patterning of connections during CNS development. *Neuron* **5**(6): 745-756.

Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* **52**(4): 557-594.

Shimizu Y (2000). Chemistry and mechanism of action. In: Botana LM (ed) (eds). *Seafood and Freshwater Toxins*, edn. 151.

Shoemaker RC, House D, Ryan JC (2010). Defining the neurotoxin derived illness chronic ciguatera using markers of chronic systemic inflammatory disturbances: a case/control study. *Neurotoxicol Teratol* **32**(6): 633-639.

Shumway SE (1995). Phycotoxin-related shellfish poisoning: Bivalve molluscs are not the only vectors. *Rev Fish Sci*(3): 1-31.

Shumway SE (1990). A review of the effects of algal blooms on shekkfish and aquaculture. *World.Aquacult.Soc* **21**: 65-104.

Shumway SE, Sherman SA, Cembella AD, Selvin R (1994). Accumulation of paralytic shellfish toxins by surfclams, *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1897) in the Gulf of Maine: seasonal changes, distribution between tissues, and notes on feeding habits. *Nat Toxins* **2**(4): 236-251.

Sigworth FJ, Neher E (1980). Single Na<sup>+</sup> channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature* **287**(5781): 447-449.

Simms BA, Zamponi GW (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron* **82**(1): 24-45.

Sladeczek F, Schmidt BH, Alonso R, Vian L, Tep A, Yasumoto T, *et al.* (1988). New insights into maitotoxin action. *Eur J Biochem* **174**(4): 663-670.

Smart TG, Paoletti P (2012). Synaptic neurotransmitter-gated receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(3).

Stent GS (1973). A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(4): 997-1001.

Stevens M, Peigneur S, Tytgat J (2011). Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Front Pharmacol* **2**: 71.

Stotz SC, Jarvis SE, Zamponi GW (2004). Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol* **554**(Pt 2): 263-273.

Sullivan JJ (1993). Methods of analysis for algal toxins: dinoflagellate and diatom toxins. In: Falconer I. *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, edn. London: Academic Press. p<sup>^</sup>pp 29-48.

Sutton MA, Wall NR, Aakalu GN, Schuman EM (2004). Regulation of dendritic protein synthesis by miniature synaptic events. *Science* **304**(5679): 1979-1983.

Tagliatela M, Canzoniero LM, Fatatis A, Di Renzo G, Yasumoto T, Annunziato L (1990). Effect of maitotoxin on cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels and membrane potential in purified rat brain synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* **1026**(1): 126-132.

Takadera T, Suzuki R, Mohri T (1990). Protection by ethanol of cortical neurons from N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity is associated with blocking calcium influx. *Brain Res* **537**(1-2): 109-114.

Takai A, Murata M, Torigoe K, Isobe M, Mieskes G, Yasumoto T (1992). Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship. *Biochem J* **284** ( Pt 2): 539-544.

Tian C, Zhu R, Zhu L, Qiu T, Cao Z, Kang T (2014). Potassium channels: structures, diseases, and modulators. *Chem Biol Drug Des* **83**(1): 1-26.

Torreano PJ, Cohan CS (2003). Calcium and voltage dependent inactivation of sodium and calcium currents limits calcium influx in Helisoma neurons. *J Neurobiol* **54**(3): 439-456.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, *et al.* (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* **62**(3): 405-496.

Trevino CL, Escobar L, Vaca L, Morales-Tlalpan V, Ocampo AY, Darszon A (2008). Maitotoxin: A unique pharmacological tool for elucidating Ca<sup>2+</sup> dependent mechanism. In: Botana LM (ed)<sup>^</sup>(eds). *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection.*, edn. Boca Raton, Fl.: CRC Press, Taylor & Francis Group. p<sup>^</sup>pp 503-516.

Tubaro A, Sosa S, Carbonatto M, Altinier G, Vita F, Melato M, *et al.* (2003). Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon* **41**(7): 783-792.

Turrigiano GG (1999). Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci* **22**(5): 221-227.

Turrigiano GG (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* **135**(3): 422-435.

Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* **391**(6670): 892-896.

Turrigiano GG, Nelson SB (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* **5**(2): 97-107.

Twiner MJ, Doucette GJ, Rasky A, Huang XP, Roth BL, Sanguinetti MC (2012). Marine algal toxin azaspiracid is an open-state blocker of hERG potassium channels. *Chem Res Toxicol* **25**(9): 1975-1984.

Twiner MJ, Hess P, Dechraoui MY, McMahon T, Samons MS, Satake M, *et al.* (2005). Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. *Toxicon* **45**(7): 891-900.

Ueda H, Tamura S, Harada H, Yasumoto T, Takagi H (1986). The maitotoxin-evoked Ca<sup>2+</sup> entry into synaptosomes is enhanced by cholera toxin. *Neurosci Lett* **67**(2): 141-146.

Vacher H, Mohapatra DP, Trimmer JS (2008). Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev* **88**(4): 1407-1447.

Valdiglesias V, Prego-Faraldo MV, Pasaro E, Mendez J, Laffon B (2013). Okadaic acid: more than a diarrheic toxin. *Mar Drugs* **11**(11): 4328-4349.

Vale C (2014a). Domoic Acid: Chemistry and Pharmacology. In: Botana L. *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, edn: Taylor and Francis. 875-893.

Vale C, Antelo A, Martin V (2014). Pharmacology of ciguatoxins. In: Botana L, Alonso A (ed)<sup>(eds)</sup>. *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*, edn, Vol. In press. Iowa: Taylor&Francis.

Vale C, Gomez-Limia B, Vieytes MR, Botana LM (2007a). Mitogen-activated protein kinases regulate palytoxin-induced calcium influx and cytotoxicity in cultured neurons. *Br J Pharmacol* **152**(2): 256-266.

Vale C, Nicolaou KC, Frederick MO, Gomez-Limia B, Alfonso A, Vieytes MR, *et al.* (2007b). Effects of azaspiracid-1, a potent cytotoxic agent, on primary neuronal cultures. A structure-activity relationship study. *J Med Chem* **50**(2): 356-363.

Vale C, Wandscheer C, Nicolaou KC, Frederick MO, Alfonso C, Vieytes MR, *et al.* (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**(13): 2952-2962.

Vale P (2004). Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. *Toxicon* **44**(2): 123-134.

Vale P (2014b). Saxitoxin and Analogs: Ecobiology, Origin, Chemistry and Detection. In: Botana L. *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, 3 edn. Boca Raton: Taylor&Francis Group.

Vardya I, Drasbek KR, Dosa Z, Jensen K (2008). Cell type-specific GABA A receptor-mediated tonic inhibition in mouse neocortex. *J Neurophysiol* **100**(1): 526-532.

Varga Z, Hajdu P, Panyi G (2010). Ion channels in T lymphocytes: an update on facts, mechanisms and therapeutic targeting in autoimmune diseases. *Immunol Lett* **130**(1-2): 19-25.

Veng LM, Mesches MH, Browning MD (2003). Age-related working memory impairment is correlated with increases in the L-type calcium channel protein alpha1D (Cav1.3) in area CA1 of the hippocampus and both are ameliorated by chronic nimodipine treatment. *Brain Res Mol Brain Res* **110**(2): 193-202.

Vershinin A (2006). Phytoplankton composition of the Kandalaksha Gulf, Russian White Sea: Dinophysis and lipophilic toxins in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Harmful Algae* **5**: 558.

Vetter I, Touska F, Hess A, Hinsbey R, Sattler S, Lampert A, *et al.* (2012). Ciguatoxins activate specific cold pain pathways to elicit burning pain from cooling. *EMBO J* **31**(19): 3795-3808.

Vetter I, Zimmermann K, Lewis RJ (2014). Ciguatera Toxins: Pharmacology, Toxicology and Detection. In: Botana L. *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology and detection*, third edn: Taylor and Francis. 925-950.

Vilariño N (2007). Biochemistry of Azaspiracid Poisoning Toxins. In: Botana L. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, edn. Iowa: Blackwell. 311-318.

Villar Gonzalez A, Rodriguez-Velasco ML, Ben-Gigirey B, Botana LM (2006). First evidence of spirolides in Spanish shellfish. *Toxicon* **48**(8): 1068-1074.

Viviani R (1992). Eutrophication, marine biotoxins, human health. *Sci Total Environ Suppl*: 631-662.

Wadel K, Neher E, Sakaba T (2007). The coupling between synaptic vesicles and Ca<sup>2+</sup> channels determines fast neurotransmitter release. *Neuron* **53**(4): 563-575.

Wandscheer CB, Vilarino N, Espina 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**(11): 1753-1761.

Wang DZ (2008). Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. *Mar Drugs* **6**(2): 349-371.

Wang H, Wu LJ, Kim SS, Lee FJ, Gong B, Toyoda H, *et al.* (2008). FMRP acts as a key messenger for dopamine modulation in the forebrain. *Neuron* **59**(4): 634-647.

Wang Y, Weiss MT, Yin J, Frew R, Tenn C, Nelson PP, *et al.* (2009). Role of the sodium hydrogen exchanger in maitotoxin-induced cell death in cultured rat cortical neurons. *Toxicon* **54**(2): 95-102.

Watt AJ, van Rossum MC, MacLeod KM, Nelson SB, Turrigiano GG (2000). Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses. *Neuron* **26**(3): 659-670.

Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, Moffitt MC, Neilan BA (2010). Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Mar Drugs* **8**(7): 2185-2211.

Wiseman EJ, Jarvik LF (1991). Potassium channel blockers: could they work in Alzheimer disease? *Alzheimer Dis Assoc Disord* **5**(1): 25-30.

Wright JLC, Quiliam MA (1995). Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. In: Hallegraef GM, Anderson DM, Cembella AD. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, edn. Paris: UNESCO. 115-135.

Wu ML, Yang CC, Deng JF, Wang KY (2014). Hyperkalemia, Hyperphosphatemia, Acute Kidney Injury, and Fatal Dysrhythmias After Consumption of Palytoxin-Contaminated Goldspot Herring. *Ann Emerg Med*.

Yamaoka K, Inoue M, Miyahara H, Miyazaki K, Hiramama M (2004). A quantitative and comparative study of the effects of a synthetic ciguatoxin CTX3C on the kinetic properties of voltage-dependent sodium channels. *Br J Pharmacol* **142**(5): 879-889.

Yasumoto T (2001). The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chem Rec* **1**(3): 228-242.

Yasumoto T, Murata M (1993). Marine toxins. *Chem Rev* **93**: 1897-1909.

Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Matsumoto GK, Clardy J (1984). Diarrhetic shellfish poisoning. In: in Ragelis EP. *Seafood toxins*, edn, Vol. 207. Washington: ACS symposium series n° 262..

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

Yasumoto T, Oshima T, Yamaguchi M (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull Jap Soc Sci Fish*(44): 1249-1255.

Yasumoto T, Takizawa A (1997). Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**(10): 1775-1777.

Yu FH, Catterall WA (2004). The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* **2004**(253): re15.

Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev* **57**(4): 387-395.

Yu SP, Farhangrazi ZS, Ying HS, Yeh CH, Choi DW (1998a). Enhancement of outward potassium current may participate in beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death. *Neurobiol Dis* **5**(2): 81-88.

Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LM, Farhangrazi ZS, *et al.* (1997). Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* **278**(5335): 114-117.

Yu XM, Salter MW (1998b). Gain control of NMDA-receptor currents by intracellular sodium. *Nature* **396**(6710): 469-474.

Zhuo M (2008). Cortical excitation and chronic pain. *Trends Neurosci* **31**(4): 199-207.

Zhuo M (2005). Targeting central plasticity: a new direction of finding painkillers. *Curr Pharm Des* **11**(21): 2797-2807.

Zimmermann K, Deuis JR, Inserra MC, Collins LS, Namer B, Cabot PJ, *et al.* (2013). Analgesic treatment of ciguatoxin-induced cold allodynia. *Pain* **154**(10): 1999-2006.

Zlott DA, Byrne M (2010). Mechanisms by which pharmacologic agents may contribute to fatigue. *PM R* **2**(5): 451-455.

Zorumski CF, Izumi Y (2012). NMDA receptors and metaplasticity: mechanisms and possible roles in neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **36**(3): 989-1000.

