



TESIS DE DOCTORADO
MODALIDAD DE COMPENDIO DE ARTÍCULOS

CARDIOTOXICIDAD DE LAS FICOTOXINAS MARINAS

Edo.

Sara Fernández Ferreiro

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN BÁSICA
Y APLICADA EN CIENCIAS VETERINARIAS

LUGO

2016

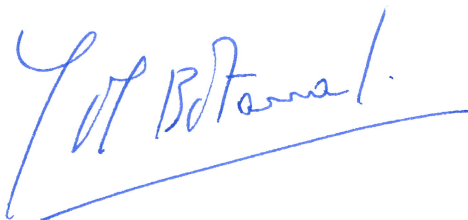
Prof. Dr. D. **Luis M. Botana López**, como director de la tesis titulada “Cardiotoxicidad de las ficotoxinas marinas”.

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis presentada por **Doña Sara Fernández Ferreiro** es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios del Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para el desarrollo de este trabajo.

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

Lugo, a 2 de Mayo de 2016



Luis M. Botana López
Doctor en Farmacia
Codirector de tesis



Sara Fernández Ferreiro

Prof. Dra. Dña. **M. Carmen Louzao Ojeda**, como directora de la tesis titulada “Cardiotoxicidad de las ficotoxinas marinas”.

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis presentada por **Doña Sara Fernández Ferreiro** es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios del Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para el desarrollo de este trabajo.

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

Lugo, a 2 de Mayo de 2016



M. Carmen Louzao Ojeda
Doctora en Biología
Codirectora de tesis



Sara Fernández Ferreiro

Prof. Dra. Dña. **Natalia Vilariño del Río**, como directora de la tesis titulada “Cardiotoxicidad de las ficotoxinas marinas”.

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis presentada por **Doña Sara Fernández Ferreiro** es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios del Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para el desarrollo de este trabajo.

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

Lugo, a 2 de Mayo de 2016

Natalia Vilariño del Río
Doctora en Veterinaria
Codirectora de tesis

Sara Fernández Ferreiro

Mil gracias a...

Al Dr. Luis M. Botana por brindarme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral.

A la Dra. M. Carmen Louzao por guiarme profesional y personalmente a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Natalia Vilariño por confiar en mí para este proyecto, por contagiarme tus inmensas ganas de aprender y por enseñarme lo que significa la investigación. Inestimable todo tu apoyo en los momentos más duros, de corazón muchas muchas gracias.

A la Dra. Cristina Carrera porque desde el inicio al final de este camino no hay palabras que pueda usar para agradecerte TODO lo que has hecho por mí.

A Maruxiña porque sin tu paciencia y apoyo, este trabajo no hubiera sido posible.

A Silvia por tan necesarias charlas y todo tu inmenso cariño.

A Laura, Diego, Andrea, Andrés, Marta, Jon, Víctor y María, compañeros de fatigas y de inolvidables viajes, ¡ha sido todo un placer compartir con vosotros esta aventura!

A todos aquellos que de una u otra manera formasteis parte de mi día a día en el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos, porque sin duda sois ¡los mejores! A Ruth en especial por tu gran aportación artística y tu siempre predisposición para ayudar.

A mi familia, por vuestro apoyo incondicional.

A mis hermanos, porque nada sería lo mismo sin vosotros.

A Hectorín, porque no se puede soñar con tener un compañero de vida mejor. Estar a tu lado me hace querer ser cada día mejor.

A mi madre, porque todo lo que soy te lo debo a ti.

A mi padre, porque nada me gustaría más en el mundo que pudieras estar aquí para verme, para verlo.

RESUMEN

Las ficotoxinas son compuestos tóxicos producidos por determinadas especies de microalgas y acumuladas predominantemente en moluscos filtradores llegan al hombre a través de la red trófica. Las intoxicaciones por consumo de alimentos contaminados con estas toxinas entrañan un importante riesgo para la seguridad alimentaria. La regulación del contenido de ficotoxinas en los alimentos destinados al consumo humano debe basarse en datos toxicológicos que garanticen la protección de la salud humana. La toxicidad aguda de muchas de las toxinas emergentes y la toxicidad crónica de todas ellas en general son en gran medida desconocidas. En relación a los efectos cardiotoxicos de las ficotoxinas se sabe que algunas de ellas modifican la función cardíaca *in vivo*. Sin embargo, se desconocen los efectos cardíacos de la mayoría de estos compuestos; a pesar de que en algunos casos la información existente sugiere cardiotoxicidad. El objetivo propuesto para esta Tesis Doctoral ha sido el estudio del potencial cardiotoxico agudo y subagudo de las toxinas marinas pertenecientes a los grupos ácido ocadaico (AO) y dinofisistoxinas (DTXs), yesotoxinas (YTXs) y azaspirácidos (AZAs) mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* recomendados por expertos y guías especializadas. La cardiotoxicidad *in vitro* se determinó mediante la evaluación de la actividad de estas toxinas en el canal cardíaco hERG (human ether-a-go-go related gen), concretamente su capacidad para alterar las corrientes medidas mediante técnicas electrofisiológicas o el tráfico celular a largo plazo. Los estudios *in vivo* analizaron la función y estructura cardíacas en ratas después de la administración aguda o subaguda de las toxinas. Los resultados *in vitro* muestran que el AO, la YTX y el AZA-2 no poseen actividad de relevancia fisiológica en el canal hERG. Los estudios *in vivo* realizados evidencian un efecto cardiotoxico agudo para el AZA-2 que se manifiesta como alteraciones funcionales en el ritmo y la conducción del corazón. Además, la exposición repetida a YTX y AZA-1 provoca alteraciones funcionales y ultraestructurales a nivel cardiovascular. El daño cardíaco se manifestó también por la activación de la autofagia o la apoptosis en los tejidos cardíacos de las ratas tratadas con YTX o AZA-1 respectivamente. En conclusión, los resultados de esta Tesis Doctoral proporcionan por primera vez una significación fisiopatológica funcional a los efectos cardíacos histopatológicos descritos con anterioridad para la YTX y confirman un potencial cardiotoxico *in vivo* de los AZAs que hasta el momento no se había descrito. Esta información toxicológica debe de ser considerada por el riesgo que ambas toxinas pueden suponer para la seguridad alimentaria y por ende para la salud pública.

Palabras clave: ficotoxinas, cardiotoxicidad, hERG, efecto funcional, efecto estructural.

RESUMO

As ficotoxinas son compostos tóxicos producidos por determinadas especies de microalgas e acumuladas maioritariamente en moluscos filtradores chegan ao home a través da rede trófica. As intoxicacións por consumo de alimentos contaminados con estas toxinas entrañan un importante risco para a seguridade alimentaria. A regulación do contido destas ficotoxinas nos alimentos destinados ao consumo humano debe basearse nuns datos toxicolóxicos que garantan a protección da saúde humana. A toxicidade aguda de moitas das toxinas emerxentes e a toxicidade crónica de todas elas en xeral son en gran medida descoñecidas. En relación aos efectos cardiotóxicos das ficotoxinas sábese que algunhas delas modifican a función cardíaca *in vivo*. Nembargante, descoñécense os efectos cardíacos da maioría destes compostos; apesares de que nalgúns casos a información dispoñible suxire cardiotoxicidade. O obxectivo desta Tese Doutoral foi o estudo do potencial cardiotóxico agudo e subagudo das toxinas mariñas pertencentes os grupos ácido ocadaico (AO) e dinofisistoxinas (DTXs), yesotoxinas (YTXs) e azaspirácidos (AZAs) mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* recomendados por expertos e guías especializadas. A cardiotoxicidade *in vitro* examinouse mediante a determinación da actividade destas toxinas no canal cardíaco hERG (human ether-a-go-go related gen), concretamente na súa capacidade para alterar as correntes medidas con técnicas electrofisiolóxicas ou o tráfico celular a longo prazo. Os estudos *in vivo* analizaron a función e estrutura cardíacas en ratas despois da administración aguda ou subaguda das toxinas. Os resultados *in vitro* evidencian que o AO, a YTX e o AZA-2 non posúen actividade de relevancia fisiolóxica no canal hERG. Os estudos *in vivo* amosan un efecto cardiotóxico agudo para o AZA-2 que se visualiza como alteracións funcionais no ritmo e na condución do corazón. Ademais, a exposición repetida a YTX e AZA-1 causa alteracións funcionais e ultraestruturais a nivel cardiovascular. O dano cardíaco manifestouse tamén pola activación da autofaxia e a apoptose no tecidos cardíacos das ratas tratadas coa YTX e o AZA-1 respectivamente. En conclusión, os resultados desta Tese Doutoral proporcionan por primeira vez unha significación fisiopatolóxica funcional ós efectos cardíacos histopatolóxicos descritos con anterioridade para a YTX e confirman un potencial cardiotóxico *in vivo* dos AZAs que ata o momento non fora descrito. Esta información toxicolóxica debe ser considerada polo risco que ambas toxinas poden supor para a seguridade alimentaria e por ende para a saúde pública.

Palabras clave: ficotoxinas, cardiotoxicidade, hERG, efecto funcional, efecto estrutural.

SUMMARY

Phycotoxins are toxic compounds produced by specific micro-algae species that predominantly accumulate in filter feeding mollusks and reach humans through the trophic web. The intoxications by consumption of toxin contaminated shellfish entail an important food security risk. The regulated contents of phycotoxins in food destined to human consumption must be based on toxicological data that preserve human health. Acute toxicity of emerging toxins and chronic toxicity of the majority of them are not well-known. With regard to cardiotoxic effects, some marine toxins are described as compounds that modify heart function *in vivo*. In spite of these cardiotoxicity data, the cardiac effects of the majority of phycotoxins remain unidentified. The aim of this Doctoral Thesis was the study of acute and subacute cardiotoxic potential of the marine phycotoxins groups okadaic acid (OA) and dynophysistoxins (DTXs), yessotoxins (YTXs) and azaspiracids (AZAs) using *in vitro* and *in vivo* experiments recommended by experts and specialized guides. *In vitro* cardiotoxicity was explored by the assessment of the activity of these toxins on hERG (human ether-a-go-go related gen) cardiac channel, especially their capacity to alter the currents measured by electrophysiological techniques or the cellular trafficking alterations in the long term. *In vivo* studies tested heart function and structure in rats after acute or subacute toxin administrations. *In vitro* results showed that OA, YTX and AZA-2 do not have any activity of physiological relevance on hERG channel. *In vivo* studies evidenced an acute cardiotoxic effect of AZA-2 that caused functional disorders in the heart rhythm and conduction. Furthermore, cardiovascular functional and ultrastructural alterations were evidenced after repeated exposures to YTX and AZA-1. Heart damage is supported by the activation of autophagy and apoptosis in heart tissues of rats that received YTX and AZA-1 respectively. In conclusion, the results of this Doctoral Thesis provide for the first time functional and histopathological meaning of cardiac effects described previously for YTX and confirm an *in vivo* cardiotoxic potential for AZAs that had not been described before. This toxicological data should be considered when evaluating the risk that both toxins might suppose to food security and human health.

Keywords: phycotoxins, cardiotoxicity, HERG, functional effects, structural effects.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AD	Ácido domoico
ADN	Ácido desoxirribonucleico nuclear
ALKP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP (AMP-activated protein kinase)
ANP	Péptido atrial natriurético (atrial natriuretic peptide)
AO	Ácido ocadaico
ASP	Intoxicación amnésica por consumo de molusco (amnesic shellfish poisoning)
ATP	Trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate)
AZA	Azaspirácido
AZP	Intoxicación por azaspirácido (azaspiracid poisoning)
BNP	Péptido natriurético cerebral (brain natriuretic peptide)
BUN	Nitrógeno ureico en sangre (blood urea nitrogen)
Caspasas	Cisteinil-aspartato proteasas (cysteine-aspartic proteases)
CFP	Intoxicación ciguatérica por consumo de pescado (ciguateric fish poisoning)
CHOL	Colesterol
CREA	Creatinina
cTnC	Troponina cardíaca C
cTnI	Troponina cardíaca I
cTnT	Troponina cardíaca T
CVD	Enfermedad cardiovascular (cardiovascular disease)
CTX	Ciguatoxina
D _{L50}	Dosis letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSP	Intoxicación diarreica por consumo de molusco (diarrhetic shellfish poisoning)
DTX	Dinofisistoxina
ECG	Electrocardiograma
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Security Agency)
EMA	Agencia Europea del Medicamento (European Medicine Agency)
FAO	Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FC	Frecuencia cardíaca (heart rate, HR)
GLU	Glucosa

hERG	Gen humano codificante <i>ether a go-go</i> (human <i>ether a go-go</i> related gen)
IL	Interleuquina
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada al microtúbulo (microtubule-associated protein light chain-3)
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasas intersticiales
MTX	Maitotoxina
PAS	Presión arterial sanguínea (arterial blood pressure, ABP)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PLTX	Palytoxina
PbTx	Brevetoxina
PHOS	Fósforo (phosphorus)
PP1	Fosfatasa de proteína de serina/treonina 1
PP2A	Fosfatasa de proteína de serina/treonina 2A
PSP	Intoxicación paralizante por consumo de molusco (paralytic shellfish poisoning)
PTX	Pectenotoxina
RE	Retículo endoplasmático
RS	Retículo sarcoplasmático
SPX	Espirólidos (spirolicids)
STX	Saxitoxina
TdP	Arritmias fatales (torsades de pointes)
TIMPs	Inhibidor del tejido de las metaloproteinasas (tissue inhibitor metalloproteinases)
TTX	Tetrodotoxina
VO	Vía oral
YTX	Yesotoxina

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. FICOTOXINAS MARINAS	3
1.1.1. <i>Ácido ocadaico y derivados</i>	7
1.1.2. <i>Yesotoxina</i>	10
1.1.3. <i>Azaspíricidos</i>	12
1.2. SISTEMA CARDIOVASCULAR	15
1.2.1. <i>Anatomía del corazón</i>	15
1.2.2. <i>Estructura cardíaca</i>	16
1.2.3. <i>Electrofisiología cardíaca</i>	19
1.2.4. <i>Sistema especializado de excitación y conducción eléctrica del corazón</i>	20
1.2.5. <i>Mecanismo de contracción cardíaca</i>	21
1.2.6. <i>Regulación del corazón</i>	22
1.3. ESTUDIO DE LA CARDIOTOXICIDAD	24
1.3.1. <i>Estudio de la cardiotoxicidad in vitro</i>	24
1.3.1.1. <i>Efectos en el canal cardíaco hERG</i>	25
1.3.2. <i>Evaluación de la cardiotoxicidad in vivo</i>	27
1.3.2.1. <i>Electrocardiografía</i>	27
1.3.2.2. <i>Medición de la presión arterial</i>	29
1.3.2.3. <i>Biomarcadores de cardiotoxicidad</i>	30
<i>Troponinas cardíacas</i>	31
<i>Péptidos natriuréticos</i>	32
<i>Marcadores de remodelado de la matriz intersticial</i>	32
1.3.2.4. <i>Histopatología</i>	33
1.4. TOXINAS MARINAS Y CARDIOTOXICIDAD	36
2. OBJETIVOS	41
3. PUBLICACIONES	45
3.1. BLOQUE I: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL CARDIOTÓXICO AGUDO DE LAS TOXINAS MARINAS AO Y DTX-1, YTX Y AZA-2.....	51
<i>Artículo 1. Acute cardiotoxicity evaluation of the marine biotoxins OA, DTX-1 and YTX.</i>	53
<i>Artículo 2. In vivo arrhythmogenicity of the marine biotoxin azaspiracid-2 in rats.</i>	75
3.2. BLOQUE II: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL CARDIOTÓXICO SUBAGUDO DE LAS TOXINAS MARINAS YTX Y AZAS.	93
<i>Artículo 3. In vitro chronic effects on hERG channel caused by the marine biotoxin azaspiracid-2.</i>	95
<i>Artículo 4. Subacute cardiovascular toxicity of the marine phycotoxin azaspiracid-1 in rats.</i>	105
<i>Artículo 5. Subacute cardiotoxicity of yessotoxin: in vitro and in vivo studies.</i>	125
<i>Artículo 6. In vivo cardiomyocyte response to YTX and AZA-1-induced damage: autophagy vs. apoptosis.</i>	141
<i>Artículo 7. Subacute immunotoxicity of the marine phycotoxin yessotoxin in rats.</i>	165
4. DISCUSIÓN	191
5. CONCLUSIONES	205
6. BIBLIOGRAFÍA	209



1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ficotoxinas marinas

El fitoplancton es el conjunto de organismos acuáticos autótrofos con capacidad fotosintética que flotan en aguas dulces o saladas y que constituyen la base de la cadena trófica. En la actualidad, se han descrito más de 5000 especies de fitoplancton. Ante determinadas circunstancias ambientales, hasta 300 de estas especies fitoplanctónicas aumentan su ratio de proliferación originando una mayor densidad de las mismas en el medio acuático y dando lugar al fenómeno conocido como floración algal [1, 2]. De las 300 mencionadas, 40 especies pertenecientes al grupo de los dinoflagelados y diatomeas producen ficotoxinas [2-4] responsables de las denominadas floraciones de algas nocivas tóxicas. En el medio marino, estas toxinas se acumulan en los organismos por filtración directa de sus algas productoras, y a su vez, en otros a través de las relaciones tróficas [1, 2, 5]. Por ello, los moluscos bivalvos filtradores como los mejillones, las ostras, las almejas o las vieiras se consideran los principales vectores; si bien de manera continua se descubren otros nuevos [2, 6]. Cuando estos mariscos contaminados acceden al hombre dan lugar a intoxicaciones alimentarias de diversas características y severidad.

Las floraciones de algas nocivas tóxicas son un fenómeno de creciente frecuencia y peligrosidad en los últimos años debido al calentamiento global y a la eutrofización, entre otros fenómenos antropogénicos [1, 7-9]. Alrededor de un total de 60.000 casos de intoxicaciones por toxinas marinas se describen en el mundo al año; cifra que por otro lado se conjetura subestimada considerando las posibles intoxicaciones alimentarias no registradas por su levedad o por asociación con otros agentes causales de sintomatología común [10, 11].

En la actualidad, las intoxicaciones alimentarias por consumo de marisco están consideradas como un factor de riesgo importante para la seguridad alimentaria y por ende para la salud pública; mención aparte del impacto negativo en las industrias pesquera, acuícola, conservera y turística [12]. Las autoridades sanitarias de la Unión Europea (UE) y de otros países, en atención a esta problemática y con intención de garantizar la seguridad alimentaria de los

1. Introducción

consumidores, han regulado los límites máximos permitidos para determinados grupos de toxinas marinas en alimentos concretos destinados al consumo humano; además de establecer los métodos de detección específicos [10, 13-17]. Para comprobar el cumplimiento de estos límites, se llevan a cabo programas de vigilancia y control que incluyen también la detección rutinaria de toxinas nuevas o desconocidas en las zonas de producción y de reinstalación de mariscos [18, 19].

Inicialmente la clasificación de las ficotoxinas marinas se realizó en base a los síndromes clínicos que se producían en humanos. Así, en atención a los síntomas provocados se describen cuatro tipos de intoxicación por consumo de molusco: amnésica (ASP, amnesic shellfish poisoning), diarreica (DSP, diarrhetic shellfish poisoning), neurotóxica (NSP, neurotoxic shellfish poisoning) y paralizante (PSP, paralytic shellfish poisoning); existiendo además un quinto tipo, en este caso por consumo de pescado, la denominada intoxicación ciguatérica (CFP, ciguateric fish poisoning). Con el transcurso de los años, la aparición de nuevas toxinas y los constantes avances científicos en el estudio de las ya descritas, han reflejado una ineficacia e inexactitud de esta clasificación. Como consecuencia, y en recomendación de los expertos científicos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, en inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations), la clasificación de las toxinas marinas se realiza en la actualidad en base a su estructura química [20]. Atendiendo a este criterio, los diferentes grupos de toxinas marinas, además de los tipos de intoxicaciones que provocan y sus compuestos más representativos están reflejados en la Tabla 1. En la misma también se indican los límites máximos permitidos de las toxinas que actualmente se encuentran reguladas en la UE [13, 14, 17].

Tabla 1. Clasificación de las toxinas marinas.

Clase de toxina	Síndrome	Toxina/s representativa/s	Límite máximo de toxina en la UE ^[13, 14]
Toxinas paralizantes	Intoxicación paralizante por consumo de molusco (PSP)	Saxitoxina (STX)	0,8 mg/kg CM
Toxinas diarreicas	Intoxicación diarreica por consumo de molusco (DSP)	Ácido ocadaico (AO) y dinofisistoxinas (DTXs)	0,16 mg/kg* CM
Toxinas amnésicas	Intoxicación amnésica por consumo de molusco (ASP)	Ácido domoico (AD)	20 mg/kg CM
Azaspirácidos	Intoxicación por azaspirácido (AZP)	Azaspirácido-1 (AZA-1)	0,16 mg/kg CM
Brevetoxinas	Intoxicación neurotóxica por consumo de molusco (NSP)	Brevetoxina-1 y 2 (PbTx-1 y 2)	
Pectenotoxinas		Pectenotoxina-2 (PTX-2)	0,16 mg/kg* CM
Yesotoxinas		Yesotoxina (YTX)	3,75 mg/kg CM ^[17]
Inminas cíclicas		Gymnodiminas, pinnatoxinas y espirólidos (SPXs)	
Ciguatoxinas	Intoxicación ciguatérica por consumo de pescado (CFP)	Ciguatoxina (CTX)	Ausencia**
Palytoxinas		Palytoxina (PLTX)	

CM: carne de molusco

*Límite máximo de la suma de OA, DTXs y pectenotoxinas: 0,16 mg de equivalentes de OA/kg CM.

**La UE exige su ausencia en los productos pesqueros destinados al consumo humano.

1. Introducción

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, en inglés European Food Safety Agency), y concretamente el grupo de expertos científicos de los contaminantes de la cadena alimentaria (en inglés, CONTAM panel), realiza informes de opinión científica de los diferentes grupos de toxinas. Entre otros aspectos de interés, estos trabajos detallan el análisis de riesgo realizado para las mismas; siendo la exposición a las toxinas marinas y la caracterización del riesgo en base a los datos toxicológicos disponibles dos de sus elementos fundamentales.

La exposición de la población a las toxinas marinas responde a dos factores principales: la cantidad de marisco consumido y la frecuencia de aparición de estos compuestos en estos productos pesqueros. Debido a que los datos de consumo de marisco son escasos, el CONTAM panel de la EFSA establece una ración de consumo de marisco elevada dado el carácter agudo y urgente de este tipo de intoxicaciones y en aplicación del principio de precaución que caracteriza las actuaciones en materia de seguridad alimentaria de la UE. De esta manera, y basándose en estudios de hábitos de consumo, una cantidad de 400 g de carne de molusco está establecida como la ración tipo de marisco para la estimación del riesgo de los diferentes grupos de toxinas [21, 22]. Este tamaño de ración es considerado como excesivo por algunos expertos, y de hecho el Código Alimentarius de la FAO recomienda una cantidad de 250 g para la realización de estas evaluaciones [23]. En lo que se refiere a la frecuencia de aparición de las toxinas marinas, ésta se encuentra actualmente monitorizada por los mencionados programas de vigilancia y control.

Por otro lado, la caracterización del riesgo de las toxinas marinas se realiza con los datos de toxicidad disponibles tanto de los estudios toxicológicos como de los episodios de intoxicación alimentaria ocurridos en humanos. A partir de esta información, y con el objetivo principal de proteger al consumidor, se estimarían, entre otros parámetros y para cada grupo de toxinas, una dosis aguda de referencia (ARfD, en inglés acute reference dose) y un consumo diario tolerable (TDI, en inglés tolerable daily intake) para la prevención de los efectos agudos y crónicos respectivamente. La dosis aguda de referencia se define como la cantidad de toxina que una persona puede consumir en 24 horas o menos sin que exista riesgo apreciable para la salud. El consumo diario tolerable es, por otro lado, la cantidad de toxina que una persona puede ingerir cada día durante toda su vida sin que le cause daños en la salud. A día de hoy, la escasez de datos

de toxicidad crónica disponibles para las toxinas marinas supone que no se puedan determinar los consumos diarios tolerables de las toxinas actualmente reguladas en la UE [22, 24-30].

A continuación se describen los grupos de ficotoxinas utilizados en la presente Tesis Doctoral, y que se corresponden con el ácido ocadaico y sus derivados, las yesotoxinas y los azaspirácidos.

1.1.1. Ácido ocadaico y derivados

El ácido ocadaico (AO) y las dinofisistoxinas (DTXs) (Figura 1) son un grupo de ficotoxinas lipofílicas producidas por dinoflagelados del género *Dinophysis* y *Prorocentrum* [31, 32] y responsables de la intoxicación diarrea por consumo de molusco (DSP) [33]. Los primeros casos fueron referidos en Los Países Bajos y Japón en la década de los 60 y los 70 respectivamente [34, 35]. En la actualidad, estos compuestos se detectan en numerosos puntos geográficos, siendo Europa y Japón dos de las localizaciones con mayor prevalencia [24]. Las toxinas responsables de la DSP incluyen al AO, las DTXs y otros tres compuestos recientemente descritos, el 19-epi-AO, la norokadanona y el ácido beliceánico [36, 37]. Atendiendo a su toxicología y estructura química, el AO y las DTXs son las moléculas más conocidas. El AO es un poliéter cíclico formado por una cadena principal de 38 carbonos con un grupo carboxilo y cuatro hidroxilos. Las DTXs resultan de la modificación química del AO, de tal modo que la DTX-1 posee un grupo metilo adicional en la posición C35, la DTX-2 es un isómero del mismo y la DTX-3 se corresponde con una mezcla de derivados esterificados del AO, la DTX-1 y la DTX-2 con ácidos grasos saturados e insaturados (Figura 1).

El síndrome DSP se caracteriza fundamentalmente por severos síntomas gastrointestinales como diarrea, náuseas, vómitos, dolor abdominal y escalofríos [33]. Los moluscos bivalvos filtradores como los mejillones, las ostras o las vieiras se consideran sus principales vectores de transmisión, aunque han sido detectadas también en otros organismos como los crustáceos o los gasterópodos [38-43].

Las autoridades europeas con la intención de garantizar la seguridad alimentaria y proteger la salud humana han regulado los niveles de estas toxinas en moluscos bivalvos destinados al consumo. Aunque en la actualidad las pectenotoxinas (PTXs) están

1. Introducción

consideradas como grupo independiente de toxinas, su detección se incluye dentro de los límites de este grupo debido a su aparición inicial conjunta [27]. De este modo, la normativa europea de aplicación establece que el cuerpo entero o cualquier parte consumible por separado de los moluscos bivalvos no contendrá biotoxinas marinas en cantidades totales que sobrepasen el límite de 160 µg de equivalentes de AO por kg para la combinación de AO, DTXs y PTXs [13, 24].

Los estudios toxicológicos para la evaluación de la letalidad de este grupo de toxinas muestran dosis letales 50 (DL₅₀) por vía intraperitoneal (IP) en un rango de 204 a 225 µg/kg de peso vivo de ratón para el AO [44-46] y de 352 µg/kg para la DTX-2 [44]. En el caso de la DTX-1 se describe una dosis letal mínima (MLD, en inglés minimum lethal dose) de 160 µg/kg [47]. Por vía oral (VO), los valores de las DL₅₀ disponibles para el AO son muy variables, yendo desde los 400 µg/kg hasta los 2000 µg/Kg [45, 48, 49].

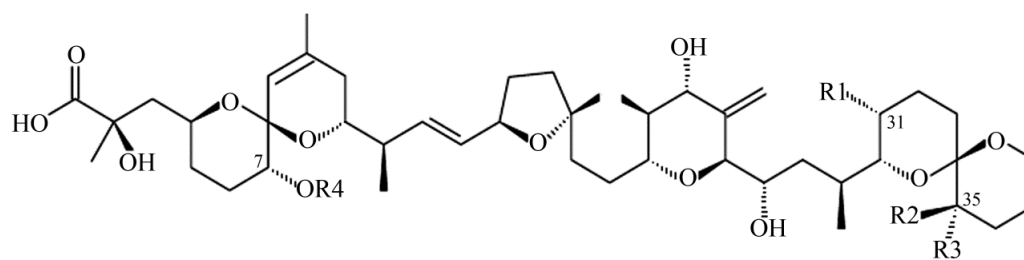
Las evaluaciones toxicológicas *in vivo* de carácter agudo muestran daños en intestino y en hígado en cuando estas toxinas se administran a roedores por vía oral e intraperitoneal [50-52]. Para el caso particular del AO, y también en estudios de administración aguda, se han descrito alteraciones en bazo y timo después de su administración oral en ratones [53] y daño hepático en ratas después de su inyección por vía intravenosa (IV) [54]. Los estudios de carácter crónico del AO revelaron daños estructurales en estómago, páncreas, hígado y órganos linfoides; así como ultraestructurales en el miocardio de ratones [55, 56]. Además, al AO se le atribuye una posible actividad como promotor tumoral en el tracto gastrointestinal de ratas [57-59].

En relación a la toxicocinética de este grupo de toxinas, un estudio *in vivo* mostró que el AO, administrado por vía oral a dosis altas, se absorbe y detecta en la totalidad del organismo [60]. Además, estudios *in vitro* más recientes, que han empleado una línea celular utilizada con frecuencia como modelo del epitelio del intestino humano y menores concentraciones de toxina, describen que tanto el AO como la DTX-1 atraviesan el epitelio intestinal, si bien ésta última presenta una mayor actividad tóxica a este nivel [61-63].

El AO y sus análogos DTX-1 y DTX-2 inhiben de manera específica las fosfatasa de proteína de serina/treonina, principalmente la 1 (PP1) y la 2A (PP2A) [64, 65]. Este grupo de enzimas se encarga de la defosforilación de los residuos serina/treonina de las proteínas de las células eucariotas, por lo que su inhibición supone la hiperfosforilación de las mismas con

importantes consecuencias en numerosos procesos de regulación celular como el metabolismo, la división, el transporte de membrana o la síntesis proteica. De hecho, numerosos estudios *in vitro* se han realizado con la intención de definir sus consecuencias a nivel celular, molecular e incluso genético. Citotoxicidad, neurotoxicidad, inmunotoxicidad, embriotoxicidad, genotoxicidad, carcinogénesis y promoción tumoral han sido algunos de los efectos descritos para el AO en estos estudios [66].

En base a los datos toxicológicos disponibles tanto de estudios realizados en animales como procedentes de episodios de intoxicación ocurridos en humanos, la EFSA ha publicado un informe que incluye la estimación del riesgo en la seguridad alimentaria frente al consumo de moluscos bivalvos que contengan toxinas de este grupo. En este informe se establece una dosis aguda de referencia para el AO y sus derivados de 0,3 µg de equivalentes de AO por kg de peso vivo y se calcula en un 20% la probabilidad de excederla cuando una persona de 60 kg de peso consume una cantidad de 400 g de carne de molusco procedente de los mercados comunitarios. Esta probabilidad es elevada porque su determinación se realiza a partir del consumo de la ración tipo de marisco considerada por la EFSA. Esta cantidad se establece como alta para proteger al consumidor de los efectos agudos de estos compuestos, pero no se corresponde con los consumos habituales de marisco [24].



	R1	R2	R3	R4
OA	Me	H	H	H
DTX-1	Me	Me	H	H
DTX-2	H	H	Me	H
DTX-3	H/Me	H/Me	H/Me	fatty acid

Figura 1. Estructura química del AO y las DTXs.

1. Introducción

1.1.2. Yesotoxina

La yesotoxina (YTX) (Figura 2) es una ficotoxina lipofílica identificada por primera vez en 1986 en Japón en la vieira *Patinopecten yessoensis* [67] y producida por dinoflagelados del género *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Gonyaulux spinifera* [68-70]. La YTX se incluyó inicialmente en el grupo de las toxinas diarreicas debido a su detección simultánea con los componentes de este grupo. Sin embargo, su estructura química diferente, un poliéter disulfurado con forma característica de escalera compuesto por 11 anillos adyacentes de éter y una cadena insaturada terminal lateral (Figura 3); junto con la carencia de efectos gastrointestinales y de capacidad de inhibición de las fosfatasas, supusieron la clasificación de la YTX en un grupo de toxinas independiente.

Desde su primera identificación, esta toxina se ha detectado en numerosos y distantes puntos del planeta como Chile, Rusia o España en moluscos bivalvos principalmente; aunque también en gasterópodos [42, 71-77]. Además alrededor de un total de 30 análogos se han aislado tanto en algas como en marisco [75]. Hasta la fecha, no hay registro de intoxicaciones alimentarias directamente asociadas a la presencia de YTX en marisco [78]. Pese a ello, su detección inicial conjunta con las toxinas diarreicas supuso la regulación de su límite máximo en marisco por parte las autoridades de seguridad alimentaria europeas. Esta cantidad se fijó de manera inicial en 1 mg de equivalentes de YTX por kg de carne de molusco destinado al consumo [13, 25]. Sin embargo, en 2013 y por recomendación del Códex Alimentarius de la FAO y la EFSA ante la inexistencia de datos de toxicidad concluyentes, este límite ha sido aumentado a 3,75 mg de equivalentes de YTX por kg [17]. Con todo, la regulación de la YTX continúa siendo un tema de controversia entre las autoridades sanitarias y los expertos científicos debido a la ausencia de evidencias que demuestren irrefutablemente su toxicidad.

Los datos de letalidad de la YTX, procedentes de las evaluaciones toxicológicas realizadas en ratones, muestran un amplio rango de DL₅₀ para la YTX por vía intraperitoneal, concretamente desde los 286 µg/kg hasta los 750 µg/kg. Sin embargo, dosis administradas por vía oral de hasta 54 mg/kg no provocaron letalidad [45, 79-82].

Los estudios de toxicidad aguda *in vivo* muestran sintomatología nerviosa y mortalidad sólo después de la administración intraperitoneal de la YTX en ratones. El corazón se propone como órgano diana de esta toxina debido a que diversos estudios han detectado alteraciones ultraestructurales en el músculo cardíaco tanto después de administraciones orales e intraperitoneales agudas como de la oral repetida [45, 55, 56, 79, 81, 83]. Asimismo, se han descrito daños en el sistema nervioso, en el timo o en el intestino después de la administración aguda de la toxina a dosis letales o subletales [84, 85]. La evaluación de la toxicocinética de la YTX muestra una absorción escasa a nivel intestinal, lo cual explica su menor toxicidad por vía oral [83].

Los estudios *in vitro* realizados describen variedad de efectos de la YTX a nivel celular. En este sentido, esta toxina se describe como citotóxica y activadora de las rutas de muerte celular por apoptosis, paraptosis o autofagia en diferentes líneas celulares [86-91]. Además la YTX está relacionada con la afectación de componentes celulares concretos como el citoesqueleto, las moléculas de adhesión E-cadherinas, los lisosomas y las mitocondrias [92-95]. Por otro lado, cambios en los movimientos de calcio intracelular y de los niveles de nucleótidos cíclicos, la activación de las fosfodiesterasas o la inhibición de la fagocitosis son también mecanismos de regulación celular descritos como alterados por la acción YTX [78, 96-98]. Recientemente la YTX también se ha caracterizado como un agente causante de estrés en el retículo endoplasmático (RE) y en los ribosomas [99, 100].

La estimación del riesgo del informe de la EFSA para el grupo de las YTXs está basada en los datos disponibles de los estudios toxicológicos debido a la ausencia de episodios de intoxicación alimentaria en humanos. En ella se establece una dosis aguda de referencia de 25 µg de equivalentes de YTX por kg de peso vivo y se estima que no existe riesgo de excederla cuando una persona de 60 kg consume una porción de 400 g carne de molusco procedente de los mercados comunitarios [25].

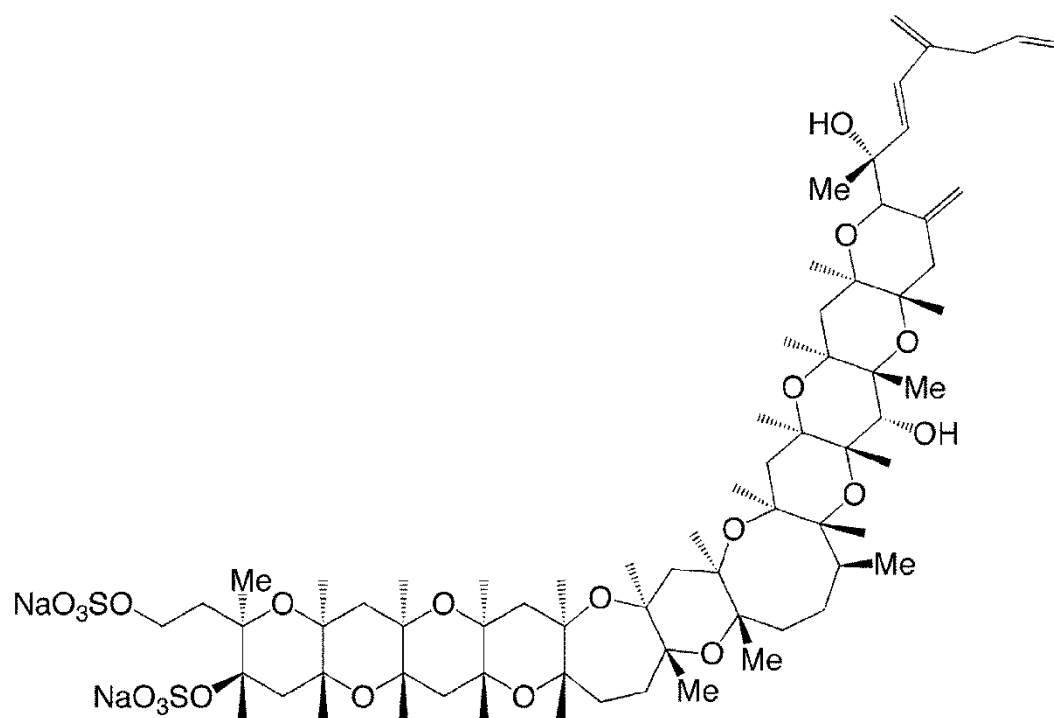


Figura 2. Estructura química de la YTX.

1.1.3. Azaspirácidos

Los azaspirácidos (AZAs) (Figura 3) son un grupo de ficotoxinas marinas producidas por dinoflagelados del género *Azadinium spinosum* [101]. El primer episodio de intoxicación alimentaria se describe en 1995 en Los Países Bajos por el consumo de mejillones de origen irlandés contaminados con AZAs [102, 103]. La sintomatología de la intoxicación por AZAs (AZP) se basa en un síndrome gastrointestinal agudo que incluye náuseas, calambres estomacales, vómitos y diarrea [104]. Desde su descubrimiento, se han descrito más de 20 análogos de AZAs [105-108], además de que múltiples han sido las zonas del globo terrestre en las que se ha detectado su presencia en mariscos [109-112]. La denominación del grupo hace referencia a su estructura química que contiene una amina cíclica (aza), que a su vez forma parte de uno de los tres anillos espiro y de un ácido carboxílico (Figura 3).

Hasta la actualidad, un total de 6 casos de AZP se han documentado en zonas de Europa y Estados Unidos [113-115], si bien se presume una incidencia mayor, considerando tanto su distribución globalizada como su sintomatología común con otras intoxicaciones alimentarias. La totalidad de episodios de AZP fueron debidos al consumo de mejillones contaminados, no obstante estas toxinas se han aislado también en otros moluscos bivalvos

como vieiras, almejas u ostras [116-118], además de en algunas especies de crustáceos [119] o en esponjas [120]. Las autoridades de seguridad alimentaria de la UE, aunque también de otros países, conscientes del riesgo que este nuevo grupo de toxinas entraña y para proteger la salud del consumidor, han regulado la presencia de los análogos de mayor toxicidad y prevalencia: el azaspirácido-1 (AZA-1), el azaspirácido-2 (AZA-2) y el azaspirácido-3 (AZA-3) en moluscos bivalvos destinados al consumo humano; quedando su límite establecido en 160 µg de equivalentes de AZA-1 por kg de carne de molusco [13, 26].

Los estudios *in vivo* realizados en ratones para la evaluación de la letalidad de este grupo de toxinas muestran una DL₅₀ por vía intraperitoneal para el AZA-1 de 200 µg/kg, siendo de 110 µg/kg para el AZA-2 y 140 µg/kg para el AZA-3 [103, 105]. Sin embargo, un estudio más reciente muestra una DL₅₀ de 74, 117 y 164 µg/kg por vía intraperitoneal y de 443, 626 y 875 µg/kg por vía oral para el AZA-1, AZA-2 y el AZA-3 respectivamente en ratones [121].

Las evaluaciones de toxicidad aguda *in vivo* de los AZAs reflejan que su administración por vía intraperitoneal a ratones provoca un cuadro de sintomatología nerviosa con aletargamiento, dificultad respiratoria, espasmos o parálisis progresiva [102, 122] y la afectación de hígado, páncreas, bazo, timo, estómago e intestino delgado [123, 124]. De forma similar, la administración oral de AZA-1 causa un fallo multiorgánico generalizado [125]. Los estudios de administración oral repetida del AZA-1 reflejan su capacidad para causar daños persistentes en tejidos y sugieren su posible actividad como iniciador tumoral [126, 127].

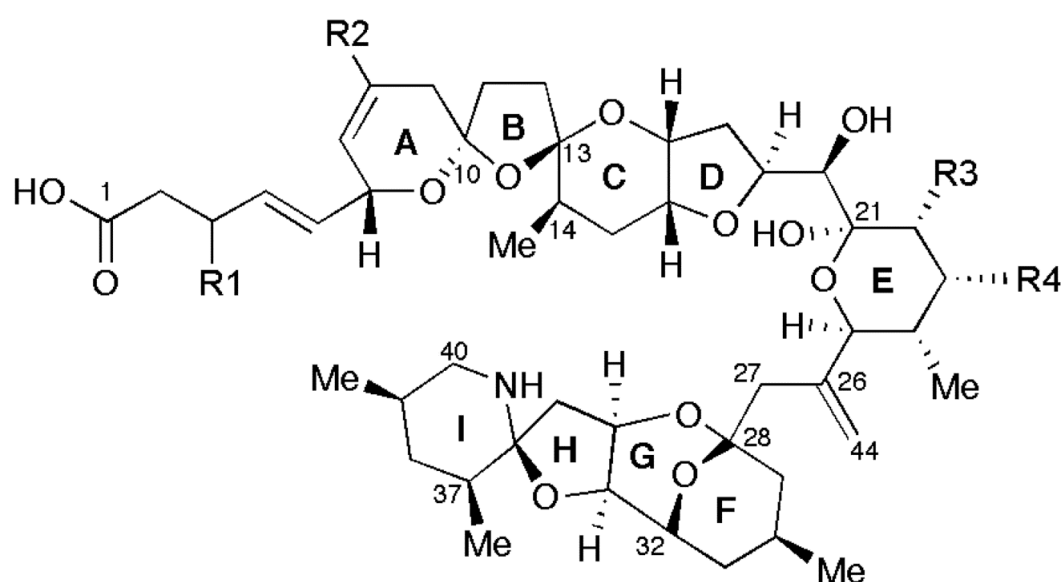
La evaluación de la toxicocinética de este grupo de toxinas muestra que a las 24 horas de su administración intraperitoneal, los análogos AZA-1, AZA-2 y AZA-3 son detectados en todos los órganos incluido el cerebro; pero que a las 24 horas de su administración oral sólo son detectados, en orden decreciente, en estómago, hígado, intestino delgado, riñones, pulmones, intestino grueso y corazón [121].

Los estudios de toxicidad *in vitro* realizados hasta la fecha, han descrito numerosos efectos a nivel celular para este grupo de toxinas; sin embargo, el mecanismo de acción de los AZAs permanece todavía desconocido. Algunos de los efectos descritos son: citotoxicidad en diferentes líneas celulares, alteraciones del citoesqueleto de actina y de las proteínas de membrana, activación de las rutas apoptóticas y modificaciones de las rutas de

1. Introducción

señalización intracelular principalmente a través de la modulación del calcio citosólico [127-134]. Finalmente, y de forma reciente, los AZAs han sido caracterizados como bloqueantes agudos de los canales de potasio cardíacos humanos hERG (human ether-a-go-go related gene) [135].

La estimación del riesgo contenida en el informe de la EFSA para el grupo de los AZAs se ha elaborado con datos de toxicidad de los estudios toxicológicos y de los episodios de intoxicaciones alimentarias en humanos. El mismo fija una dosis aguda de referencia de 0,2 µg de equivalentes de AZA-1 por kg de peso y establece una probabilidad de excederla de un 4% para una persona de 60 kg que consume una porción de 400 g carne de molusco de los mercados comunitarios [26].



	R1	R2	R3	R4
AZA-1	H	H	Me	H
AZA-2	H	Me	Me	H
AZA-3	H	H	H	H
AZA-4	OH	H	H	H
AZA-5	H	H	H	OH

Figura 3. Estructura química de los AZAs.

1.2. Sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular está conformado por dos grandes componentes: el corazón y el sistema vascular. La función principal de ambos es garantizar el aporte de nutrientes, gases respiratorios y otras sustancias necesarias para el metabolismo celular a todas las células y tejidos que componen el organismo, así como retirar los residuos generados o cualquier otro tipo de agente extraño. Además, a través de la sangre que circula por los vasos, este sistema mantiene la homeostasis interna óptima para el correcto funcionamiento del cuerpo en términos de temperatura y de pH corporal. Por todo ello, el sistema cardiovascular es esencial en la actividad de todos los órganos y principalmente en aquellos que presentan una mayor irrigación. De tal modo que, cualquier daño o alteración en el mismo supone consecuencias en la totalidad del organismo.

1.2.1. Anatomía del corazón

El corazón es el órgano encargado de propulsar la sangre a todo el cuerpo a través del sistema circulatorio. Está dividido en 4 cámaras: dos atrios, derecho e izquierdo, situados en la parte superior que funcionan como receptores de sangre; y dos ventrículos, derecho e izquierdo, situados en la parte inferior que actúan como impulsores de la misma. La sangre poco oxigenada y con detritus celulares del metabolismo es recogida por la circulación venosa en todas las partes del cuerpo e introducida en el atrio derecho por las venas cava inferior y superior. Desde éste, la sangre accede al ventrículo derecho por la válvula tricúspide y de ahí a los pulmones, por la arteria y válvula pulmonar, para su reoxigenación. La sangre, de nuevo oxigenada, llega mediante las venas pulmonares al atrio izquierdo; y desde el mismo, a través de la válvula mitral, al ventrículo izquierdo desde donde es impulsada al cuerpo a través de la válvula aórtica (Figura 4).

El movimiento de atrios y ventrículos se realiza de forma ordenada y coordinada y constituye un ciclo cardíaco que se repite en cada latido. Cada ciclo cardíaco presenta dos fases diferenciadas y controladas por un sistema de apertura y cierre de válvulas, la diástole y la sístole. La primera es la fase de relajación y llenado

1. Introducción

de sangre de los ventrículos y la segunda es la fase de contracción y eyección de la sangre [136-138].

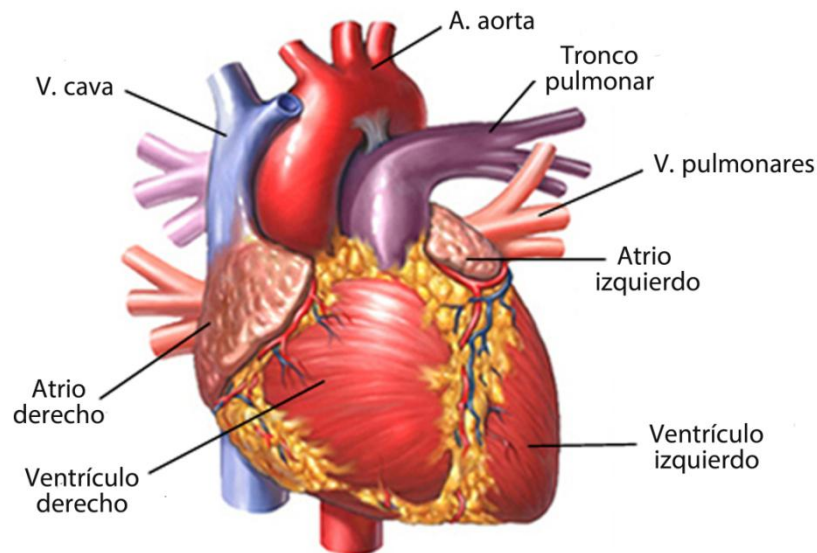


Figura 4. Anatomía del corazón
(Imagen modificada de www.anatomical.medicalillustration.com)

1.2.2. Estructura cardíaca

El corazón está formado por tres capas concéntricas: interna, de revestimiento o endocardio; media, muscular o miocardio y externa, de protección o epicardio (Figura 5A). El miocardio es la capa muscular contráctil del corazón y su unidad de contracción básica es el cardiomiocito o célula muscular cardíaca (Figura 5B). Los cardiomiocitos, entre otras estructuras y organelas típicas celulares, contienen miofibrillas, que son los elementos contráctiles. Las miofibrillas (Figura 5C) contienen a su vez a la actina y la miosina que son las proteínas encargadas de la contracción y la relajación y que forman los denominados filamentos finos de actina y filamentos gruesos de miosina. Estos filamentos se disponen dibujando un patrón alternante de bandas claras de actina, llamadas bandas I, y de bandas oscuras de miosina denominadas bandas A. En posición intermedia de cada banda I, se sitúa una densa línea, nombrada disco o línea Z. El espacio comprendido entre dos líneas Z se denomina sarcómero ó miofilamento y es la unidad fundamental de contracción

muscular (Figura 5D). Por otro lado, los cardiomiocitos se encuentran unidos por unas estructuras densas de baja impedancia, designadas como discos intercalados y que determinan su actuación como sinticio funcional. Estos discos intercalados contienen unas uniones intercelulares denominadas gap que permiten la transmisión del impulso cardíaco y la comunicación intercelular [139, 140].

El músculo cardíaco es un tejido excitable con la particularidad de que los cardiomiocitos que lo componen son células automáticas, es decir capaces de contraerse sin ningún estímulo externo, y células rítmicas, lo cual permite que mantengan una frecuencia de contracción basal. La capacidad de despolarización y contracción rítmica y sin inervación de los cardiomiocitos se denomina ritmicidad miogénica y es responsable del denominado como automatismo cardíaco [137, 141].



1. Introducción

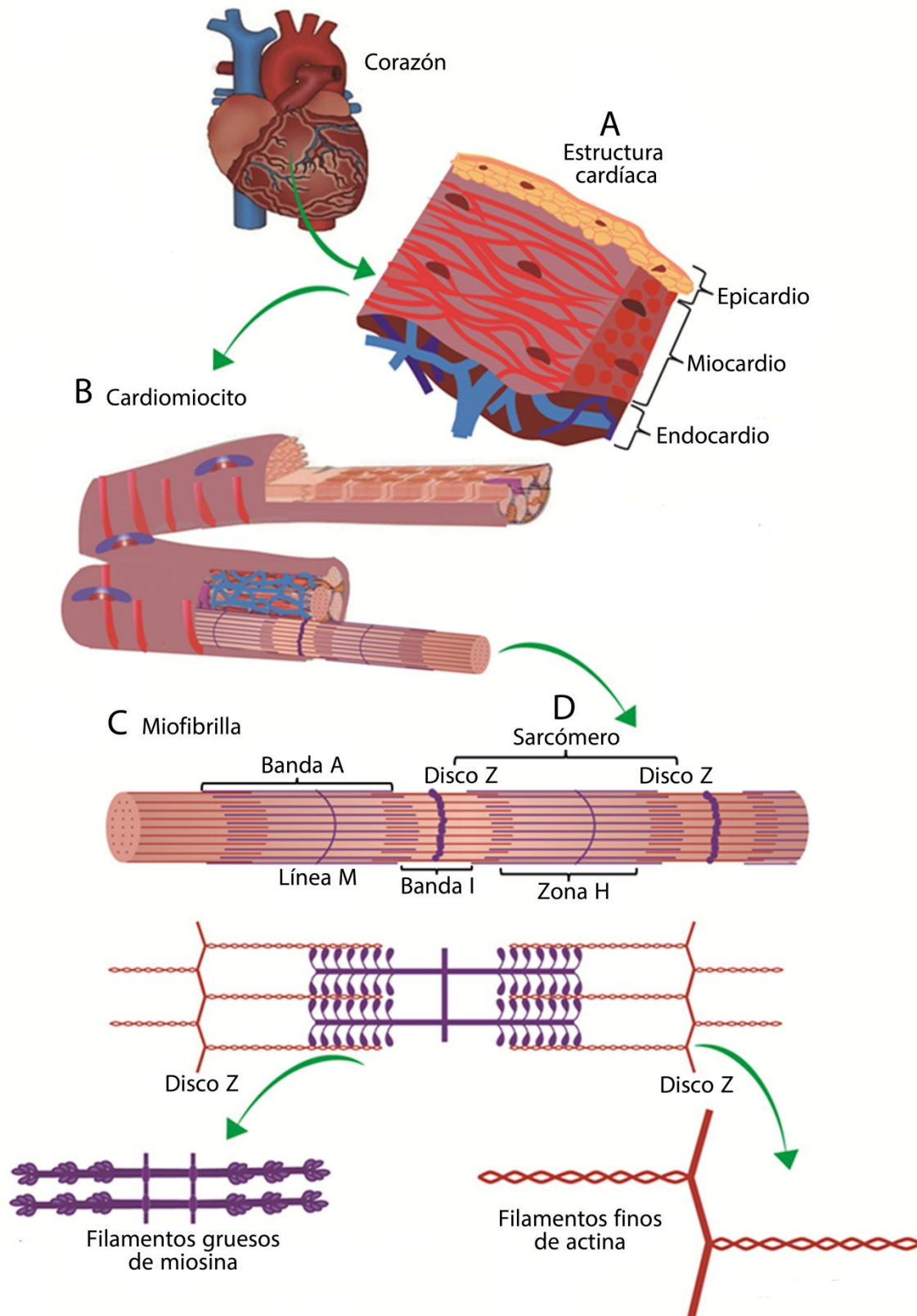


Figura 5. Estructura cardíaca y componentes de las miofibrillas de los cardiomiocitos.

1.2.3. Electrofisiología cardíaca

La actividad eléctrica cardíaca condiciona la capacidad de contracción y bombeo de la sangre por parte del corazón y está determinada por los potenciales de acción celulares que tienen lugar en la membrana de los cardiomiocitos.

El potencial de acción cardíaco (Figura 6) se genera como consecuencia del movimiento de iones que tiene lugar a través de canales iónicos transmembrana dependientes de voltaje, y se compone de 5 fases numeradas de 0 a 4, donde la fase 4 se corresponde con la célula en estado de reposo o no estimulada. La apertura de los canales rápidos de sodio (Na^+), y la consecuente entrada a la célula de una corriente de sodio (I_{Na}), suponen la activación del potencial de acción cardíaco; fase conocida como 0 o de despolarización rápida. La desactivación de los canales de Na^+ y la activación de los canales de potasio (K^+) transitorios que determinan pequeñas corrientes repolarizadoras de salida de K^+ transitorias (I_{to}), definen la fase 1. La activación de los canales de Ca^{+2} tipo-L, con la consecuente corriente de entrada de estos iones a la célula ($I_{\text{Ca-L}}$), y de los canales de K^+ , responsables de las corrientes lentas retardadas rectificadoras de potasio (I_{Ks}), caracterizan la fase 2 o de meseta. Finalmente, en la repolarización celular o fase 3, los canales de Ca^{+2} tipo-L se cierran y los canales de K^+ lentos permanecen activos al mismo tiempo que se van activando los canales de K^+ responsables de las corrientes de salida de K^+ o repolarizadoras que son la corriente rápida retardada rectificadora de potasio (I_{kr}) y la corriente rectificadora I_{K1} . En la fase 4, los canales responsables de la I_{K1} permanecen abiertos para mantener el potencial de reposo celular en valores negativos [137, 142-144].

El potencial de acción cardíaco presenta una duración larga (400ms) en comparación con otros tipos celulares. Ello persigue, por un lado conseguir la superposición en el tiempo de los fenómenos eléctrico y mecánico (contracción de la fibra), y por otro alargar los periodos refractarios para evitar generación de reexcitaciones simultáneas [137, 142].

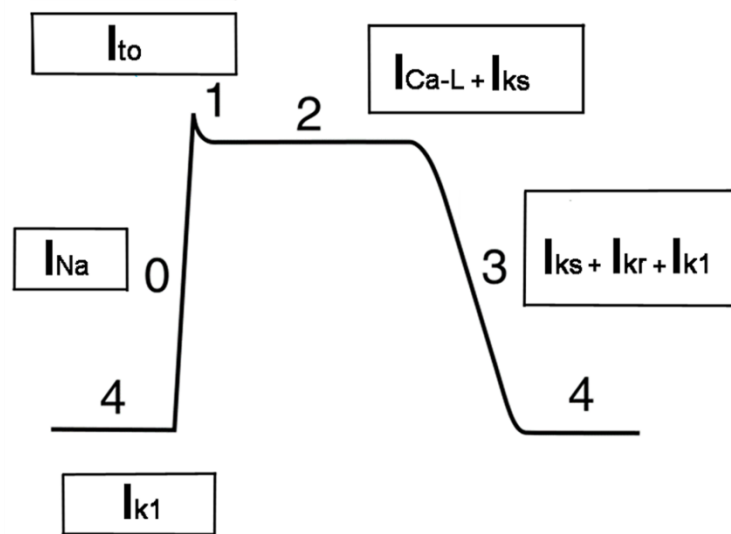


Figura 6. Potencial de acción cardíaco.

1.2.4. Sistema especializado de excitación y conducción eléctrica del corazón

La generación y propagación de un potencial de acción cardíaco es posible por la existencia de un sistema especializado de excitación y conducción del corazón, y que además permite una contracción coordinada de todas las células que lo componen. Este sistema está formado por el nódulo sinusal, el nódulo atrioventricular, el haz de His y sus ramificaciones y las fibras de Purkinje (Figura 7). El automatismo cardíaco se manifiesta sobre todo en el nodo sinusal, denominado también marcapasos fisiológico del corazón, y que situado en el atrio derecho es el encargado de dar comienzo al ciclo cardíaco mediante su despolarización espontánea. El impulso cardíaco generado atraviesa los atrios y llega al nódulo atrioventricular, donde se detiene para permitir una eficaz contracción de los atrios y un correcto llenado de los ventrículos para su posterior despolarización. Finalmente el impulso es enviado a todas las células musculares que componen los ventrículos a través del haz de His y sus ramificaciones y de las fibras de Purkinje, provocando la contracción de los mismos y la eyección de la sangre [137] .

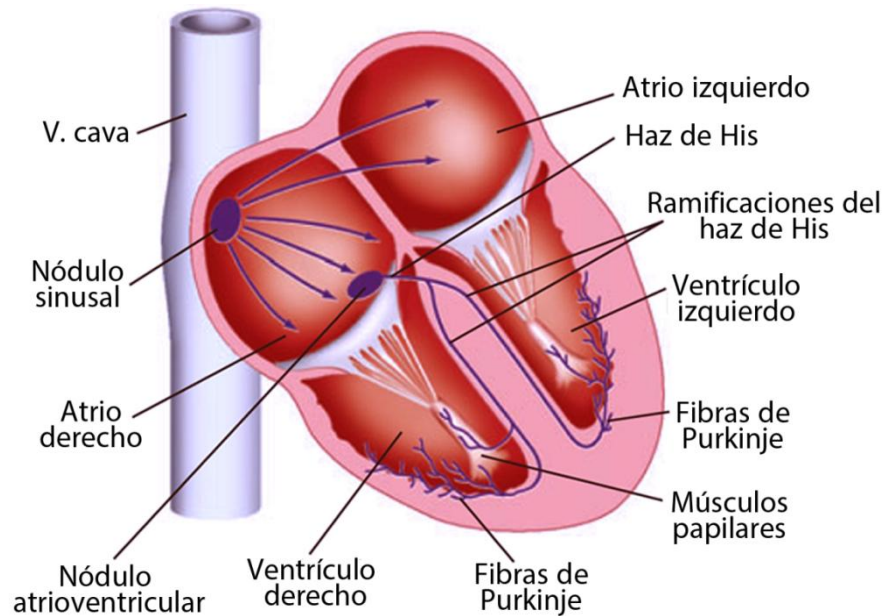


Figura 7. Sistema de conducción cardíaca.
(Imagen modificada de Berny and Levy Physiology, 6º Ed)

1.2.5. Mecanismo de contracción cardíaca

La transformación de la actividad eléctrica del corazón en trabajo mecánico de contracción se consigue gracias al mecanismo de acoplamiento-excitación-contracción de los cardiomiocitos. El funcionamiento del mismo depende de la disponibilidad de calcio y energía celular en forma de ATP. El ATP se obtiene de la fosforilación oxidativa de las mitocondrias de forma mayoritaria; lo cual explica que éstas ocupen una gran parte del espacio en la célula cardíaca y su papel esencial en el mantenimiento de la funcionalidad miocárdica. Por otro lado el calcio responsable de la contracción se obtiene fundamentalmente por dos vías, la extracelular y la intracelular. El calcio extracelular accede al interior de la célula principalmente a través de los mencionados canales de Ca^{+2} tipo-L que se abren tras la despolarización de la célula, y en menor medida a través del intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$. El calcio intracelular proviene del retículo sarcoplasmático (RS) y su llegada a todas las miofibrillas que componen la célula se garantiza por un sistema especializado de túbulos denominados T. La entrada de calcio extracelular determina la activación de unos receptores de rianodina situados en la membrana del retículo sarcoplasmático y en consecuencia la liberación de calcio de estos reservorios al citoplasma, fenómeno conocido como liberación de calcio inducida

1. Introducción

por calcio y del que se obtiene la mayoría del calcio necesario para la contracción cardíaca. La tropomiosina es una proteína situada en los filamentos de actina que actúa como mecanismo de inhibición de la interacción actina-miosina. Asimismo una molécula de ATP unida a la miosina contribuye también a dicha inhibición. Las troponinas I, C y T (TnI, TnC y TnT) son proteínas reguladoras de la tropomiosina. El aumento de calcio citosólico supone la unión de este ión a la TnC, fenómeno que a su vez desencadena la separación de la TnI de la actina y de la TnT de la tropomiosina. El cambio conformacional de este complejo tropomiosina-troponina y la hidrólisis de la molécula de ATP unida a miosina comporta la disponibilidad o exposición de los lugares de unión de los filamentos de actina y miosina. Como consecuencia ambos filamentos se superponen, acortando la longitud de la célula y provocando con ello su contracción. Cuando los niveles de calcio disminuyen y no pueden interactuar con la TnC, la tropomiosina vuelve a inhibir los lugares de unión y se produce la relajación. Los mecanismos de extrusión de calcio citosólico del cardiomiocito son varios, aunque de manera principal es el retículo sarcoplasmático, a través de su bomba $\text{Ca}^{+2}\text{ATP-asa}$, el encargado de recuperarlo desde citoplasma al interior del mismo. Por tanto, el ATP es necesario tanto en la contracción como en la relajación cardíaca [137].

1.2.6. Regulación del corazón

El gasto cardíaco se define como la cantidad de sangre bombeada por cada ventrículo en un minuto. Esta función de bombeo del corazón depende directamente de la frecuencia cardíaca y del volumen sistólico.

El corazón tiene una actividad rítmica intrínseca que determina su frecuencia basal de contracción. Sin embargo, existen factores externos de naturaleza nerviosa y hormonal que también la regulan causando los denominados efectos cronotrópicos. El sistema nervioso autónomo, a través de sus componentes simpático y parasimpático, modifica la frecuencia cardíaca. En condiciones de normalidad ambos componentes se encuentran en situación de equilibrio, pero ante situaciones anómalas la actividad de uno se puede sobreponer a la del otro. De esta manera, si predomina el componente simpático aumenta la frecuencia cardíaca, fenómeno conocido como taquicardia o efecto cronotrope positivo; y si lo hace el componente parasimpático disminuye la

frecuencia, denominándose en este caso bradicardia o efecto cronotrope negativo. Otros factores con influencia sobre la frecuencia cardíaca son la temperatura o la concentración de K^+ extracelular, cuyos incrementos provocan taquicardia y bradicardia respectivamente.

El volumen sistólico es el volumen de sangre expulsado por el ventrículo izquierdo en cada latido y su valor está determinado por la fuerza de contracción o contractilidad del músculo cardíaco. Los factores que afectan a esta contractilidad se denominan factores inotrópicos. El volumen sistólico presenta dos tipos de mecanismos de regulación: la regulación intrínseca del volumen sistólico o Mecanismo de Frank-Starling y la regulación extrínseca. La regulación intrínseca está determinada por la precarga y la poscarga cardíacas. La precarga se corresponde con la tensión pasiva de las fibras cardíacas y que determina su longitud inicial antes de la contracción; es decir, la distensión de las mismas ante el volumen diastólico final. De tal modo que cuanto mayor es el volumen diastólico final, más enérgica será la contracción ventricular para permitir la salida del volumen sistólico total. Este comportamiento explica el equilibrio entre el gasto cardíaco de los ventrículos derecho e izquierdo y se conoce como "ley del corazón" o ley de Frank-Starling. La poscarga, por otro lado, es el acortamiento de las fibras miocárdicas durante la sístole, es decir, la carga que debe desplazar el músculo una vez iniciada la contracción y que está condicionada principalmente por la presión de la aorta. En relación a la regulación extrínseca del volumen sistólico, existen varios factores que pueden modificar la fuerza contráctil del corazón. Uno de ellos es el sistema nervioso autónomo, que regula el inotropismo cardíaco del mismo modo que ocurre con el cronotropismo. Además, las concentraciones extracelulares de los iones K^+ y Ca^{+2} , tienen un efecto inotrópico negativo cuando están aumentadas y disminuidas correspondientemente [137, 145].

Finalmente, indicar que el sistema nervioso autónomo también puede regular la velocidad de conducción del impulso cardíaco, causando así el denominado dromotropismo negativo o positivo en función de si la reduce o la aumenta respectivamente [137].

1.3. Estudio de la cardiotoxicidad

La toxicología cardiovascular es la disciplina que estudia los efectos adversos de fármacos, agentes químicos y agentes xenobióticos en el corazón y el sistema cardiovascular de un organismo vivo. Por otro lado, la cardiotoxicidad, por definición, se refiere a una alteración cualitativa o cuantitativa en el corazón debida a fármacos o sustancias tóxicas. En la actualidad existe un gran registro de sustancias, entre ellas fármacos, productos naturales, químicos industriales y agentes ambientales, que se han asociado con alteraciones funcionales y estructurales del sistema cardiovascular [146-149]. Esto es debido a que, cualquiera que sea la vía, la introducción de un tóxico en el organismo suele suponer su llegada al torrente sanguíneo y por ende su transporte e interacción con el corazón en función tanto de su concentración como del tiempo de exposición [150].

Actualmente, y por la importancia que comporta, numerosas publicaciones especializadas indican las técnicas *in vitro* e *in vivo* recomendadas para el estudio de la cardiotoxicidad [151-153].

1.3.1. Estudio de la cardiotoxicidad *in vitro*

La actividad eléctrica del corazón determina su capacidad de contracción y por tanto de bombear la sangre al resto del cuerpo. Esta actividad eléctrica está determinada por los potenciales de acción generados en los cardiomiocitos (léase página 19 “Electrofisiología cardíaca”). Los canales iónicos transmembrana determinan el equilibrio entre las corrientes iónicas de entrada y de salida de la célula y por tanto controlan la duración de los potenciales de acción. De este modo, una prolongación del potencial de acción es consecuencia de un incremento de las corrientes de entrada o despolarizadoras o de un descenso de las corrientes de salida o repolarizadoras, al igual que una reducción del mismo resulta a la inversa. Por el papel determinante que los canales iónicos tienen en la funcionalidad del corazón, la evaluación de los efectos que una sustancia ejerce en los mismos y por consiguiente en el potencial de acción cardíaco está recomendada en los estudios de cardiotoxicidad *in vitro* [152, 154].

La fijación de membrana (en inglés, Patch Clamp) es una técnica electrofisiológica que permite medir las corrientes eléctricas que se generan por el flujo de iones que tiene lugar a través de los canales iónicos transmembrana de las células. Esta técnica está considerada “estándar de oro” para estudiar el potencial de bloqueo agudo de las sustancias en los canales iónicos. Además en la actualidad, se dispone de sistemas o plataformas que realizan esta técnica de manera automática (Figura 8) permitiendo el estudio de los efectos de las sustancias en los canales de una manera más sencilla, rápida y eficaz [154].



Figura 8. Imagen de una plataforma de Patch Clamp automático.
(Imagen de www.fluxionbio.com)

1.3.1.1. Efectos en el canal cardíaco hERG

De todos los canales que determinan el potencial de acción cardíaco, el denominado como hERG (en inglés, human ether-a-go-go related gen) es el más evaluado [152, 155]. HERG se refiere al gen humano que codifica la proteína del canal $K_v11.1$. Los $K_v11.1$ son los canales de potasio cardíacos dependientes de voltaje responsables de la corriente rápida retardada rectificadora de potasio (I_{Kr}), con un papel esencial en la fase 3 de repolarización del potencial de acción cardíaco (léase página 19 “Electrofisiología cardíaca”) [156]. La disfunción de estos canales causa una reducción de sus corrientes que se traduce en un aumento de la duración de la repolarización (prolongación del

1. Introducción

potencial de acción cardíaco); y que en el electrocardiograma se aprecia como un alargamiento del intervalo QT (Figura 9). Las alteraciones en la repolarización cardíaca determinan cambios electrofisiológicos a nivel celular y tisular que predisponen a la aparición de desórdenes cardíacos; y cuyas consecuencias pueden ir desde la aparición de síncope, al desarrollo de arritmias fatales (Torsades de Pointes) o la muerte repentina [155-157].

El potencial de acción cardíaco está producido por diversas corrientes iónicas (Figura 6), de tal modo que la evaluación del efecto de una sustancia en un sólo canal no es reflejo de la actividad que la misma puede tener a nivel celular o tisular. Por ende, la mayoría de los expertos recomiendan testar más de un canal cardíaco para obtener una información completa de los diferentes efectos que una sustancia puede ejercer en las distintas fases del potencial de acción cardíaco y por consiguiente en las diferentes etapas del ciclo del corazón [151, 152]. No obstante, las peculiaridades estructurales y de activación que hERG reúne, así como las consecuencias a nivel funcional en el corazón que su afectación puede provocar, son las principales razones por las que la evaluación de este canal en los estudios de cardiotoxicidad *in vitro* se considera primordial [155, 158, 159]. De hecho, su valoración está incluida en las guías publicadas por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, en inglés European medicine Agency) que fijan la estrategia a seguir en los estudios *in vitro* para estimar el potencial de una determinada sustancia para alterar la funcionalidad cardíaca [160].

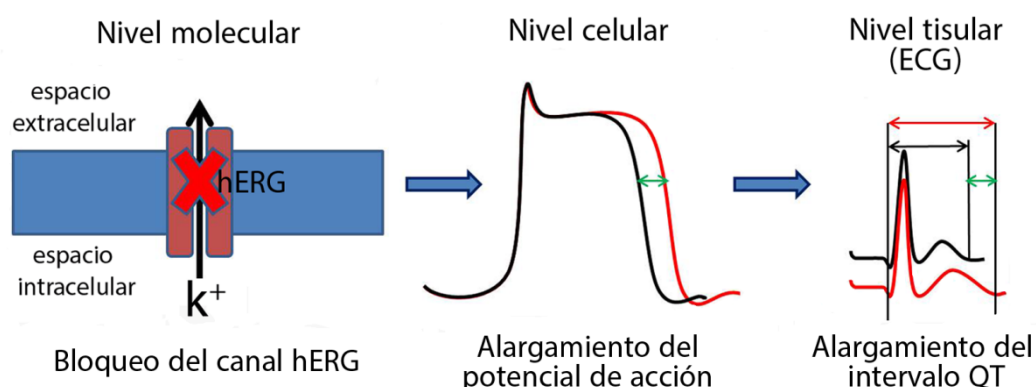


Figura 9. Consecuencias del bloqueo del hERG.

Por otro lado, en los últimos años se ha comprobado que determinados compuestos pueden alterar el canal hERG por mecanismos diferentes al bloqueo agudo. Por ello, la evaluación del tráfico celular del canal hERG se recomienda para determinar los efectos a largo plazo que una sustancia puede ejercer en el mismo [151, 152]. En efecto, en la actualidad existen múltiples evidencias científicas que describen la afectación del canal hERG de manera aguda o crónica e incluso por ambas; además de constatar que los dos tipos de alteración suponen las mismas consecuencias electrofisiológicas en la función cardíaca [161, 162].

Entre los métodos empleados para determinar el tráfico celular de hERG se encuentra el Western Blot. Esta técnica permite evaluar y cuantificar la expresión de las dos formas proteicas que presenta este canal desde su síntesis, como forma parcialmente glicosilada o inmadura (135 kDa), hasta su expresión funcional en la membrana como forma glicosilada o madura (155 kDa) [163]. Por otro lado la combinación de técnicas inmunoquímicas con la citometría de flujo o la microscopia confocal posibilita la visualización de las alteraciones del canal en sus diferentes localizaciones celulares [162].

1.3.2. Evaluación de la cardiotoxicidad *in vivo*

La metodología para determinar la cardiotoxicidad *in vivo* implica el empleo de técnicas que permitan evaluar tanto la función como la estructura del corazón. De este modo, la electrocardiografía y la medición de la presión arterial sanguínea se configuran como los métodos de elección para el estudio de la funcionalidad cardiovascular y los biomarcadores cardíacos y la histopatología como las técnicas elegidas para valorar cambios o daños en la estructura del corazón.

1.3.2.1. Electrocardiografía

La electrocardiografía es la disciplina que estudia la actividad eléctrica del corazón mediante la interpretación del electrocardiograma (ECG). Esta técnica está considerada de primera elección en la valoración de la funcionalidad cardíaca *in vivo* al permitir

1. Introducción

detectar de manera simple, rápida, no invasiva y eficaz los cambios en las propiedades electrofisiológicas del corazón [151, 152, 160].

El electrocardiograma es una representación gráfica inmediata de la actividad eléctrica del corazón en cada latido. Así, en el mismo se dibuja un trazado típico que se repite de forma regular y que de izquierda a derecha se corresponde con las ondas P, Q, R, S y T y los diferentes intervalos y segmentos que ellas conforman (Figura 10). La onda P es la primera deflexión del ECG y representa la contracción atrial. El segmento PR es el periodo de tiempo entre el principio de la onda P y la siguiente deflexión y se corresponde con la contracción y vaciado atrial así como con la desaceleración del impulso cardíaco a nivel del nódulo AV. Las ondas Q, R y S forman el complejo QRS y representan la contracción ventricular. Finalmente, la onda T es una deflexión, normalmente positiva, que representa la relajación cardíaca (Figura 10).

En función de la especie considerada, existen características específicas en el trazado de los ECGs. Como ejemplo, la onda Q no se visualiza en la mayoría de las ocasiones en las ratas, como tampoco presentan trazado isoeléctrico en el segmento ST [164].

Los intervalos entre las diferentes ondas proporcionan información de gran utilidad al reflejar en el caso del intervalo PR el tiempo de conducción del impulso cardíaco desde el nódulo sinusal al nódulo AV y, en el caso del intervalo QT, el tiempo de despolarización y repolarización cardíaca. Por tanto la evaluación del ECG permite detectar cambios en el ritmo normal del corazón y en la conducción del impulso cardíaco (bloqueo o interrupción), como también existen alteraciones cardíacas concretas asociadas a trazados específicos [137, 164].

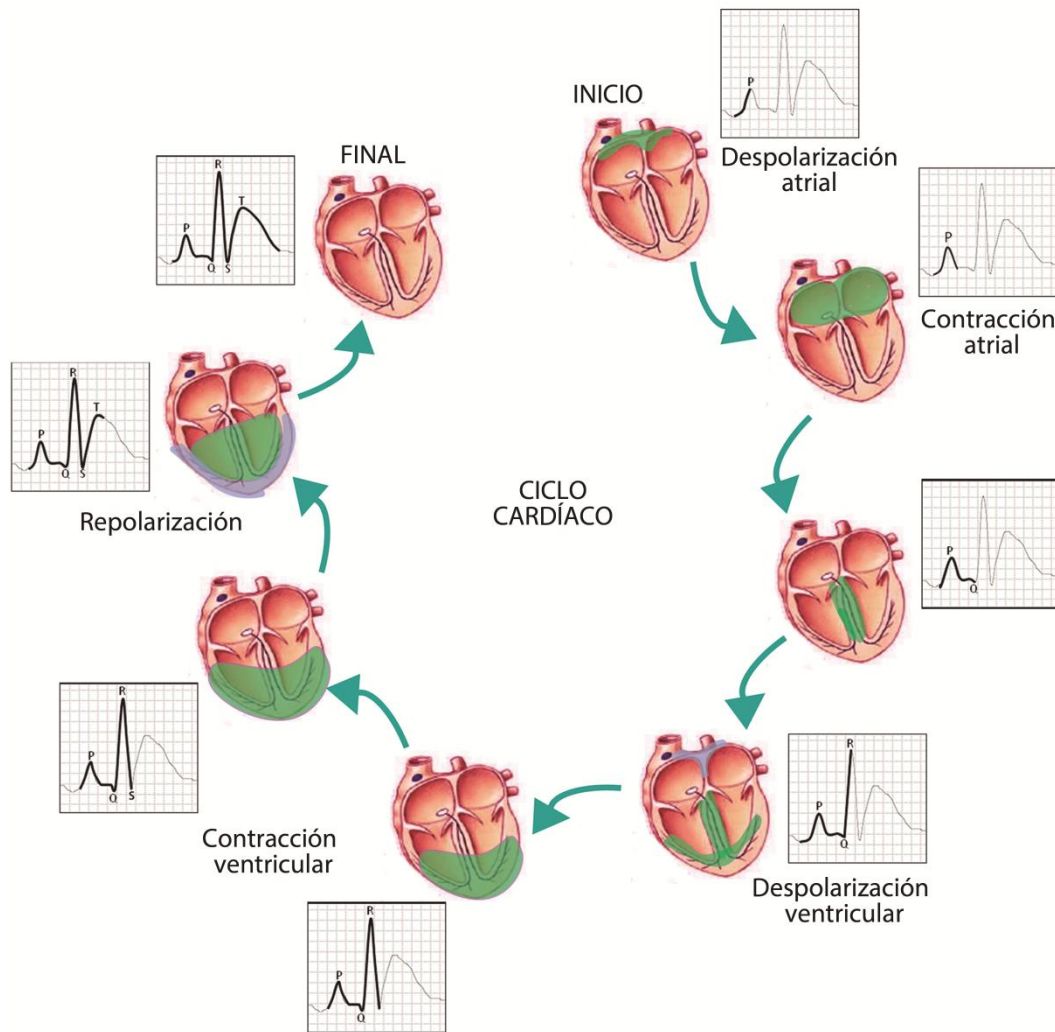


Figura 10. Representación en el ECG del ciclo cardíaco.

1.3.2.2. Medición de la presión arterial

La presión arterial sanguínea (PAS) es el factor principal que determina el flujo de sangre o perfusión a través de los vasos sanguíneos. La medición de la presión arterial se considera método de elección para detectar alteraciones en la hemodinámica del sistema cardiovascular [151, 165]. La presión arterial es la presión lateral ejercida por la sangre sobre las paredes de las arterias y está determinada por factores como la elasticidad de las arterias, el volumen sanguíneo, el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica. La presión arterial presenta dos componentes entendidos como los momentos de tiempo en los que la misma se mide. De tal manera que la medición de la fuerza que ejerce la sangre contra la pared de las arterias en la sístole o contracción cardíaca se denomina presión arterial sistólica, y en la diástole o relajación cardíaca,

1. Introducción

presión arterial diastólica; siendo la presión arterial media el promedio entre ambos valores a lo largo de todo el ciclo cardíaco y la presión del pulso, la diferencia entre ellas.

La medición de la presión arterial en estudios experimentales, y concretamente para el registro en una rata, se realiza de manera habitual por tres métodos: pletismografía con manguito en la cola como técnica no invasiva y cateterización intraarterial o telemetría de radio como métodos invasivos. La técnica invasiva por cateterización intraarterial ofrece valores cuantificables de mayor precisión y por ello está considerada como técnica “estándar de oro” en los estudios experimentales de evaluación de la funcionalidad cardíaca [165].

1.3.2.3. Biomarcadores de cardiotoxicidad

La medición de biomarcadores cardioespecíficos está recomendada en la actualidad como método de elección para la identificación de efectos cardiotóxicos estructurales [153, 166, 167]. Los biomarcadores cardíacos son variables biológicas que ofrecen información sobre procesos patológicos concretos. Aunque bajo esta definición se pueden englobar diferentes tipos de variables, el término biomarcador se emplea generalmente para referirse a determinadas sustancias que muestran aspectos fisiopatológicos de procesos concretos a nivel subcelular o celular de una parte o de la totalidad de un órgano y que se detectan en plasma o suero por métodos diferentes a las habituales bioquímica o hematología.

De este modo, las principales características que un buen biomarcador debe reunir son las siguientes [167, 168]: especificidad de un proceso patológico concreto, sensibilidad, carácter predictivo, estabilidad en plasma o suero y validación y/o estandarización de sus métodos de análisis en las diferentes especies animales. Además, en su cuantificación, determinados parámetros como el tiempo de vida media en sangre, el método de extracción y las características del modelo animal se deben de considerar debido a que pueden variar tanto los niveles basales del biomarcador como la sensibilidad del método analítico.

En función del proceso patológico existen multitud de biomarcadores. En el caso de los biomarcadores de cardiotoxicidad su clasificación atiende a las siguientes categorías [169]:

1. Neurohormonales.
2. Inflamatorios.
3. Marcadores de estrés oxidativo.
4. Marcadores de remodelado de la matriz intersticial.
5. Marcadores de lesión miocitaria.

En la actualidad, las troponinas cardíacas, como marcadores de lesión miocitaria, y los péptidos natriuréticos, como marcadores neurohormonales, se encuentran entre los pocos biomarcadores aceptados para la evaluación de cardiotoxicidad [153, 166]. Asimismo el uso de los marcadores de remodelado de la matriz intersticial está indicado en el estudio de los efectos a largo plazo sobre la estructura cardíaca [170].

Troponinas cardíacas

Las troponinas cardíacas (cTns) son proteínas contráctiles que regulan la interacción actina-miosina durante el fenómeno de la contracción cardíaca (léase página 21, “Mecanismo de contracción cardíaca”). Estas proteínas están consideradas como marcadores “estándar de oro” para la detección de daño miocárdico debido a su elevada especificidad y a su estable y rápida liberación a la circulación sanguínea [153, 166, 171]. Además las concentraciones sanguíneas de las troponinas cardíacas son proporcionales a la severidad del daño causado tanto a nivel celular e histológico como a nivel fisiológico y por tanto clínico. En último lugar, y para el caso de los estudios preclínicos de toxicidad, la efectividad de las troponinas cardíacas para detectar un amplio rango de tóxicos y procesos de diferente etiología está demostrada tanto en humanos como en animales de experimentación. Al mismo tiempo se dispone de una gran variedad de plataformas de ensayo que permiten realizar su medición de manera rápida y precisa [166, 168, 171].

1. Introducción

Péptidos natriuréticos

El corazón libera hormonas de forma fisiológica o patológica ante determinadas situaciones. Los péptidos natriuréticos son hormonas con diferentes propiedades que se liberan a la sangre en situaciones de estrés de la pared atrial o ventricular. Entre los péptidos natriuréticos más utilizados para la detección de alteraciones cardíacas funcionales se encuentran el péptido atrial natriurético (ANP, en inglés atrial-natriuretic peptide), el péptido cerebral natriurético (BNP, en inglés brain-natriuretic peptide) y las respectivas porciones N-terminales de los propéptidos de ANP y BNP (NT-proANP y NT-proBNP). El péptido cerebral natriurético debido a su estabilidad en sangre y elevada sensibilidad, está considerado como biomarcador de elección para la detección de fallos funcionales cardíacos tanto de carácter agudo como crónico [153, 166, 172].

Marcadores de remodelado de la matriz intersticial

El remodelado cardíaco es el conjunto de cambios anatómicos, geométricos, histológicos y moleculares del miocardio que suceden como consecuencia de una sobrecarga o daño miocárdico. De las células que forman el corazón, dos tercios lo constituyen células no musculares, principalmente fibroblastos [173, 174]. Los fibroblastos responden al daño liberando proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias. La función principal de la matriz extracelular es mantener la integridad del tejido miocárdico y así preservar la función de la bomba cardíaca. El balance entre la síntesis y degradación de la matriz mediante el equilibrio entre las metaloproteinasas matriciales (MMP) y los inhibidores de tejido de las metaloproteinasas matriciales (TIMPs) consigue mantener la arquitectura del tejido muscular cardíaco [175]. Aunque el remodelado cardíaco es una respuesta inicial de adaptación al daño, el mismo, mantenido en el tiempo, puede causar alteraciones de la estructura cardíaca que provoquen una descompensación progresiva de la función cardíaca [176]. Por todo lo expuesto, la medición en plasma o suero de los metaloproteinasas matriciales o de sus inhibidores como biomarcadores de remodelación cardíaca está considerada de utilidad en el estudio de efectos estructurales a largo plazo en el corazón [170].

1.3.2.4. Histopatología

La relación estrecha entre estructura y función celular determina que el estudio de los diferentes componentes de la célula nos permita conocer aspectos relacionados con la funcionalidad de los tejidos. En este sentido, la histología es la ciencia que estudia la estructura microscópica de los tejidos que componen el organismo y la histopatología es la rama de la histología que se encarga del estudio de los procesos patológicos que afectan a los mismos. Ambas especialidades se consideran de elección para el estudio de los efectos tóxicos a nivel de la estructura cardíaca [152, 177].

El tejido muscular cardíaco está formado por fibras musculares que a su vez están compuestas por cardiomiocitos. Los cardiomiocitos son células largas y cilíndricas unidas por uniones especializadas denominados discos intercalares. Cada cardiomiocito presenta las estriaciones características del músculo estriado cardíaco (léase página 16, “Estructura cardíaca”) y uno o dos núcleos ubicados en la zona central. Entre las fibras existe un tejido de soporte o endomisio compuesto por fibroblastos, fibras de colágeno y fibras reticulares [139, 140].

Las técnicas comúnmente empleadas en el estudio histopatológico de los tejidos son la microscopía óptica y la microscopía electrónica. La diferencia principal entre ambas técnicas radica en el grado de resolución y aumentos que ofrecen cada una de ellas. A nivel práctico, la resolución de un sistema óptico se puede definir como su capacidad para proporcionar detalles de una muestra. De tal modo que la microscopía óptica permite visualizar detalles del tejido con una resolución de hasta 200 nm de distancia, y la microscopía electrónica de hasta 1 nm. Por consiguiente, la ventaja principal que la electrónica ofrece sobre la técnica convencional es un aumento de resolución de 200 veces, proporcionado por ello imágenes de la subestructura o ultraestructura de la célula. No obstante, el uso de ambas técnicas no es excluyente sino complementario; ya que mientras la microscopía óptica permite observar mayores áreas de una muestra de tejido (en cm^2), la microscopía electrónica proporciona detalles o características en áreas más reducidas de la misma (en mm^2). Además, la microscopía óptica tiene una amplia variedad de técnicas de tinción que hacen posible una fácil identificación y localización de los componentes celulares mientras que los métodos de

1. Introducción

tinción de microscopía electrónica son escasos y ofrecen tan sólo imágenes monocromáticas. En último lugar, la microscopía electrónica es una técnica más costosa en relación al tiempo empleado y de infraestructura necesaria [178, 179].

La hematoxilina-eosina (H&E) es la tinción más usada de forma rutinaria en microscopía óptica. La hematoxilina tiñe las estructuras ácidas de azul púrpura y la eosina marca las estructuras básicas de color rosado. En una célula animal, la mayor parte de las estructuras ácidas residen en el núcleo (ADN nuclear) y por el contrario, la mayoría de estructuras citoplasmáticas son básicas. La intensidad de tinción de esta técnica depende de varios factores, entre ellos el grosor de la muestra y el protocolo de tinción empleado [180].

En microscopía electrónica existen dos tipos de microscopios, el de barrido que produce imágenes en 3D o el de transmisión que las produce en 2D. En la práctica, el microscopio electrónico de transmisión ofrece una mayor información de la ultraestructura biológica de la célula y por ello es el más utilizado [178].

A continuación se muestran dos imágenes de tejido cardíaco que permiten visualizar las diferencias expuestas para la microscopía óptica (Figura 11) y microscopía electrónica (Figura 12). Asimismo algunas de las estructuras o componentes celulares que se pueden visualizar con cada técnica están indicadas.

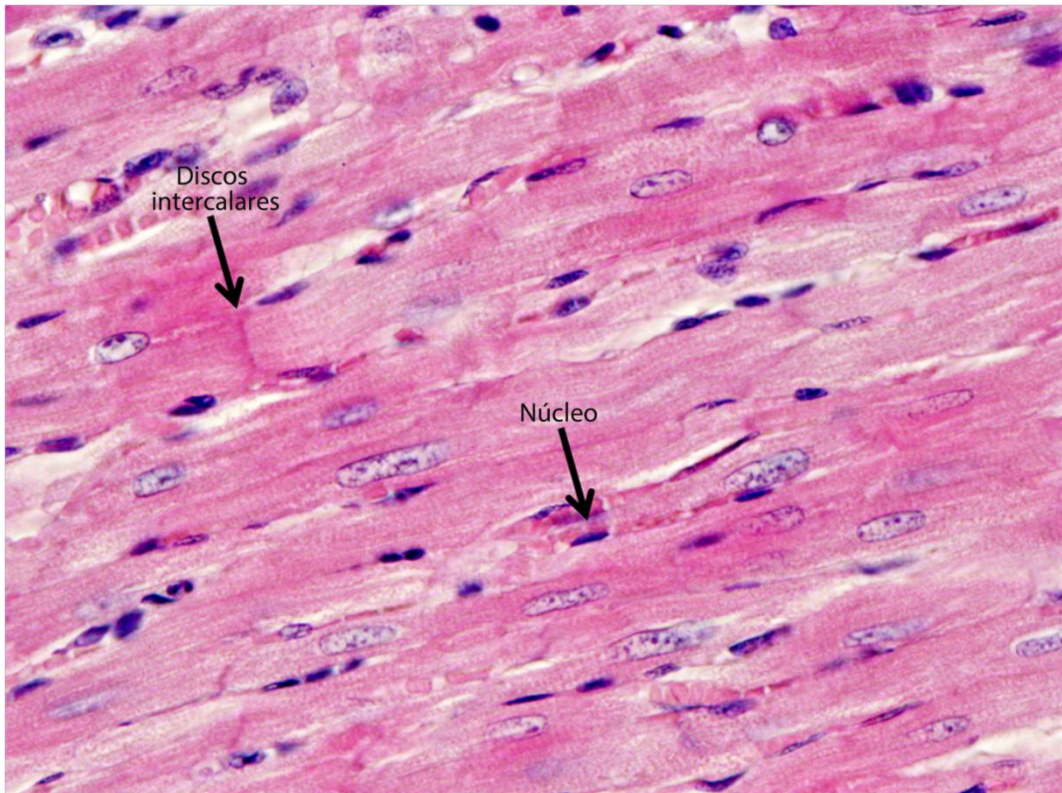


Figura 11. Imagen de tejido cardíaco por microscopía óptica (aumento: 400X).

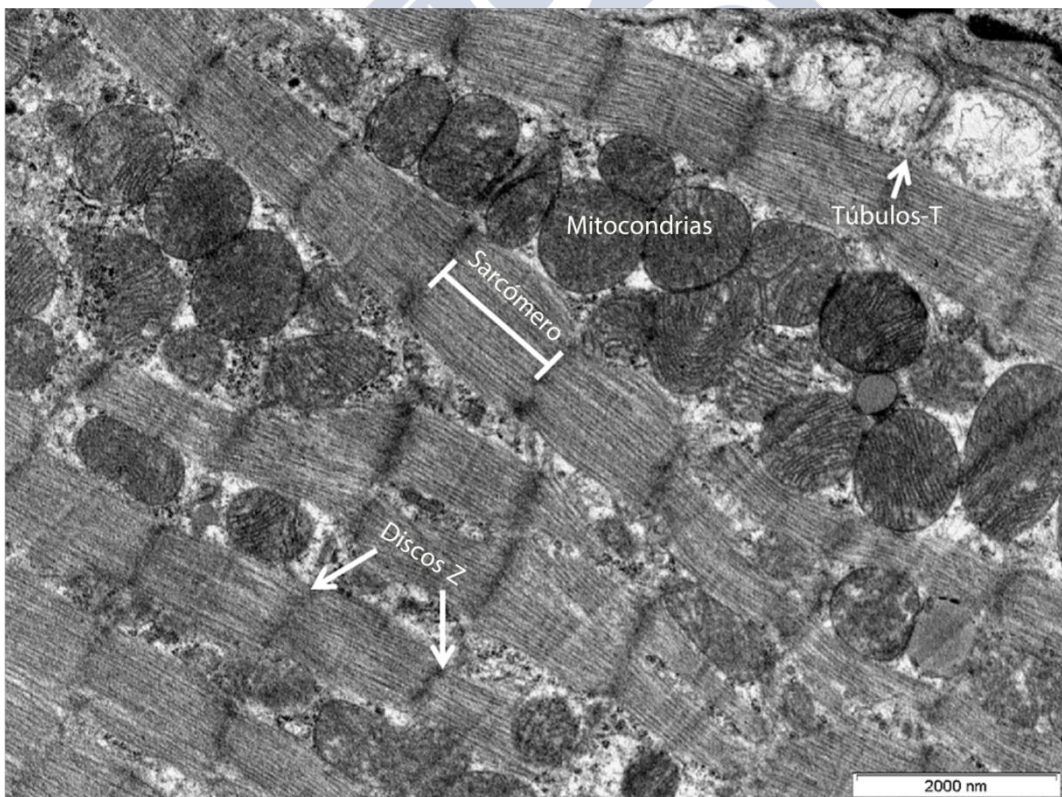


Figura 12. Imagen de tejido cardíaco por microscopía electrónica (aumentos: 2000 nm).

1.4. Toxinas marinas y cardiotoxicidad

Las toxinas marinas constituyen un campo de continua expansión tanto en lo que se refiere a intoxicaciones alimentarias, como a su papel como fuente inestimable de recursos para la industria farmacéutica. En ambos casos el estudio de la cardiotoxicidad de las mismas se considera fundamental. Ello se debe a que hoy en día, las enfermedades cardiovasculares están consideradas como primera causa de muerte en el mundo occidental [181, 182]; lo que atendiendo a la seguridad alimentaria y la salud pública implica que una gran parte de la población se considera en situación de riesgo cardiovascular.

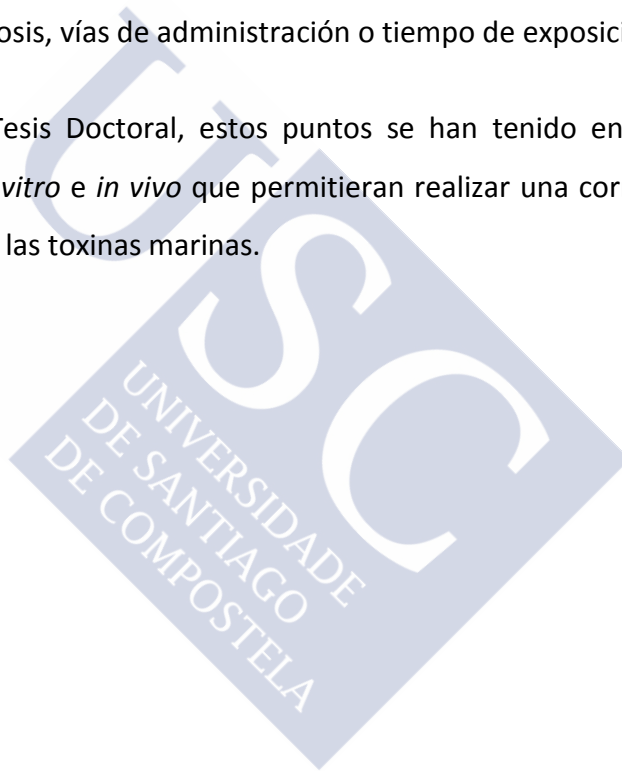
Por un lado, los estudios *in vivo* realizados hasta la fecha han descrito efectos cardiotóxicos para las siguientes biotoxinas marinas: yesotoxinas [45, 55, 56, 79, 81, 83], ácido ocadaico [56], azaspirácidos [135] brevetoxinas [183], palitoxinas [149, 184], y ciguatoxinas [185]. Para las brevetoxinas, palitoxinas y ciguatoxinas, los efectos sobre la función cardíaca están relacionados con la interacción de las mismas con determinados canales o transportadores iónicos de la membrana celular de los cardiomiocitos; y consecuente modificación de las corrientes iónicas que conforman el potencial de acción cardíaco. En el caso del ácido ocadaico y la yesotoxina, para la cuales se han descrito daños ultraestructurales a nivel del tejido cardíaco, como también para los azaspirácidos, que están caracterizados como bloqueantes agudos del canal cardíaco de potasio hERG, no se conocen las implicaciones a nivel de la función cardíaca que estos efectos descritos suponen.

Por otro lado, la investigación farmacológica en el ámbito de las toxinas marinas está suponiendo el descubrimiento de compuestos con propiedades anti-cancerígenas, anti-alzhéimer o inmuno-moduladoras entre otras [90, 186]. El uso de estas futuras herramientas farmacológicas dependerá, entre otros aspectos, de la superación de estudios de seguridad farmacológica propuestos por las autoridades sanitarias de los diferentes países y en recomendación de organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Farmacopea Europea. En el caso de la UE, es la EMA la que marca estas directrices a través de la elaboración tanto de normativa específica como de guías informativas.

Considerando tanto las opiniones de los expertos como las recomendaciones de la EMA, un protocolo apropiado para evaluar la cardiotoxicidad de una determinada sustancia debe de incluir y considerar todos los puntos enumerados a continuación, si bien es cierto que la idiosincrasia de los compuestos determina en cada ocasión la inclusión o no de ellos [151-153, 160].

1. Utilización de modelos y técnicas experimentales *in vitro* e *in vivo*.
2. Administración aguda y repetida de la sustancia a evaluar.
3. Correcto diseño experimental en relación a elección del modelo celular o especie animal, tamaño muestral, uso de controles positivos y negativos y elección de dosis, vías de administración o tiempo de exposición.

En la presente Tesis Doctoral, estos puntos se han tenido en cuenta para la selección de técnicas *in vitro* e *in vivo* que permitieran realizar una correcta evaluación de los efectos tóxicos de las toxinas marinas.





2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido determinar el potencial cardiotoxico *in vitro* e *in vivo* de algunas de las toxinas marinas más comunes en las costas europeas.

De este modo, los objetivos específicos han sido los siguientes:

1. Evaluar el potencial cardiotoxico agudo *in vitro* de toxinas marinas de los grupos DSP, YTX y AZP mediante la determinación de su capacidad de bloqueo del canal hERG a través de la técnica de Patch Clamp automático.
2. Valorar el potencial cardiotoxico *in vitro* a largo plazo de toxinas marinas de los grupos YTX y AZP mediante la evaluación de su capacidad para alterar el tráfico celular del canal hERG con las técnicas Western Blot y citometría de flujo.
3. Estudiar la cardiotoxicidad aguda *in vivo* de toxinas marinas de los grupos DSP, YTX y AZP en ratas mediante el empleo de técnicas funcionales y estructurales.
4. Estudiar la cardiotoxicidad subaguda *in vivo* de toxinas marinas de los grupos YTX y AZP en ratas con técnicas funcionales y estructurales.



3. PUBLICACIONES

3. PUBLICACIONES

Esta sección recoge la metodología empleada en la realización de los experimentos, los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral y las discusiones correspondientes a cada bloque de resultados.

El conjunto de datos se encuentra recogido en siete artículos. Para su presentación se subdividen en un primer bloque correspondiente a la evaluación del potencial cardiotoxico agudo de las toxinas marinas AO y DTX-1, YTX y AZA-2; y un segundo bloque de la evaluación del potencial cardiotoxico subagudo de las toxinas marinas YTX y AZAs.

3.1. BLOQUE I: Evaluación del potencial cardiotoxico agudo de las toxinas marinas AO y DTX-1, YTX y AZA-2.

Artículo 1. Acute cardiotoxicity evaluation of the marine biotoxins OA, DTX-1 and YTX.

Ferreiro SF, Carrera C, Vilariño N, Louzao MC, Santamarina G, Cantalapiedra AG, Botana LM.

Toxins (Basel).2015 Mar 27; 7(4):1030-47. Doi: 10.3390/toxins7041030.

El ácido ocadaico y la yesotoxina son toxinas marinas asociadas con lesiones ultraestructurales en el corazón. En este artículo se explora el potencial que tienen las toxinas ácido ocadaico (AO), dinofisistoxina-1 (DTX-1) y yesotoxina (YTX) para causar una toxicidad aguda en el corazón. Los parámetros utilizados para el evaluar la cardiotoxicidad aguda fueron la capacidad de bloqueo agudo del canal cardíaco hERG (en inglés, human ether-a-go-go related gen) *in vitro* y la evaluación del electrocardiograma (ECG) y los biomarcadores cardíacos *in vivo* tras una administración intravenosa de las toxinas. Los resultados manifiestan que ninguna de estas toxinas bloquea el canal hERG; como tampoco alteran el ECG ni los niveles de los biomarcadores cardíacos en el plasma de las ratas tratadas. La ausencia de alteraciones funcionales cardíacas para estos grupos de toxinas, considerando el daño en corazón a nivel

3. Publicaciones

ultraestructural descrito para ambos, sugiere la actuación de los mecanismos de compensación del corazón a corto plazo.

Artículo 2. *In vivo* arrhythmogenicity of the marine biotoxin azaspiracid-2 in rats.

Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, Louzao MC, Santamarina G, Cantalapiedra AG, Rodríguez LP, Cifuentes JM, Vieira AC, Nicolaou KC, Frederick MO, Botana LM. Arch Toxicol. 2014 Feb; 88(2):425-34. Doi: 10.1007/s00204-013-1115-4.

En este artículo el objetivo del estudio ha sido determinar el potencial cardiotoxico agudo del azaspirácido-2 (AZA-2) *in vivo*. El electrocardiograma (ECG) y los biomarcadores cardíacos han sido los parámetros utilizados para evaluar los efectos cardiotoxicos de la toxina en ratas tras una administración intravenosa. Además se ha verificado el bloqueo agudo de canal cardíaco hERG (en inglés, human ether-a-go-go related gen), previamente descrito para este grupo de toxinas. Los resultados obtenidos muestran que el AZA-2, a pesar de bloquear el canal hERG, no provoca alargamiento del intervalo QT en los ECGs de las ratas tratadas. Sin embargo, el AZA-2 altera la actividad eléctrica del corazón causando prolongación de los intervalos PR y aparición de arritmias. La realización de futuros estudios será necesaria para determinar el mecanismo a través del cual esta toxina provoca estas alteraciones en el ritmo y la conducción cardíacas. Sin embargo, la potencial cardiotoxicidad del AZA-2 evidenciada en este estudio debe tenerse en cuenta cuando se evalúa el riesgo que los azaspirácidos suponen para la salud pública; sobre todo en aquella población con enfermedades cardiovasculares preexistentes.

3.2. BLOQUE II: Evaluación del potencial cardiotoxico subagudo de las toxinas marinas YTX y AZAs.

Artículo 3. *In vitro* chronic effects on hERG channel caused by the marine biotoxin azaspiracid-2.

Ferreiro SF, Vilariño N, Louzao MC, Nicolaou KC, Frederick MO, Botana LM. *Toxicol.* 2014 Dec; 91:69-75. Doi: 10.1016/j.toxicol.2014.09.012.

En este trabajo se han evaluado los efectos de la exposición prolongada de azaspirácido-2 (AZA-2) sobre el canal hERG (en inglés, human ether-a-go-go related gen) *in vitro*. Por ello, tras 12 horas de exposición a la toxina se evaluaron los niveles del canal en la membrana plasmática, su tráfico celular y sus corrientes. Los resultados muestran que el AZA-2 provoca un aumento de los niveles de hERG en la membrana plasmática. La causa de este efecto pudo ser una modificación en los mecanismos de internalización del tráfico celular del canal, ya que se descarta un aumento de la producción del canal al no estar incrementada la forma inmadura. A pesar del incremento de los niveles de hERG en la membrana, no se detectó un aumento de las corrientes del canal. Se necesitan más estudios para determinar qué mecanismo lo provoca y sus consecuencias *in vivo*. No obstante, las evaluaciones del riesgo para la salud pública realizadas para este grupo de toxinas deberían de considerar los efectos aquí descritos; pues sugieren que los azaspirácidos pueden causar cardiotoxicidad crónica relacionada con el tráfico de canal cardíaco hERG.

Artículo 4. Subacute cardiovascular toxicity of the marine phycotoxin azaspiracid-1 in rats.

Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, Louzao MC, Cantalapiedra AG, Santamarina G, Cifuentes JM, Vieira AC, Botana LM. Aceptado para publicación en *Toxicological Sciences*.

En este artículo se estudia la cardiotoxicidad subaguda de los azaspirácidos *in vivo*. El azaspirácido-1 (AZA-1) se administró a ratas por vía intraperitoneal de manera repetida durante un periodo de tiempo de 15 días. Finalizado el tratamiento, se determinó la

3. Publicaciones

cardiotoxicidad mediante la evaluación del electrocardiograma, la presión arterial, los biomarcadores plasmáticos de daño cardíaco y la estructura del miocardio. Los resultados evidenciaron que 4 administraciones de AZA-1, a dosis de 1, 10 y 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$, causan signos funcionales de insuficiencia cardíaca y alteraciones estructurales en el corazón. Concretamente, la administración de esta toxina provocó una disminución de la presión arterial sanguínea, incremento de los niveles plasmáticos de TIMP-1 y aumento de la producción de colágeno y daño ultraestructural en el miocardio. En conjunto estos datos indican que la exposición repetida de dosis bajas de AZA-1 causa cardiotoxicidad sin provocar signos de toxicidad en otros órganos. Además, estas dosis de AZA-1 están muy próximas a la cantidad de AZAs máxima permitida en el marisco destinado al consumo humano. Todos estos hallazgos deberían de ser considerados en las evaluaciones de riesgo para la salud pública realizadas para este grupo de toxinas, considerando principalmente a la población con enfermedad cardiovascular preexistente.

Artículo 5. Subacute cardiotoxicity of yessotoxin: *in vitro* and *in vivo* studies.

Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, Louzao MC, Cantalapiedra AG, Santamarina G, Cifuentes JM, Vieira AC, Botana LM.

Aceptado para publicación en *Chemical Research in Toxicology*.

Este artículo evalúa el potencial cardiotóxico acumulativo de la yesotoxina (YTX) *in vitro* e *in vivo*. La cardiotoxicidad a largo plazo *in vitro* se estudió mediante la determinación del efecto de la YTX en el tráfico celular del canal cardíaco hERG (en inglés, human ether-a-go-go related gen). Los experimentos *in vivo* consistieron en la administración repetida de la toxina a ratas durante 15 días. Finalizado este periodo, se valoró el electrocardiograma, la presión arterial sanguínea, los biomarcadores cardíacos y la estructura miocárdica. Los resultados mostraron que la exposición de YTX a 100 nM durante 12 o 24 horas provoca un aumento de los canales hERG en la superficie extracelular. Por otro lado, las ratas que recibieron 4 administraciones por vía intraperitoneal de YTX a dosis de 50 ó 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cada 4 días durante 15 días, mostraron una bradicardia e hipotensión, un aumento de los niveles plasmáticos TIMP-1 y alteraciones ultraestructurales en el corazón. De tal modo que por primera vez, se

muestran alteraciones en la función cardiovascular asociadas a la cardiotoxicidad subaguda inducida por la administración repetida de la YTX. Atendiendo a los criterios internacionales establecidos para la estimación del riesgo que suponen las toxinas marinas y al reciente incremento del límite máximo permitido para la YTX en el marisco por las autoridades de seguridad alimentaria de diversos países; la cardiotoxicidad subaguda ejercida por la YTX puede suponer un riesgo para la salud pública y, en especial, para aquellas personas que padecen enfermedades cardiovasculares.

Artículo 6. *In vivo* cardiomyocyte response to YTX and AZA-1-induced damage: autophagy vs. apoptosis.

Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, Louzao MC, Santamarina G, Cantalapiedra AG, Cifuentes JM, Vieira AC, Botana LM.
Sometido a Archives of Toxicology.

La yesotoxina (YTX) y el azaspirácido-1 (AZA-1) son moléculas inductoras de muerte celular. La finalidad de este estudio ha sido determinar la presencia de muerte celular en los cardiomiocitos de las ratas expuestas de forma subaguda por vía intraperitoneal a la YTX y al AZA-1 durante 15 días. La autofagia y la apoptosis son los dos tipos de muerte celular más habituales en los cardiomiocitos. Por ello, se determinaron varios marcadores autofágicos y apoptóticos en los tejidos cardíacos de estas ratas empleando la técnica de Western Blot. Los resultados mostraron que los corazones de las ratas tratadas con YTX tienen los niveles de los marcadores autofágicos aumentados, concretamente LC3-II (en inglés, microtubule-associated protein light chain-3) y beclin-1. Sin embargo, los corazones de las ratas expuestas al AZA-1 evidenciaron un aumento de los niveles de los marcadores de apoptosis, específicamente las formas activas de las caspasas 3 y 8, del fragmento de PARP generado por la actividad de las caspasas y del ligando Fas. Por consiguiente, mientras que el daño cardíaco inducido por la YTX desencadena procesos autofágicos, el causado por el AZA-1 activa la apoptosis. Por primera vez, se demuestra en experimentos *in vivo* la activación de las rutas de muerte celular en cardiomiocitos por parte de estas toxinas, además de que ambos mecanismos parecen estar relacionados con las alteraciones descritas de la función cardiovascular.

3. Publicaciones

Artículo 7. Subacute immunotoxicity of the marine phycotoxin yessotoxin in rats.

Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, Louzao MC, Santamarina G, Cantalapiedra AG, Cifuentes JM, Vieira AC, Botana LM.

Sometido a Chemical Research in Toxicology.

El propósito de este estudio ha sido determinar la toxicidad subaguda de la YTX en el sistema inmunitario en las mismas ratas usadas para el estudio de cardiotoxicidad subaguda. De este modo, después de su administración repetida por vía intraperitoneal, se evaluó la respuesta hematológica, las citoquinas inflamatorias y la presencia de daño estructural en bazo y timo. Los resultados evidenciaron que 4 administraciones de YTX durante 15 días causan un descenso en el porcentaje de recuento de linfocitos y un incremento en el caso de los neutrófilos, una reducción de los niveles plasmáticos de la interleuquina-6 y alteraciones estructurales en bazo. Por consiguiente, se describe por primera vez, la inmunotoxicidad subaguda ejercida por la YTX en ratas. El riesgo que este hallazgo supone para la población en situación inmunocomprometida debe de ser considerado por las autoridades de seguridad alimentaria y salud pública.





3.1. BLOQUE I: Evaluación del potencial cardiotoxico agudo de las toxinas marinas AO y DTX-1, YTX y AZA-2.



Artículo 1. Acute cardiotoxicity evaluation of the marine biotoxins OA, DTX-1 and YTX.

Ferreiro SF, Carrera C, Vilariño N, Louzao MC, Santamarina G, Cantalapiedra AG, Botana LM.

Toxins (Basel).2015 Mar 27; 7(4):1030-47. Doi: 10.3390/toxins7041030.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4417953/pdf/toxins-07-01030.pdf>



Artículo 2. *In vivo* arrhythmogenicity of the marine biotoxin azaspiracid-2 in rats.

Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, Louzao MC, Santamarina G, Cantalapiedra AG, Rodríguez LP, Cifuentes JM, Vieira AC, Nicolaou KC, Frederick MO, Botana LM.

Arch Toxicol.2014 Feb; 88(2):425-34. Doi: 10.1007/s00204-013-1115-4.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3946725/pdf/nihms534642.pdf>



3.2. BLOQUE II: Evaluación del potencial cardiotoxico subagudo de las toxinas marinas YTX y AZAs.



Artículo 3. *In vitro* chronic effects on hERG channel caused by the marine biotoxin azaspiracid-2.

Ferreiro SF, Vilariño N, Louzao MC, Nicolaou KC, Frederick MO, Botana LM.

Toxicol. 2014 Dec; 91:69-75. Doi: 10.1016/j.toxicol.2014.09.012.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4252744/pdf/nihms-632982.pdf>



Artículo 4. Subacute cardiovascular toxicity of the marine phycotoxin azaspiracid-1 in rats.

Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, Louzao MC, Cantalapiedra AG, Santamarina G, Cifuentes JM, Vieira AC, Botana LM.

Aceptado para publicación en Toxicological Sciences.



<http://toxsci.oxfordjournals.org/content/151/1/104.full.pdf+html>



Artículo 5. Subacute cardiotoxicity of yessotoxin: *in vitro* and *in vivo* studies.

Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, Louzao MC, Cantalapiedra AG, Santamarina G, Cifuentes JM, Vieira AC, Botana LM.

Aceptado para publicación en Chemical Research in Toxicology.





Artículo 6. *In vivo* cardiomyocyte response to YTX and AZA-1-induced damage: autophagy vs. apoptosis.

Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, Louzao MC, Santamarina G, Cantalapiedra AG, Cifuentes JM, Vieira AC, Botana LM.

Sometido a Archives of Toxicology.

***In vivo* cardiomyocyte response to YTX- and AZA-1-induced damage: autophagy vs. apoptosis**

Sara F. Ferreiro¹, Natalia Vilarino^{1*}, Cristina Carrera^{1, 3}, M. Carmen Louzao¹, Germán Santamarina^{2, 3}, Antonio G. Cantalapiedra^{2, 3}, J. Manuel Cifuentes⁴, Andrés Crespo¹, Luis M. Botana^{1*}

Departamento de Farmacología¹, Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias², Hospital Veterinario Universitario Rof Codina³ and Departamento de Anatomía y Producción Animal⁴, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

*To whom correspondence should be addressed:

Luis M. Botana, Natalia Vilarino

Departamento de Farmacología

Facultad de Veterinaria

Campus Universitario

27002 Lugo

Spain

e-mail: luis.botana@usc.es, natalia.vilarino@usc.es

Telephone and Fax: +34 982822233

Keywords: apoptosis, autophagy, azaspiracid, cardiotoxicity, subacute, yessotoxin

ABSTRACT

Yessotoxins (YTX) and azaspiracids (AZAs) are marine toxins produced by phytoplanktonic dinoflagellates that get accumulated in filter feeding shellfish and finally reach human consumers through the food-web. Both toxin classes are worldwide distributed and food safety authorities have regulated their content in shellfish in many countries. Recently, YTXs and AZAs have been described as compounds with subacute cardiotoxic potential in rats owed to alterations of the cardiovascular function and ultrastructural heart damage. These molecules are also well known *in vitro* inducers of cell death. The aim of this study was to explore the presence of cardiomyocyte death after repeated subacute exposure of rats to AZA-1 and YTX for 15 days. Because autophagy and apoptosis are often found in dying cardiomyocytes, several autophagic and apoptotic markers were determined by western blot in heart tissues of these rats. The results showed that hearts from YTX-treated rats presented increased levels of the autophagic markers microtubule-associated protein light chain 3-II (LC3-II) and beclin-1, nevertheless AZA-1-treated hearts evidenced increased levels of the apoptosis markers cleaved

3. Publicaciones

caspase-3 and -8, cleaved PARP and Fas ligand. Therefore, while YTX-induced damage to the heart triggers autophagic processes, apoptosis activation occurs in the case of AZA-1. For the first time, activation of cell death signals in cardiomyocytes is demonstrated for these toxins with *in vivo* experiments, which may be related to alterations of the cardiovascular function.

INTRODUCTION

Yessotoxins (YTXs) and azaspiracids (AZAs) are marine algal toxins that often accumulate in filter feeding shellfish. YTX, the representative of its class, was first isolated from the scallop *Patinopecten yessoensis* (Murata et al. 1987) and it is produced, as well as other analogs, by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* and *Gonyaulax spinifera* (Paz et al. 2004; Rhodes et al. 2006; Satake et al. 1997). Many food safety authorities have regulated limits for this toxin in shellfish in order to protect human health (European Commission Regulation 2004; Munday et al. 2008); however, the scientific community currently considers that there is no unequivocal evidence of human intoxications due to consumption of YTX contaminated seafood. The need for regulation of this toxin is still a subject of discussion in international forums. On the other hand, AZAs are produced by the dinoflagellate *Azadinium spinosum* (Tillmann et al. 2009) and the first human intoxication, reported in The Netherlands in 1995, was caused by shellfish harvested in Ireland (MCMahon and Silke 1996; Satake et al. 1998). Azaspiracid poisoning (AZP) is an acute gastrointestinal syndrome (James et al. 2004) and at least six human intoxication episodes have occurred since that first report (Furey et al. 2010). AZAs have also a worldwide distribution and food safety authorities of several countries have regulated the presence of AZA-1, AZA-2 and AZA-3 in shellfish to protect human health (European Commission Regulation 2004; Furey et al. 2010).

Recently AZA-1 and YTX have been shown to induce alterations of the cardiovascular function in rats after subacute exposures raising additional concerns about seafood safety. YTX induced marked bradycardia and hypotension (Ferreiro et al. 2016b) while rats treated with AZA-1 displayed signs of heart failure and hypotension (Ferreiro et al. 2016a). In both cases, ultrastructural damage to cardiomyocytes was found. Actually, ultrastructural alterations of cardiac tissue have been described for YTX also in mice in several studies reporting mitochondrial and myofibril damage (Aune et al. 2008; Aune et al. 2002; Ogino et al. 1997; Terao et al. 1990; Tubaro et al. 2008; Tubaro et al. 2004; Tubaro et al. 2003) and in rats an increase of autophagosome numbers in cardiomyocytes was also evident (Ferreiro et al. 2016b) AZA-1-induced alterations of cardiomyocyte ultrastructure also affected mainly mitochondria and myofibrils, but no increase of autophagosomes was observed (Ferreiro et al. 2016a). Among the main modes of cardiomyocyte death are apoptosis and autophagy (Buja and Vela 2008). Autophagy is a cellular degradation process that occurs at low basal levels in the normal heart

and it is necessary for cellular homeostasis and to maintain cardiac function and structure. Nevertheless, cardiovascular stressors can up-regulate autophagic activity and cause cell death through excessive self-digestion and apoptosis induction (Dhesi et al. 2010; Gurusamy and Das 2009; Gustafsson and Gottlieb 2008). Apoptosis is a physiological cell self-destruction process critical for normal development and tissues homeostasis. Autophagy and apoptosis have been related to the pathology of many cardiac diseases (Gustafsson and Gottlieb 2008; Takemura et al. 2013). The presence of abundant autophagosomes in the hearts of rats treated with YTX suggests triggering of autophagic death in these cardiomyocytes. The lack of autophagosomes in AZA-treated rats seems to indicate activation of different damage-response pathways, although actual cell death was not demonstrated.

Multiple *in vitro* studies have demonstrated that YTX and AZA trigger cell death, in addition to alterations of other cell functions such as calcium movement, cyclic nucleotides, E-cadherin pathway, cytoskeleton alterations and protein trafficking (Alfonso et al. 2003; Alfonso et al. 2005; de la Rosa et al. 2001; Ferreiro et al. 2014a; Ferreiro et al. 2014b; Korsnes and Espenes 2011; Korsnes et al. 2007; Ronzitti et al. 2004; Twiner et al. 2012a; Twiner et al. 2012b; Vilariño et al. 2006; Vilariño et al. 2007). Interestingly, YTX has been described as an inducer of different types of cell death depending on the cell model (Korsnes 2012), e.g. autophagy in erythroid and glioma cell lines (Fernandez-Araujo et al. 2015; Rubiolo et al. 2014), or apoptosis in myoblast cell lines (Korsnes et al. 2006). Translocation of an AKAP 149-PKA-PDE4A complex to the membrane or nucleus regulates YTX-triggering of apoptotic or autophagic death in erythroid cells; endoplasmic reticulum (ER)-stress and mTOR signaling being also involved in YTX-induced autophagy (Fernandez-Araujo et al. 2014; Rubiolo et al. 2014). AZA has been reported to cause apoptosis (Twiner et al. 2012b; Vilariño et al. 2008; Vilariño et al. 2007), but no reports of autophagic death are available to our knowledge and its mechanism of action is unknown.

Autophagy activation starts with the formation of the autophagosome. This process is regulated by the autophagy-related (Atg) protein family. Beclin-1 (Atg6) plays an important role in the initial phases by mediating the recruitment of other Atg proteins to the phagophore for its transformation into a phagosome (Gustafsson and Gottlieb 2008). Microtubule-associated protein light chain-3 (LC3)-I, an Atg8 protein, is conjugated to phosphatidylethanolamine to generate LC3-II, which is associated to the autophagosome membrane (Dhesi et al. 2010) and is often used as a molecular marker of autophagy (Wesselborg and Stork 2015). Additionally, autophagy is repressed by the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1). mTORC1 is regulated by several mechanisms, among them it is inactivated through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling and activated through the Akt pathway (Jung et al. 2010). The regulation of apoptosis in cardiomyocytes is not completely understood, but extrinsic and intrinsic pathways have been described in cardiomyocytes, as well

3. Publicaciones

as activation of caspases (Buja and Vela 2008; Lee and Gustafsson 2009). Cleavage of pro-caspase-3 generates activated caspase-3 and it is considered one of the main effectors of apoptosis. Furthermore, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is one of the targets of caspase-3 *in vivo* and augmented levels of PARP cleaved at a caspase-specific site reflect increased caspase activity (Elmore 2007). In addition, the Fas-dependent pathway has been described as one of the mayor triggers of cardiac apoptosis (Bishopric et al. 2001).

The aim of this study was to explore the involvement of autophagy and apoptosis in subacute cardiotoxicity caused by YTX and AZA-1, considering *in vitro* induction of cell death by YTX and AZA-1 and our recent *in vivo* data showing functional alterations and ultrastructural heart damage in rats after subacute exposures to these compounds (Ferreiro et al. 2016a; Ferreiro et al. 2016b). Therefore, the expression of several molecules involved in autophagic or apoptotic cardiomyocyte death pathways was evaluated by western blot in cardiac tissues of YTX and AZA-1-treated animals.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

YTX (purity $\geq 97.9\%$) and AZA-1 (purity $\geq 99\%$), both certified reference material (CRM) quality, were supplied by Laboratorio CIFGA S.A. (Lugo, Spain). Anti-phospho-AMPK α (Thr172; D79.5E) rabbit mAb, anti-AMPK α (F6) mouse mAb, anti-phospho-Akt (Ser473; 587F11) mouse mAb, anti-Akt (pan; 11E7) rabbit mAb, anti-beclin-1 (D40C5) rabbit mAb, anti-caspase-3 (8G10) rabbit mAb, anti-LC3B antibody, anti-phospho mTOR (Ser2448) antibody, anti-mTOR (L27D4) and anti-cleaved-PARP (Asp214) antibody (rat specific) were from Cell Signalling Technology (Beverly, MA). Anti-FAS (A-20) and anti-caspase-8 p18 (H-134) were purchased from SantaCruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). MarkTM pre-stained protein standard, SeeBlue[®] Plus2 pre-stained protein standard, Novex[®] tris glycine gels (10%, 1 mm, 12 well), NuPAGE[®] tris-acetate gels (3-8%, 1 mm, 12 well), NuPAGE[®] tris-acetate SDS buffer kit, NuPAGE[®] transfer buffer (20X), SuperSignal[®]West Femto maximum sensitivity substrate, SuperSignal[®]West Pico chemiluminescent substrate, tissue extraction reagent I and tris-glycine SDS sample buffer 2X were purchased from Thermo Fisher Scientific (Madrid, Spain). Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets and PhosStop phosphatase inhibitor cocktail were from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain). Anti-GADPH antibody produced in rabbit, bovine serum albumin (BSA), β -mercaptoethanol and dimethyl sulfoxide (DMSO) were from Sigma Aldrich S.A. Química (Madrid, Spain). Anti- mouse IgG HRP linked whole Ab (from sheep) was purchased from GE Healthcare (Barcelona, Spain). Immobilon-P[®] PVDF Membrane, monoclonal anti-actin clone C4 and peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG were from Millipore[®] (Billerica, MA). Dried skim milk was from Nestlé S.A. (Vevey,

Switzerland). TBST was 50 mM Tris base, 96 mM NaCl and 0.05% Tween-20. Stripping buffer was 62.7 mM Tris base, 2% SDS and 0.7% β -mercaptoethanol.

Animals and *in vivo* experimental design

The experiments were performed in Sprague Dawley female rats aged 8-16 weeks (180-260 g). The rats were housed in a temperature- and humidity-controlled room (21 ± 2 °C, $50\pm 5\%$ relative humidity) and maintained on a 12h/12h light/dark cycle. They were caged in pairs with free access to food and water. After the first toxin/vehicle administration the rats were caged individually, although they were allowed to see and smell their congeners.

The experiment duration was 15 days. YTX, AZA-1 or vehicle (DMSO) was administered intraperitoneally (i.p.) on days 1, 5, 9, and 13. Doses of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX were injected to 7 rats each and doses of 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AZA-1 were injected to 6 and 4 rats respectively. Each treated rat received the same dose in all injections. For i.p. injection, the solvent of YTX or AZA-1 stock solutions (methanol) was evaporated and toxins were reconstituted with DMSO. Saline solution (Grifols Engineering, Barcelona, Spain) was added subsequently to provide a final concentration of 10 % DMSO (each rat received 50 μL of DMSO per 200 g of body weight) and of 20 or 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ YTX (for the 50 and 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ doses respectively) and 0.4 or 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AZA-1 (for the 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ doses respectively). The final injection volume was 500 μL / 200 g in all rats. 5 vehicle control rats were injected with the same concentration of DMSO in saline solution. On day 15, the rats were anesthetized with isoflurane (FI_{ISO} 1.5-2%) and, after collection of cardiovascular function data (Ferreiro et al. 2016a; Ferreiro et al. 2016b), they were euthanized by exsanguination. Heart samples were collected from each animal and immediately stored at -80 °C until their analysis. All animal procedures were conducted according to the principles approved by the Institutional Animal Care Committee of Universidad de Santiago de Compostela.

Western blot analysis

Frozen heart tissues of YTX-, AZA-1- or vehicle -treated rats were excised and homogenized in tissue lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors (1 mL per 100 mg of heart tissue). These procedures were performed on ice. Lysates were centrifuged at 10.000 rpm and 4 °C, for 15 min and the supernatants were collected for western blot analysis. Protein was quantified using a Direct Detect® spectrometer (Millipore®, Billerica, MA). This subcellular fraction (30 μg of total protein) was separated by electrophoresis in 10% SDS polyacrylamide gels for LC3, phospho/total-AMPK α , phospho/total-Akt, beclin-1, Fas-L, cleaved-PARP, caspase-3 and caspase-8 blots, and in 3-8% NuPAGE® tris-acetate gels for phospho or total-mTOR blots, and then transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked with 5% BSA or 5% dried skim milk in TBST and then incubated with primary antibodies diluted in

3. Publicaciones

blocking solution. Blocking and incubation conditions were optimized for each primary antibody. After 5 washes of 10 min with fresh TBST, the membranes were incubated with the appropriate anti-rabbit or anti-mouse, HRP-labeled secondary antibody (1:5000) for 1h at room temperature and, finally, washed again 5 times in the same manner. All washes and incubations were performed with constant shaking. Detection was done with HRP chemiluminescent West Femto maximum sensitivity or with SuperSignal[®]West Pico chemiluminescent substrate following the manufacturer instructions. The membranes were reblotted for normalization versus actin or GADPH, or versus AMPK α , Akt and mTOR protein levels in case of phosphorylated AMPK α , Akt and mTOR, after stripping for 30 min at 50 °C. Chemiluminescence was detected using a Diversity Imaging System (Syngene, Cambridge, UK) and quantified with Genetools software (Syngene, Cambridge, UK) in non-saturated images.

Electron microscopy

Heart tissue was collected for histological evaluation by TEM immediately after euthanasia. The samples (1 mm³) were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate trihydrate buffer for 4 hours at 4 °C. Then, samples were rinsed with 0.1 M cacodylate trihydrate buffer. Post-fixation by immersion in 1% OsO₄ in 0.1 M cacodylate trihydrate buffer was performed for 60 min at 22°C. Finally, after a second rinse fixed tissues were dehydrated in graded ethanol solutions, including one bath with 70% ethanol and 0.5% uranyl acetate, rinsed in propylene oxide and embedded in Epon 812 (Momentive Specialty Chemicals Inc., Houston, TX). A Leica Ultracut UCT ultramicrotome from Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Germany) was used to obtain ultrathin sections of tissue samples and they were counterstained with uranyl acetate and lead citrate. Ultrastructural analysis of 1 mm² samples was performed with a JEOL JEM-1011 Transmission Electron Microscope (Jeol Ltd, Tokyo, Japan).

Data analysis

Data were plotted as mean \pm SEM. Statistical significance was determined using ANOVA; $p < 0.05$ was considered for significance.

RESULTS

YTX, AZA-1 or vehicle (DMSO) was administered i.p. to rats. The same dose was repeated every 4 days to complete a total of 4 administrations during the experiment, which was ended on day 15 after the first toxin injection. The doses of YTX were 50 and 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (7 rats per dose) and the doses of AZA-1 were 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (6 and 4 rats per dose respectively). Vehicle controls followed the same experimental procedure receiving DMSO in saline (5 rats). Rats showing signs of moderate-severe suffering were euthanized before the end of treatment (one

rat of each YTX-dosing group). The study included only the hearts of rats that received 4 administrations (complete programmed treatment) of 50 or 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX ($n = 6$ in both cases) and 1 or 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AZA-1 ($n = 6$ and 4 respectively). The following results show autophagic and apoptotic markers determined by western blot in the cardiac tissue of these toxin-treated and control animals. In addition, cardiomyocyte ultrastructure was evaluated by TEM for signs of cell death.

YTX and AZA-1 subacute effects on LC3 expression in heart tissue

The LC3-II/LC3-I ratio is often used as a reporter of autophagy activation. To evaluate if autophagy was enhanced in the hearts of rats chronically exposed to YTX or AZA-1, the effects of these toxins on LC3 levels was determined in heart tissue by western blot (Figure 1A). LC3-II levels were significantly elevated in heart tissues from rats treated with 50 and 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX when compared to vehicle controls (Figure 1D). However, LC3-I levels in hearts of YTX-treated rats were not statistically different from controls in the same samples (Figure 1B). Furthermore, the LC3-II/LC3-I ratio was 1.4 and 2 times higher in YTX-exposed hearts for 50 and 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ doses respectively than in controls (Figure 1F). This increase of LC3-II/LC3-I ratio was statistically significant for 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX (Figure 1F). On the contrary, heart tissues from AZA-1-treated rats showed similar levels of LC3-I and LC3-II to controls, as well as similar LC3-II/LC3-I ratios (Figures 1C, 1E and 1G).

YTX and AZA-1 subacute effects on autophagic signaling pathways

The activation of several autophagy-related proteins in the hearts of YTX- and AZA-1-treated rats was studied to support autophagy selective activation and to explore the involvement of signaling routes. Beclin-1 expression levels and phosphorylation of mTOR, AMPK α and Akt were evaluated by western blot (Figure 2A and 2B) as indicators of autophagy-related signaling (Gurusamy and Das 2009; Kemp and Conte 2012). The results showed that beclin-1 expression levels in hearts of YTX-treated rats were significantly increased above controls (1.8 times) for the 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dose (Figure 2C). Furthermore, beclin-1 expression was significantly elevated above controls (2.4 times) in heart tissues from rats treated with 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AZA-1 (Figure 2D), but no statistical significance was found for the 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AZA-1 dose.

Levels of mTOR phosphorylation, evaluated as ratio of p-mTOR /mTOR were not altered in YTX- or AZA-1- treated rats (Figures 2E and 2F). Actually, mTOR expression was also compared in toxin-treated and control rats, and there was no statistically significant difference among different dosing groups and controls (data not shown). Similarly, there was no statistical significance among p-mTOR levels of different toxin-treated groups and controls (data not shown).

3. Publicaciones

Similarly, Akt and AMPK α phosphorylation levels were evaluated as p-Akt/Akt and p-AMPK α /AMPK α ratios. Akt phosphorylation, although not increased in cardiac tissue of YTX treated-rats (Figure 2G), was statistically elevated in hearts exposed to 1 μ g/kg AZA-1 (1.7 times above controls), but not for the 10 μ g/kg AZA-1 treatment (Figure 2H). With regards to AMPK α , p-AMPK α /AMPK α ratios were not modified in YTX- or in AZA-1-treated hearts (Figure 2I and 2J). AMPK α and Akt levels were not affected by toxin treatments (data not shown).

YTX and AZA-1 subacute effects on caspase-3 and PARP cleavage in heart tissue

To investigate whether YTX or AZA-1 subacute exposures triggered apoptosis in cardiac tissue, the levels of pro-caspase-3, cleaved-caspase-3 and cleaved-PARP were evaluated by western blot (Figure 3). The results showed pro- and cleaved-caspase-3 levels unaltered in the hearts of rats exposed to YTX versus controls (Figure 3B and 3D respectively), but a significant increase of pro-caspase-3 was evidenced in the hearts of the 1 μ g/kg AZA1-dosing group (Figure 3C) and of cleaved-caspase-3 in the 10 μ g/kg AZA1-dosing group (Figure 3E). Accordingly, cleaved-PARP was significantly increased in the hearts of rats that received repeated administrations of 10 μ g/kg AZA-1 (Figure 3G) and not altered in YTX-treated rats (Figure 3F). Actually, cleaved-caspase-3 and cleaved-PARP were increased 1.7 and 6.8 times above control levels respectively in rats receiving 10 μ g/kg AZA-1.

YTX or AZA-1 subacute effects on extrinsic apoptosis signaling pathways

Fas ligand (Fas-L) binding to Fas receptor (Fas-R) triggers recruitment of the Fas-associated death domain protein (FADD), which is followed by recruitment and cleavage of pro-caspase-8 to activated caspase-8, which finally activates caspase-3. Therefore, Fas-L and cleaved-caspase-8 protein levels were studied in heart tissue of rats subacutely exposed to YTX or AZA-1 (Figure 4A). The results showed that Fas-L expression levels were significantly increased in cardiac tissue of rats dosed with 70 μ g/kg YTX (2.2 times above controls, Figure 4B) and 10 μ g/kg AZA-1 (1.4 times above controls, Figure 4C). Pro-caspase-8 levels in the hearts of YTX-treated rats were decreased for the 70 μ g/kg dose (Figure 4D); however, in rats treated AZA-1 they were not affected (Figure 4E). Cleaved-caspase-8 levels were not altered in heart tissue of YTX-treated rats (Figure 4F). In rats dosed with 10 μ g/kg AZA-1 a statistically significant increase was observed for cleaved-caspase-8 (1.8 times above controls, Figure 4G).

Cardiomyocyte ultrastructure after YTX or AZA-1 subacute exposure

Cardiomyocyte ultrastructure was analyzed for signs of cell death in rats treated with the higher doses, which displayed activation of autophagic or apoptotic markers. Cardiomyocytes from control rats showed normal arrangement and morphology of myofibrils, the characteristic dark-

light band pattern of the sarcomeres and abundant spherical or elongated mitochondria, well-arranged between myofibrils and with regular cristae (Figure 5A).

Heart tissue samples from rats that received four administrations of 70 µg/kg YTX evidenced disorganization of myofibrils, with fragmentation and loss of the striated pattern (Figure 5B). In addition, mitochondria were irregular in size and shape, and ordered arrangement between myofibrils was lost (Figure 5B). Vacuolation of mitochondria cristae was observed in heavily damaged cardiomyocytes, as well as an increase of autophagosome presence, appearance of lipid-like droplets and rupture of plasma membrane (Figure 5B and 5C).

The cardiomyocytes of rats that received 4 administrations of 10 µg/kg AZA-1 showed also myofibril fragmentation, mitochondria vacuolization, abundant lipid-like droplets and loss of ordered arrangement of myofibrils and mitochondria (Figure 5D, 5E and 5F). In addition cell shrinkage, widening of the intercellular space and rupture of plasma membrane were observed in some areas (Figure 5D and 5E).

DISCUSSION

We have recently described YTX and AZA-1 as subacute cardiotoxic compounds in rats. In this study we describe activation of autophagy and apoptosis markers in heart tissue collected from the same rats that displayed cardiomyocyte ultrastructural damage and cardiovascular function alterations after subacute exposure to YTX and AZA-1, which were reported in previous publications (Ferreiro et al. 2016a; Ferreiro et al. 2016b). Actually, our results evidenced that YTX-induced damage triggered autophagy enhancement while AZA-1 caused mainly an elevation of apoptosis-related signals.

In the myocardium of rats treated with YTX, elevated levels of LC3-II, considered a reliable marker of autophagy (Gurusamy and Das 2009), confirm the increase of autophagic processes in this tissue, which was previously suggested based on electron microscopy observations of a higher number of autophagosomes in the cardiomyocytes of these rats (Ferreiro et al. 2016b). The increased levels of beclin-1, an Atg protein involved in autophagosome nucleation (Gurusamy and Das 2009), yielded more evidence on autophagy activation. For the 70 µg/kg dosing-group the results strongly support augmented autophagy, with significant elevation of LC3-II, beclin-1 and autophagosomes. For a slightly lower dose, 50 µg/kg, there seems to be also a slight increase of markers, but the signs were not consistently significant. The bradycardia and hypotension that was evidenced *in vivo* in rats of the higher dosing-group (Ferreiro et al. 2016b), suggest contractile dysfunction that could be probably related to increased autodigestion or to YTX inflicted damage previous to autophagy. The fact that bradycardia, hypotension, ultrastructural cardiomyocyte alterations and ongoing cardiac remodeling were also described in the lower-dosing group (Ferreiro et al. 2016b), indicates that

function alterations are not exclusively dependent on autophagy. The AMPK α -mTOR and the Akt-mTOR pathways, often implicated in autophagic signaling (Gurusamy and Das 2009), did not seem involved in YTX-induced autophagy in cardiomyocytes. However, it is also possible that the participation of these signals was missed due to kinetic issues, because all tissue samples were collected at one time point for the two YTX-dosing protocols, which was on day 15 after the experiment was initiated.

On the other hand, subacute exposure to YTX did not induce significant changes of apoptosis-related markers. The levels of cleaved-caspase-3 and cleaved-caspase-8, the active forms of two caspases that are well-known participants in apoptotic processes, are not altered in heart tissues from YTX-treated rats and, consistently, caspase-specific cleavage of PARP was not detected (Elmore 2007). Overall, the lack of activation of caspases, generally considered classic effectors of apoptosis also in the heart (Buja and Vela 2008), suggests that apoptosis is not involved in the response to YTX-induced damage at these doses. However, an increased presence of Fas-L in heart tissue for the higher YTX-dosing level might indicate triggering of early extrinsic apoptosis signaling. Although Fas-L is a death ligand typically related to the extrinsic apoptotic pathway, it has also been involved in a form of programmed cell death known as autophagy-dependent necroptosis that occurs when autophagy is unable to maintain protein and organelle quality and that has been related to the pathogenesis of cardiovascular diseases (Kolattukudy and Niu 2012). The results suggest a progression from lower to higher degree of cardiomyocyte damage as the YTX dose was increased from 50 to 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the lower dose already causing function impairment without clear autophagy activation and the higher dose possibly surpassing the capability of autophagic mechanisms to cope with cell damage. There are several cellular stressors that might cause autophagy induction, among them endoplasmatic reticulum (ER) stress and mitochondrial dysfunction (Gurusamy and Das 2009). Actually, ER stress has been related to heart disease and increased presence of autophagosomes in cardiomyocytes (Petrovski et al. 2011), and it has been proposed as the mechanism by which YTX induces autophagy *in vitro* (Rubiolo et al. 2014).

With regards to AZA-1 subacute cardiotoxicity our results evidenced an elevated activation of the executioner caspase-3 and the initiator caspase-8 by augmented levels of their cleaved forms in the myocardium of rats repeatedly exposed to 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Higher levels of caspase-cleaved PARP also supported the increase of caspase activity. In addition, the same samples showed an elevated expression of Fas-L. Overall, this evidence suggests activation of apoptosis with a participation of the extrinsic apoptotic route. Triggering of cell death mechanisms in the cardiomyocyte would lead to a cell number reduction that directly contributes to heart failure in the majority of cardiac disease types (Takemura et al. 2013), which would be in agreement with the *in vivo* functional effects observed in these AZA-1-treated rats that developed marked ascitis and hypotension at the end of treatment (Ferreiro et al.

2016a), characteristic signs of cardiovascular imbalance caused by heart failure (Kemp and Conte 2012). However, although the lower AZA-1 dose tested, 1 µg/kg, seemed to induce an increase of caspase-3 activation, PARP cleavage and Fas-L expression, these changes were not statistically significant, suggesting that lower doses trigger lower apoptotic responses, and that our experiment was not statistically powered to detect small differences. In addition, these rats did not develop ascitis and their hypotension state was not so intense as in the higher dosing group (Ferreiro et al. 2016a), indicating milder heart function impairment. Interestingly, the hearts of rats dosed with 1 µg/kg AZA-1 showed significantly increased levels of beclin-1 expression and Akt phosphorylation. Beclin-1 has been considered a point of crosstalk between autophagy and apoptosis. Actually, beclin-1 overexpression reduces apoptosis activation (Nishida and Otsu 2008). Furthermore, Akt activation in cardiomyocytes is also implicated in promoting cell survival and preventing apoptosis (Miyamoto et al. 2009). Augmented beclin-1 expression and Akt phosphorylation in the hearts of rats that received the lower AZA-1 dose may indicate an attempt of the cardiomyocytes to remove damage and avoid apoptosis. For the higher dose, damage probably exceeded the capacity of cardioprotective mechanisms leading to the activation of apoptosis (Kemp and Conte 2012).

In vivo activation of autophagy or apoptosis signaling in YTX and AZA-1- exposed hearts respectively leads to cell death of cardiomyocytes. Several features that have been considered indicative of cardiomyocyte death, such as myofibril disorganization, mitochondria vacuolation, cytoplasmic lipid-like droplets, rupture of plasma membrane and cell shrinkage (Takemura et al. 2013), were observed in electron microscopy images of the hearts of rats exposed to these toxins. Although apoptosis-related morphology was more evident in the hearts of rats that received AZA-1 and autophagosomes in rats exposed to YTX, signs of necrotic death such as vacuolized mitochondria were present in both cases. Actually, necrosis is a degradative process that follows irreversible injury by any of the two former pathways in the heart (Buja and Vela 2008). The separation of different modes of cell death in cardiomyocytes is often not possible; simultaneous presence of several death types has been previously described *in vivo* (Buja and Vela 2008; Herman et al. 2011).

In summary, after *in vivo* subacute exposure of rats to YTX, cardiomyocytes displayed evident signs of autophagic cell death, while subacute exposure to AZA-1 triggered mainly apoptotic processes. At lower doses milder responses and protective signals are present. Preferential activation of different damage-response pathways may be a reflection of differences between both toxins in damage intensity or mechanism. In any case this study confirms that YTX and AZA-1 activate damage-response signaling and death routes in the heart, yielding more evidence on the previously reported cardiotoxic potential of these toxins.

References

- 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, et al. (2005) Azaspiracid-4 inhibits Ca²⁺ entry by stored operated channels in human T lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 69(11):1627-36.
- Aune T, Aasen JAB, Miles CO, Larsen S (2008) Effect of mouse strain and gender on LD50 of yessotoxin. *Toxicol* 52(4):535-540.
- Aune T, Sorby R, Yasumoto T, Ramstad H, Landsverk T (2002) Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicol* 40(1):77-82.
- Bishopric NH, Andreaka P, Slepak T, Webster KA (2001) Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr Opin Pharmacol* 1(2):141-50.
- Buja LM, Vela D (2008) Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc Pathol* 17(6):349-74.
- de la Rosa LA, Alfonso A, Vilarino N, Vieytes MR, Botana LM (2001) Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochem Pharmacol* 61(7):827-33.
- Dhesi P, Tehrani F, Fuess J, Schwarz ER (2010) How does the heart (not) die? The role of autophagy in cardiomyocyte homeostasis and cell death. *Heart Fail Rev* 15(1):15-21.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495-516.
- European Commission Regulation (2004) (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food animal origin. *Off J Eur Commun Annex III, Sect VIII, Chap V, 2. L 226 PP 60-61.*
- Fernandez-Araujo A, Alfonso A, Vieytes M, Botana L (2015) Key role of phosphodiesterase 4A (PDE4A) in autophagy triggered by yessotoxin. *Toxicology* 329:60-72.
- Fernandez-Araujo A, Tobio A, Alfonso A, Botana LM (2014) Role of AKAP 149-PKA-PDE4A complex in cell survival and cell differentiation processes. *Int J Biochem Cell Biol* 53C:89-101.
- Ferreiro SF, Vilarino N, Carrera C, et al. (2016a) Subacute Cardiovascular Toxicity of the Marine Phycotoxin Azaspiracid-1 in Rats. *Toxicol Sci*.
- Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, et al. (2016b) Subacute cardiotoxicity of yessotoxin: *in vitro* and *in vivo* studies. Submitted to *Chem Res Toxicol*.
- Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, et al. (2014a) *In vivo* arrhythmogenicity of the marine biotoxin azaspiracid-2 in rats. *Arch Toxicol* 88(2):425-34.
- Ferreiro SF, Vilariño N, Louzao MC, Nicolaou KC, Frederick MO, Botana LM (2014b) *In vitro* chronic effects on hERG channel caused by the marine biotoxin azaspiracid-2. *Toxicol* 91:69-75.
- Furey A, O'Doherty S, O'Callaghan K, Lehane M, James KJ (2010) Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: toxicological and health considerations. *Toxicol* 56(2):173-90.
- Gurusamy N, Das DK (2009) Autophagy, redox signaling, and ventricular remodeling. *Antioxid Redox Signal* 11(8):1975-88.
- Gustafsson AB, Gottlieb RA (2008) Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 44(4):654-61.
- Herman EH, Knapton A, Rosen E, et al. (2011) A multifaceted evaluation of imatinib-induced cardiotoxicity in the rat. *Toxicol Pathol* 39(7):1091-106.
- James KJ, Fidalgo Saez MJ, Furey A, Lehane M (2004) Azaspiracid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption. *Food Addit Contam* 21(9):879-92.
- Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584(7):1287-95.
- Kemp CD, Conte JV (2012) The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol* 21(5):365-71.

- Kolattukudy PE, Niu J (2012) Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. *Circ Res* 110(1):174-89.
- Korsnes MS (2012) Yessotoxin as a tool to study induction of multiple cell death pathways. *Toxins (Basel)* 4(7):568-79.
- Korsnes MS, Espenes A (2011) Yessotoxin as an apoptotic inducer. *Toxicon* 57(7-8):947-58.
- Korsnes MS, Hetland DL, Espenes A, Aune T (2006) Induction of apoptosis by YTX in myoblast cell lines via mitochondrial signalling transduction pathway. *Toxicol In Vitro* 20(8):1419-26.
- Korsnes MS, Hetland DL, Espenes A, Aune T (2007) Cleavage of tensin during cytoskeleton disruption in YTX-induced apoptosis. *Toxicol In Vitro* 21(1):9-15.
- Lee Y, Gustafsson AB (2009) Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis* 14(4):536-48.
- MCMahon T, Silke J (1996) Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae* 14:2.
- Miyamoto S, Rubio M, Sussman MA (2009) Nuclear and mitochondrial signalling Akts in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 82(2):272-85.
- Munday R, Aune T, Rossini GP (2008) Toxicology of the yessotoxins. In: Botana LM (ed) *Seafood and Freshwater Toxins Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press Boca Ratón, p 329–339.
- Murata M, Shimatani M, Sugitani H, Oshima Y, Yasumoto T (1987) Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48:549–552.
- Nishida K, Otsu K (2008) Cell death in heart failure. *Circ J* 72 Suppl A:A17-21.
- Ogino H, Kumagai M, Yasumoto T (1997) Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat Toxins* 5: 255–259.
- Paz B, Riobó P, Luisa Fernández M, Fraga S, Franco JM (2004) Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon* 44(3):251-258.
- Petrovski G, Das S, Juhasz B, Kertesz A, Tosaki A, Das DK (2011) Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy. *Antioxid Redox Signal* 14(11):2191-200.
- Rhodes L, McNabb P, de Salas M, Briggs L, Beuzenberg V, Gladstone M (2006) Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae* 5(2):148-155.
- Ronzitti G, Callegari F, Malaguti C, Rossini GP (2004) Selective disruption of the E-cadherin-catenin system by an algal toxin. *Br J Cancer* 90(5):1100-7.
- Rubiolo JA, Lopez-Alonso H, Martinez P, et al. (2014) Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3. *Cell Signal* 26(2):419-32.
- Satake M, MacKenzie L, Yasumoto T (1997) Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat Toxins* 5:164–167
- Satake M, Ofuji K, Naoki H, et al. (1998) Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J Am Chem Soc* 120(38):9967-9968.
- Takemura G, Kanoh M, Minatoguchi S, Fujiwara H (2013) Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart--a critical review from definition and classification of cell death. *Int J Cardiol* 167(6):2373-86.
- Terao K, Ito E, Oarada M, Murata M, Yasumoto T (1990) Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning--5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon* 28(9):1095-104.
- Tillmann U, Elbrächter M, Krock B, John U, Cembella A (2009) *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology* 44(1):63-79.

3. Publicaciones

- Tubaro A, Giangaspero A, Ardizzone M, et al. (2008) Ultrastructural damage to heart tissue from repeated oral exposure to yessotoxin resolves in 3 months. *Toxicol* 51(7):1225-35.
- Tubaro A, Sosa S, Altinier G, et al. (2004) Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice. *Toxicol* 43(4):439-45.
- Tubaro A, Sosa S, Carbonatto M, et al. (2003) Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicol* 41(7):783-92.
- Twiner MJ, Doucette GJ, Rasky A, Huang XP, Roth BL, Sanguinetti MC (2012a) Marine algal toxin azaspiracid is an open-state blocker of HERG potassium channels. *Chem Res Toxicol* 25(9):1975-84.
- Twiner MJ, Hanagriff JC, Butler S, Madhkoor AK, Doucette GJ (2012b) Induction of apoptosis pathways in several cell lines following exposure to the marine algal toxin azaspiracid. *Chem Res Toxicol* 25(7):1493-501.
- Vilariño N, Nicolaou KC, Frederick MO, et al. (2008) Azaspiracid substituent at C1 is relevant to in vitro toxicity. *Chem Res Toxicol* 21(9):1823-31.
- Vilariño N, Nicolaou KC, Frederick MO, et al. (2006) Cell growth inhibition and actin cytoskeleton disorganization induced by azaspiracid-1 structure-activity studies. *Chem Res Toxicol* 19(11):1459-66.
- Vilariño N, Nicolaou KC, Frederick MO, Vieytes MR, Botana LM (2007) Irreversible cytoskeletal disarrangement is independent of caspase activation during in vitro azaspiracid toxicity in human neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology* 74(2):327-335.
- Wesselborg S, Stork B (2015) Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci* 72(24):4721-57.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofunded-grants. From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía y Competitividad, AGL2012-40185-CO2-01, AGL2014-58210-R, and Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, GRC2013-016. From CDTI under ISIP Programme, Spain, IDI-20130304 APTAFOOD.

From the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA – Research Executive Agency (FP7/2007-2013) under grant agreement 312184 PHARMASEA.

Legends to the figures

Figure 1. YTX and AZA-1 subacute effects on LC3-I and LC3-II levels in heart tissue. LC3 levels were evaluated by western blot in heart tissue lysates of rats exposed repeatedly (4x) to 50 or 70 µg/kg YTX (n=6) or to 1 or 10 µg/kg AZA-1 (n=6 and 4 respectively). The same experimental protocol was followed for vehicle control rats (n=5). (A) Representative images of LC3 immunoblots. The upper panel shows the 16 and 14 kDa bands corresponding to the LC3-I and LC3-II proteins respectively. The bottom panel shows the actin re-blot. Band intensities were measured and protein levels were plotted for toxin-treated rats and controls: LC3-I expression levels in hearts of rats that were treated with (B) YTX or (C) AZA-1; LC3-II expression levels in hearts of rats that were treated with (D) YTX or (E) AZA-1; LC3-II/LC3-I ratio in hearts of rats that were treated with (F) YTX or (G) AZA-1. Actin band intensity was used for normalization of LC3-I and LC3-II data (mean ± SEM, * statistically different from control).

Figure 2. YTX and AZA-1 subacute effects on autophagic signaling. Beclin-1 and phosphorylation of mTOR, AMPK α , and Akt were evaluated by western blot in heart lysates of rats exposed repeatedly (4x) to 50 or 70 µg/kg YTX (n=6) or to 1 or 10 µg/kg AZA-1 (n=6 and 4 respectively). The same experimental protocol was followed for heart lysates of control rats (n=5). (A) Representative images of beclin-1 immunoblots and actin re-blot in the upper panel, and phospho-mTOR and total-mTOR re-blot in the bottom panel. (B) Representative images of phospho-Akt and total-Akt re-blot in the upper panel and phospho-AMPK α and total-AMPK α re-blot in the bottom panel. Band intensities were measured and protein levels were plotted for toxin-treated rats and controls: beclin-1 levels in hearts of rats that were treated with (C) YTX or (D) AZA-1; p-mTOR/mTOR ratio in hearts of rats that were treated with (E) YTX or (F) AZA-1 compared to control hearts; p-Akt/Akt ratio in hearts of rats that were treated with (G) YTX or (H) AZA-1; p-AMPK α /AMPK α ratio in hearts of rats that were treated with (I) YTX or (J) AZA-1. Actin band intensity was used for normalization of beclin-1 data (mean ± SEM, * statistically different from control).

Figure 3. YTX and AZA-1 subacute effects on caspase-3 and PARP in heart tissue. Pro- and cleaved-caspase-3 and cleaved-PARP levels were evaluated by western blot in heart lysates of rats exposed repeatedly (4x) to 50 or 70 µg/kg YTX (n=6) or to 1 or 10 µg/kg AZA-1 (n=6 and 4 respectively). The same experimental protocol was followed for heart lysates of control rats (n=5). (A) Representative images of caspase-3 immunoblots and actin re-blot in the upper panel and cleaved-PARP and GADPH re-blot in the bottom panel. Band intensities were measured and protein levels were plotted for toxin-treated rats and controls: pro-caspase-3

3. Publicaciones

levels in hearts of rats that were treated with (B) YTX or (C) AZA-1; cleaved-caspase-3 levels in hearts of rats that were treated with (D) YTX or (E) AZA-1; cleaved-PARP levels in hearts of rats that were treated with (F) YTX or (G) AZA-1. Actin or GADPH band intensities were used for normalization of caspase-3 or cleaved-PARP data respectively (mean \pm SEM, * statistically different from control).

Figure 4. YTX or AZA-1 subacute effects on extrinsic apoptosis signaling. Fas-L and pro- and cleaved-caspase-8 levels were evaluated by western blot in heart lysates of rats exposed repeatedly (4x) to 50 or 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX (n = 6) or to 1 or 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AZA-1 (n = 6 and 4 respectively). The same experimental protocol was followed for heart lysates of control rats (n = 5). (A) Representative images of Fas-L immunoblot and GADPH re-blot in the upper panel and caspase-8 immunoblot and actin re-blot in the bottom panel. Band intensities were measured and protein levels were plotted for toxin-treated rats and controls: Fas-L levels in hearts of rats that received (B) YTX or (C) AZA-1; pro-caspase-8 levels in hearts of rats that were treated with (D) YTX or (E) AZA-1; cleaved-caspase-8 levels in hearts of rats that were treated with (F) YTX or (G) AZA-1. GADPH or actin band intensities were used for normalization of Fas-L or caspase-8 data respectively (mean \pm SEM, * statistically different from control).

Figure 5. AZA-1 and YTX effects on heart muscle ultrastructure. (A) Representative electron microscopy image of myocardium of control rats. (B and C) Representative electron microscopy images of myocardium of rats that received 4x 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX. (D, E and F) Representative electron microscopy images of myocardium of rats that received 4x 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AZA-1. (Scale bar: 2000 nm for A, B, C, E and F; 1000 nm for D). Black arrows indicate rupture of plasma membrane. Autophagosomes (A), collagen (c), intercalated disks (id), intercellular space (is), mitochondria (mi), myofibrils (m), lipid-like droplets (L).

Figure 1.

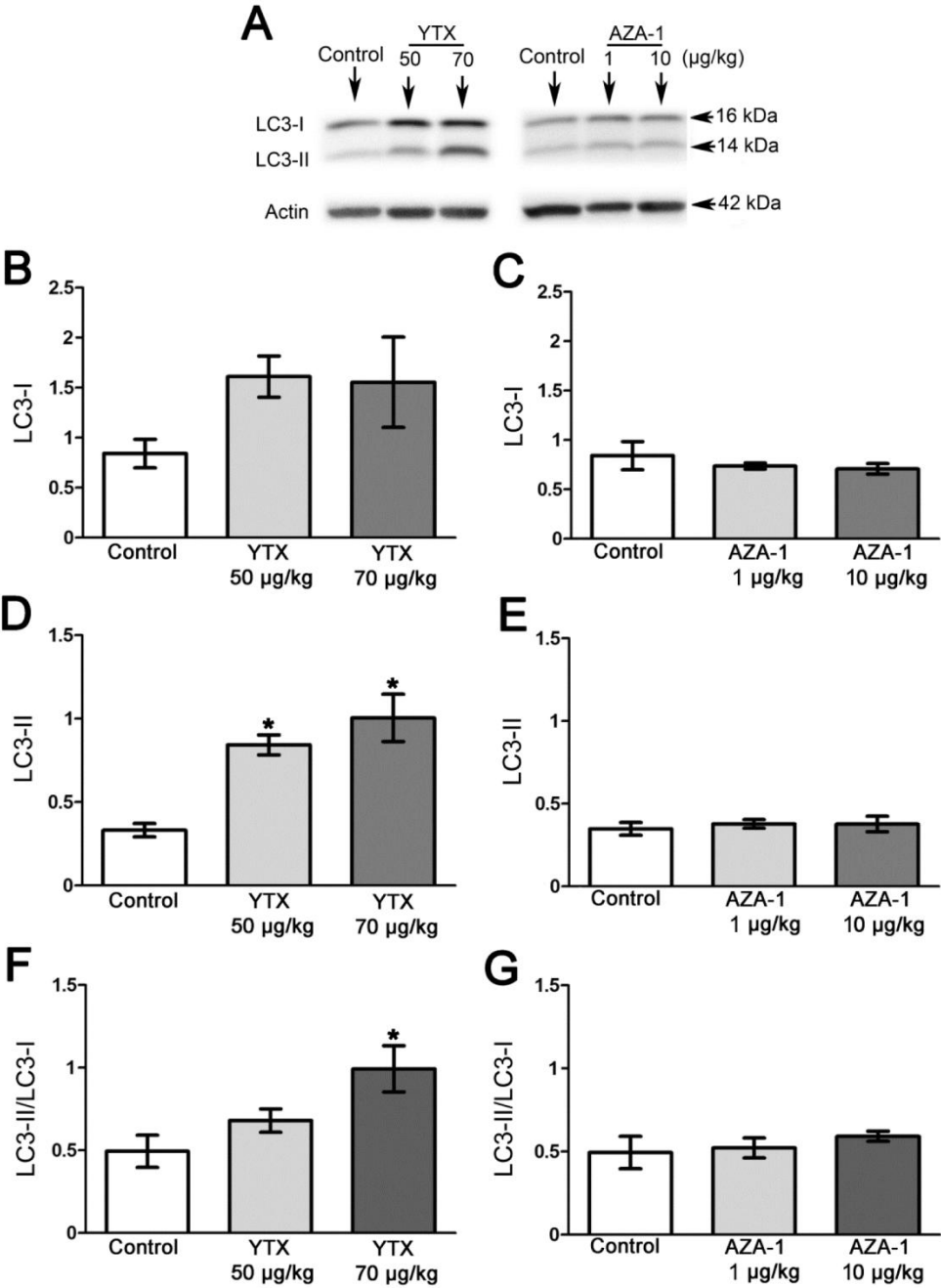


Figure 2.

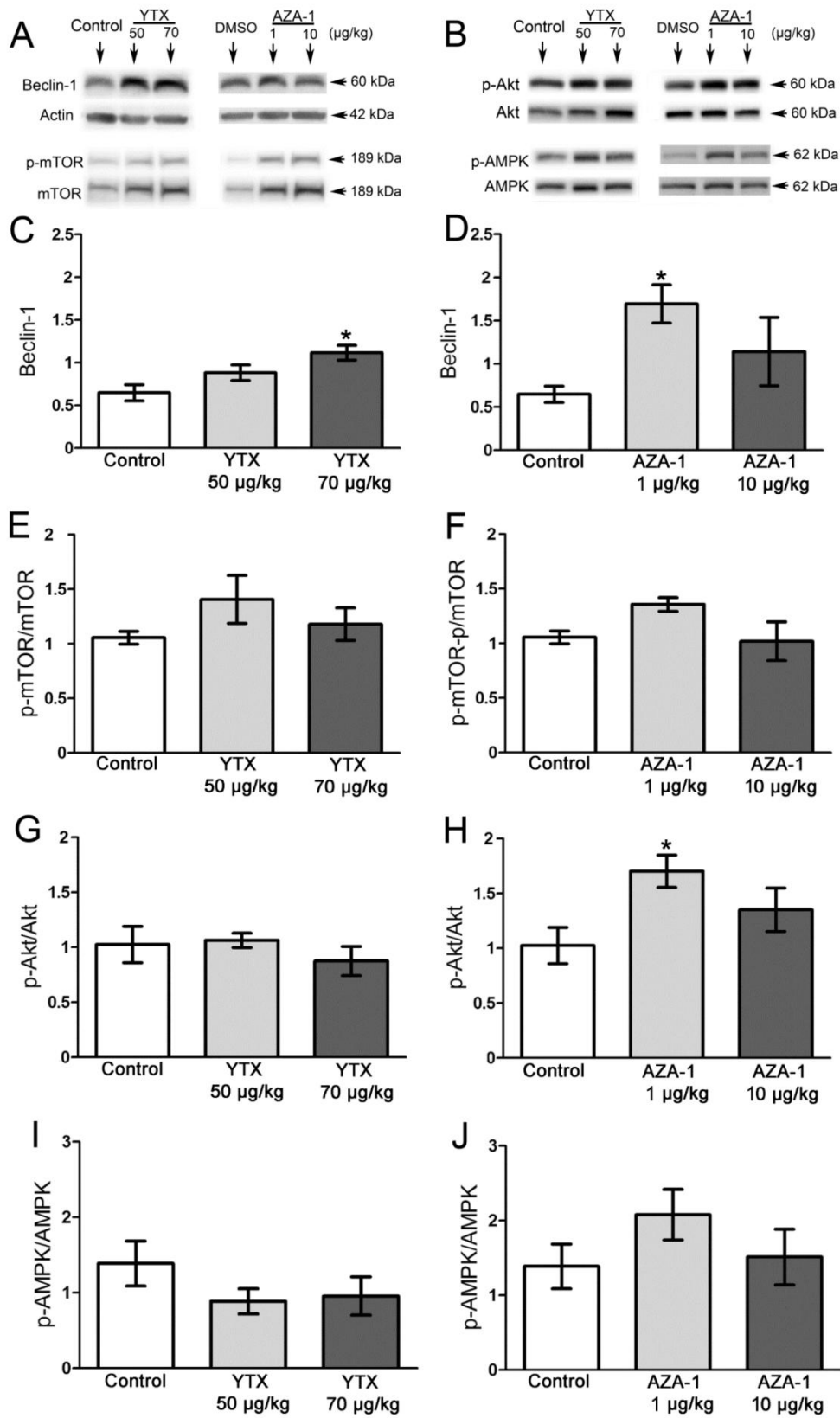
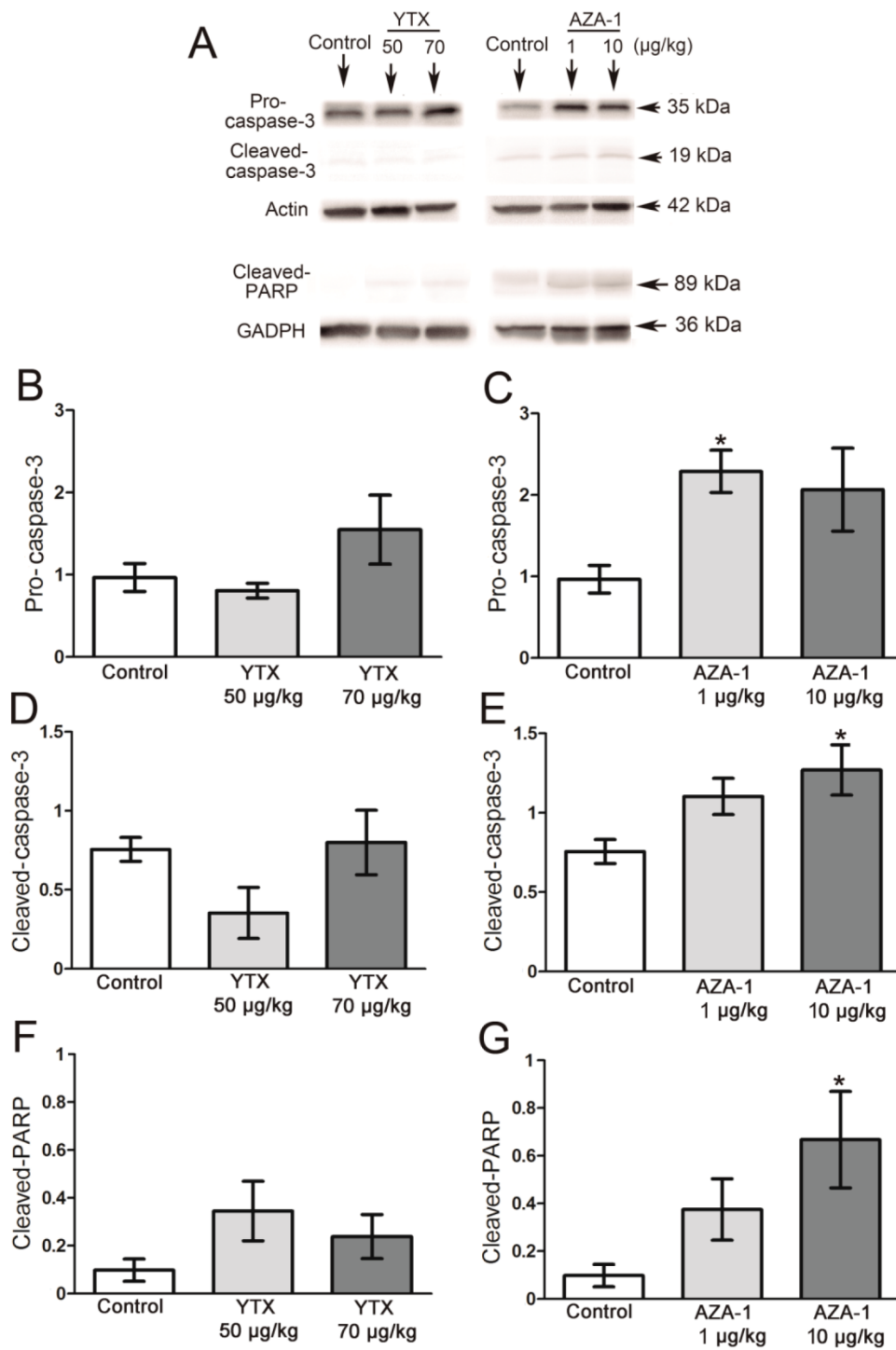


Figure 3.



3. Publicaciones

Figure 4.

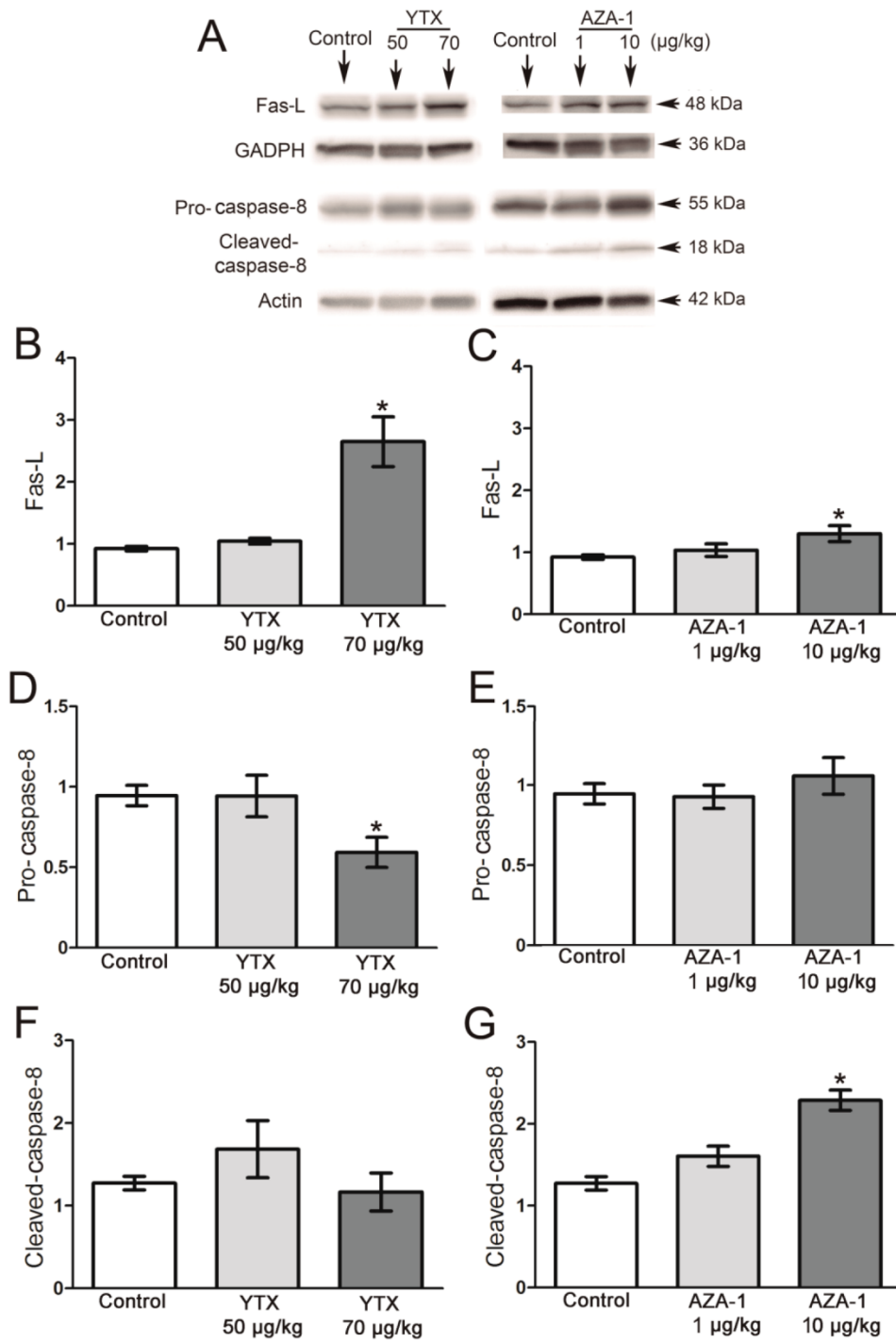
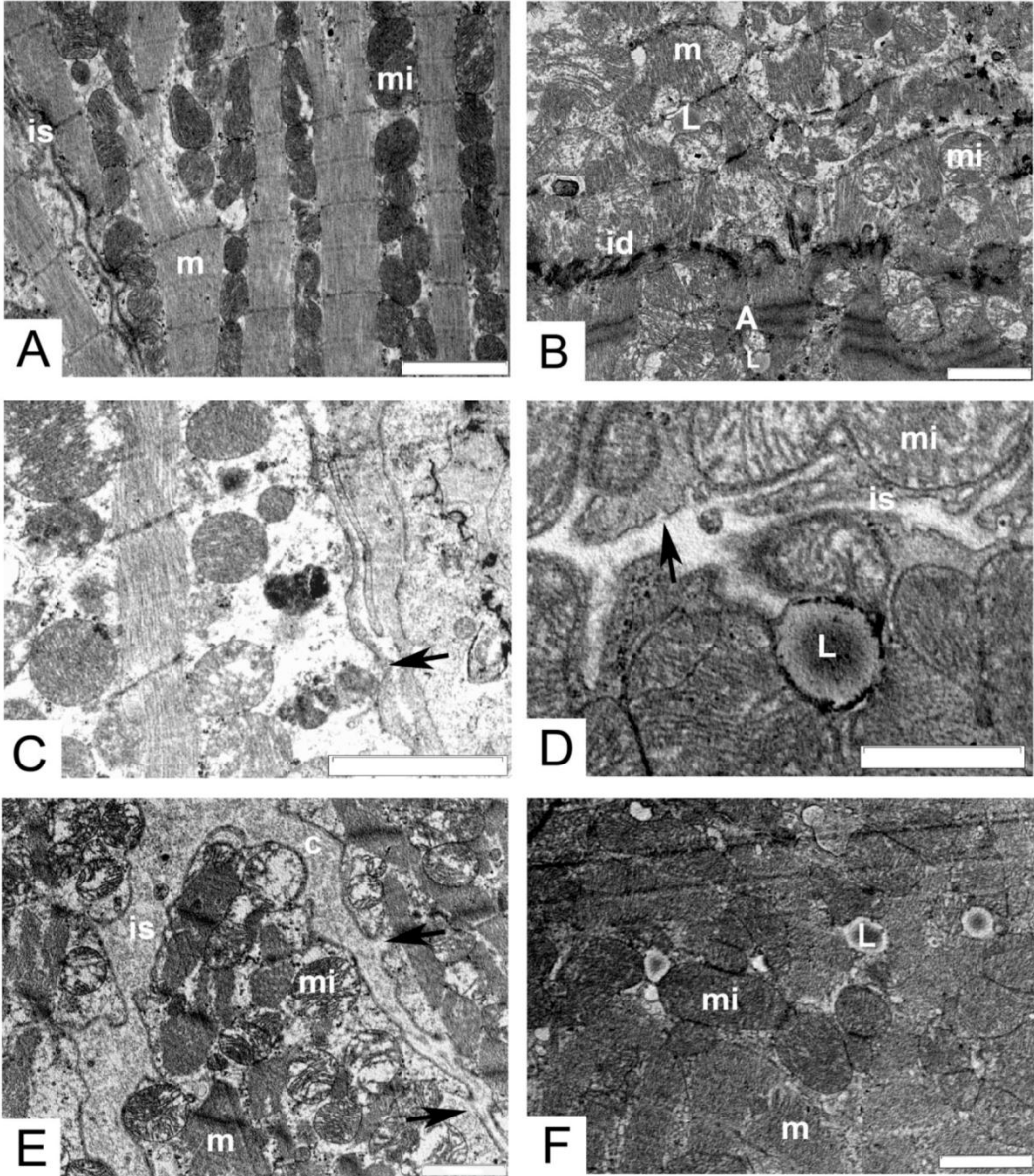


Figure 5.





Artículo 7. Subacute immunotoxicity of the marine phycotoxin yessotoxin in rats.

Ferreiro SF, Vilariño N, Carrera C, Louzao MC, Santamarina G, Cantalapiedra AG,
Cifuentes JM, Vieira AC, Botana LM.

Sometido a Chemical Research in Toxicology.

Subacute immunotoxicity of the marine phycotoxin yessotoxin in rats

Sara F. Ferreiro[‡], Natalia Vilarino^{‡,*}, Cristina Carrera^{‡,‡}, M. Carmen Louzao[‡], Germán Santamarina^{†, ‡}, Antonio G. Cantalapiedra^{†, ‡}, J. Manuel Cifuentes[§], Andrés C. Vieira[‡], Luis M. Botana^{‡,*}

Departamento de Farmacología[‡], Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias[†], Hospital Veterinario Universitario Rof Codina[‡] and Departamento de Anatomía y Producción Animal[§], Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

* To whom correspondence should be addressed:

Luis M. Botana, Natalia Vilarino

Departamento de Farmacología

Facultad de Veterinaria

Campus Universitario

27002 Lugo

Spain

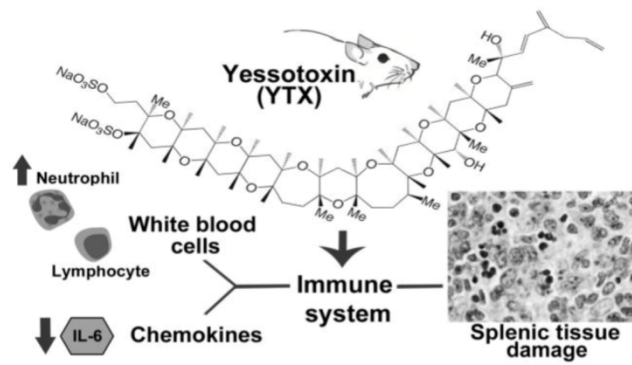
e-mail: luis.botana@usc.es, natalia.vilarino@usc.es

Telephone and Fax: +34 982822233

Keywords: Yessotoxin, subacute toxicity, immune system, leukocytes, cytokines, spleen, apoptosis

3. Publicaciones

TOC



ABSTRACT

Yessotoxin (YTX) is a marine phycotoxin produced by dinoflagellates and accumulated in filter feeding shellfish. YTX content in shellfish is regulated by many food safety authorities to protect human health, although currently no human intoxication episodes have been unequivocally related to YTX presence in food. The immune system has been proposed as one of the target organs of YTX due to alterations of lymphoid tissues and cellular and humoral components. The aim of the present study was to explore subacute immunotoxicity of YTX in rats by evaluating the hematological response, inflammatory cytokine biomarkers and the presence of YTX-induced structural alterations in the spleen and thymus. The results showed that repeated administrations of YTX caused a decrease of lymphocyte percentage and an increase of neutrophil counts, a reduction in interleukine-6 (IL-6) plasmatic levels and histopathological splenic alterations in rats. Therefore, for the first time, subacute YTX-immunotoxicity is reported in rats, suggesting that repeated exposures to low amounts of YTX might also suppose a threat to human health, especially in immuno-compromised populations.

INTRODUCTION

Yessotoxin (YTX) is a marine phycotoxin that was first isolated from the scallop *Patinopecten yessoensis* in 1987.¹ YTX is produced by the phytoplanktonic dinoflagellates *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* and *Gonyaulax spinifera*²⁻⁴ and accumulated in filter feeding mollusks. Presently, no human intoxications have been undoubtedly related to YTXs, however several food safety authorities have limited their levels in shellfish destined to human consumption in order to protect public health.^{3,5,6} *In vivo* toxicological data identified the heart as one of the main target organs of this toxin owed to ultrastructural alterations in mouse cardiomyocytes after acute and short-term exposures to YTX.⁷⁻¹³ Moreover, two cardiotoxicity studies in rats showed no heart dysfunction after a single YTX administration,¹⁴ but marked bradycardia and hypotension associated to ultrastructural cardiac damage after repeated YTX exposures.¹⁵ In addition to the heart, the immune system has also been proposed as a YTX target due to histopathological alterations and apparent changes of cell populations in the thymus after acute exposure of mice to lethal and sublethal doses.¹⁶

In vitro toxicological data have demonstrated that YTX cause cytotoxicity in many cell lines, inducing cell death through different pathways,¹⁷⁻²¹ as well as alterations of several aspects of cell function and cell signaling such as intracellular calcium movements, cyclic nucleotide levels, disruption of cytoskeleton components as F-actin and E-cadherin and triggering of ribotoxic stress.²¹⁻²⁸ Moreover, YTX has been reported to inhibit protein endocytosis and phagocytic activity, to induce the production of inflammatory cytokines or to have immunomodulatory effects through protein kinase C (PKC) activation.^{20,29,30}

European medicines Agency (EMA) guidelines to evaluate immunotoxicity recommend that the initial standard toxicity study should include a hematological analysis to quantify leukocytes, a clinical chemistry analysis to estimate globulin levels and a histopathology evaluation of lymphoid tissues as thymus and spleen.³¹ Furthermore, cytokines, chemokines and growth factors, collectively known as cytokines, have been used as biomarkers to evaluate inflammation or the immune response. Interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) are considered primary inflammatory cytokines and they are commonly detectable in blood

samples.³² Chemokines are also implicated in the control of inflammatory responses through the recruitment of a specific leukocyte population to inflammation sites during organ damage, among other functions. CXCL5/LPS-induced chemokine (LIX) and the keratinocyte chemoattractant/human growth-regulated oncogene (KC-GRO) are chemokines that have been associated to chemotaxis of neutrophils after heart injury.³³

Overall, *in vivo* and *in vitro* toxicological data suggest that YTX exerts toxic effects on the immune system. The aim of this study was to explore subacute immunotoxicity of YTX in rats by evaluating the hematological response, several plasmatic inflammatory cytokine biomarkers and histological structure of YTX-induced structural alterations in the spleen and/or thymus after YTX repeated administrations.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

YTX certified reference material (CRM) was supplied by Laboratorio CIFGA S.A. (Lugo, Spain). Sodium chloride solution 0.9% was from Grifols Engineering, S.A. (Barcelona, Spain). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was from Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO). Milliplex[®] Map KITS were from Millipore[®] (Billerica, MA). Anti-ACTIVE[®] Caspase-3 pAb was purchased from Promega Biotech Ibérica, SL. (Madrid, Spain). Dako REAL[™] Detection System, Peroxidase/DAB⁺, Rabbit/Mouse was from Dako Diagnostics, S.A. (Barcelona, Spain). All chemicals were reagent grade quality.

Animals and *in vivo* experimental design

Female Sprague Dawley rats and housekeeping conditions were as in Ferreiro et al.³⁴ The experiment duration was 15 days. YTX and/or vehicle (DMSO) were administered intraperitoneally (i.p.) on days 1, 5, 9, and 13. Doses of 50, 70 and 100 µg/kg YTX were injected to 8, 7 and 1 rats respectively. Each treated rat received the same dose in all injections. For i.p. injection the solvent of the YTX stock solution (methanol) was evaporated and the toxin

3. Publicaciones

was reconstituted with DMSO. Saline solution (Grifols Engineering, Barcelona, Spain) was added subsequently to provide a final concentration of 10% DMSO (each rat received 50 μ L of DMSO per 200 g of body weight) and 20, 40 or 61 μ g/mL YTX (for the 50, 70 and 100 μ g/kg doses respectively, final injection volume was 500 μ L/ 200 g in all rats). Eight carrier control rats were injected with 10% DMSO in saline solution. On day 15, they were anesthetized with isoflurane (FI_{ISO} 1.5-2%) and, after a cardiovascular function evaluation,¹⁵ one catheter was placed in the jugular vein for blood sample collection. Two blood samples of 400 and 500 μ L were collected in EDTA tubes for the detection of biomarkers and hematological analysis respectively. All animals were euthanized by exsanguination at the end of the experiment, except for those that died during the treatment period or those euthanized prematurely to prevent suffering. All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad de Santiago de Compostela.

Hematological analysis

A blood sample collected at the end of every experiment was immediately analyzed in the IDEXX ProCytex[®] Haematology Analyser for the following parameters: haematocrit (HCT), red blood cells (RBC), reticulocytes and white blood cells (WBC) (neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils). Because this analyzer system was not validated for rats, WBC were also counted in stained blood smears under a microscope (100x magnification) to verify the haematology analyzer results. In each blood smear, 20 microscope fields were randomly chosen and two smears were examined per rat. Lymphocyte and neutrophil percentages were confirmed by optical microscopy. In addition, hematocrit values were similar to those obtained in glass micro-hematocrit capillary tubes.

Inflammatory biomarkers

IL-6, TNF- α , LIX and KC-GRO were measured in one plasma sample collected at the end of each experiment using a commercial assay based on the Luminex XMap[®] technology. Blood samples were centrifuged immediately after collection to separate the plasma fraction and stored

at -80 °C until their analysis. An immunology/immune response rat cytokine/chemokine Milliplex[®] Map KIT was used for quantification of IL-6, TNF- α , LIX and KC-GRO in plasma (100 μ L) following the instructions provided by the manufacturer. All samples were assayed in duplicate.

Spleen and thymus histology

Samples of spleen and thymus were collected immediately after euthanasia from rats that received repeated administrations of 50 (n=5), 70 (n=5) and 100 (n=1) μ g/kg YTX or vehicle alone (n=1). Macroscopic organ examination was done during the extraction process and the samples were then prepared for light microscopy (LM).

For LM, spleen and thymus samples were fixed by immersion in Bouin's solution for 24 hours at 4°C. Tissue samples were embedded in paraffin according to standard laboratory procedures. Paraffin-embedded sections were cut 3- μ m thick, mounted on silanized slides, and dried overnight at 37°C. Then, they were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined under the light microscope for routine histochemical and morphological analyses.

Immunohistochemical detection of activated caspase-3 was performed on deparaffinized tissue sections using a specific antibody. Spleen sections were deparaffinized in xylene followed by hydration in a graded ethanol series of 100, 90 and 70%. To block peroxidase activity and prevent non-specific staining, a pre-treatment with Dako REAL[™] Peroxidase-Blocking Solution was performed for 1 hour at RT. Then tissue sections were rinsed 3 times in PBS (phosphate buffer solution) with 0.005% Tween20[®] (PBS-T) and incubated for 2h at RT with the primary antibody anti-Caspase-3 (1:500). After 3 washes with PBS-T, spleen sections were incubated with a secondary antibody (Dako REAL[™] Link, Biotinylated Secondary Antibody (AB2)) for 30 min at RT. Subsequently, the samples were rinsed 3 times in PBS-T and revealed with diaminobenzidine (DAB+) chromogenic substrat. Finally, the sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated with ethanol and xylene, and permanently mounted in DPX.

3. Publicaciones

Data analysis

Data were plotted as mean \pm SEM. Statistical significance was determined using t test for unpaired data. ANOVA was used for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered for significance.

RESULTS

In vivo immune system toxicity was studied after subacute treatment with YTX, simultaneously to an evaluation of cardiotoxicity.¹⁵ YTX was administered i.p. at doses of 50, 70 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 8, 7 and 1 rats respectively. The experiment lasted 15 days and every 4 days the same dose of toxin was injected to complete 4 administrations. The exact same procedure was performed in 8 control rats in the absence of toxin. Rats showing signs of moderate-severe suffering were euthanized before the end of treatment (one rat of each YTX-dosing group). The study included only the rats that received 4 administrations and completed the programmed treatment of 50 or 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX ($n = 7$ and 6 respectively), with one exception, histopathological analysis of the 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -dosed rat is also presented. The following results were obtained from these experiments.

Effect of yessotoxin on hematology parameters

A hematological analysis was performed in rats that received four administrations of 50 ($n=4$) and 70 ($n=6$) $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX or vehicle alone ($n=4$). The results showed that YTX caused significant alterations in lymphocyte and neutrophil percentages. In fact, YTX induced a marked reduction of lymphocyte percentage from 81.3 % in controls to 54.4 % and 48.1% in rats treated with 50 and 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively (Figure 1A) and a notorious increase of neutrophil percentage from 10.1 % in controls to 32% and 39.7% in 50 and 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX-treated rats respectively (Figure 1B). The percentages of neutrophils and lymphocytes provided by the analyzer were validated using blood smears (Figures 1C and 1D). HCT, monocytes, eosinophils, basophils, and reticulocytes were not altered in YTX-treated rats when compared to controls (Table 1);

however, this analyzer is not validated for rats and only HCT results were verified by manual micro-hematocrit.

Effect of YTX on inflammatory biomarkers

The levels of IL-6, TNF- α , LIX and KC-GRO were evaluated in plasma of rats injected with 50 (n=7) and 70 (n=6) $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX or vehicle alone (n=8). The samples were analyzed with an immunology/immune response (rat cytokine/chemokine) Milliplex[®] Map kit. The results showed statistically significant reductions of IL-6 plasma levels in rats that received YTX (Figure 2A). Actually, IL-6 concentration in plasma was 1.8 and 2.8 times lower than control levels for rats treated with 50 and 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX respectively. TNF- α , LIX and KC-GRO plasma levels were not significantly altered by toxin treatment (Figure 2B, 2C and 2D).

Histological damage of splenic and thymic tissue

After euthanasia, spleen and thymus were examined for macroscopic alterations and collected for histopathological analysis. No rat presented evidence of spleen or thymus damage by macroscopic observation.

Histopathological alterations of spleen and thymus were evaluated by LM. Splenic tissue damage was observed in rats that received YTX (Figure 3). Actually, cellular depletion, apoptosis and neutrophil infiltration were observed in the spleen of rats that received 50, 70 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX (Table 2), when compared to control and normal rat spleen structure. The number of rats displaying these histological alterations increased with the dose, as it did also the intensity of damage. In addition, the presence of apoptosis was evaluated by immunohistochemistry of activated caspase-3 in spleen sections of rats injected with 50 (n=2), 70 (n=1) and 100 (n=1) $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX or vehicle alone (n=1). Immunohistochemistry results indicated increased activated-caspase-3 levels in the spleen of YTX-treated rats versus controls (Figure 4). No alterations, were observed in thymus tissue that could be undoubtedly related to toxin administration in rats that received 50 (n=5), 70 (n=5) and 100 (n=1) $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX, when compared to control and normal rat thymus structure.

DISCUSSION

In the last years few studies have explored toxic effects of YTX on the immune system, despite the fact that some *in vitro* and *in vivo* data suggest its immunotoxicity and immunoregulatory potential.^{16,29,30,35} The present work showed that repeated i.p. administrations of YTX induced blood leukocyte count alterations, with an increase of neutrophils and a decrease of lymphocytes, a reduction of plasma IL-6 levels and spleen histopathology alterations in rats.

The immune system is highly sensitive to several toxics. However, the effects on the immune system observed in toxicity studies may be secondary to other primary toxicological signs, as a consequence of stress triggered by toxicity symptoms instead of being directly caused by the toxin.³⁶ Because the rats exposed to YTX in this evaluation displayed clear signs of toxicity or mild-moderate suffering (accumulation of porphyrin secretions, decreased grooming, reduced appetite) and had alterations of heart function,¹⁵ the effects of YTX on the immune system might be secondary. Actually, alterations of the WBC balance are considered an indicator of stress.³¹ Lymphocyte decrease in favour of neutrophil increase, observed in the rats that received YTX in our study, has been also described in situations of prolonged stress.³⁷ Decreased cellularity and increased apoptosis in the spleen are also considered additional signs of stress.³⁶ Both of these signs were observed in spleens from rats after subacute exposure to YTX by histological analysis and immunohistochemistry for activated-caspase-3, which is considered a sensitive and specific tool to identify apoptosis in lymphoid tissues.³⁸ Furthermore, while acute stress is reported to induce stimulation of the immune system, prolonged stress is usually related to its suppression and dysregulation,³⁶ which would be in agreement with the reduction of IL-6 plasma levels observed in YTX-treated rats. On the other hand, IL-6 concentration increases are associated with heart dysfunction and alteration of the cardiac extracellular matrix, both in acute and chronic pathological processes.³⁹ Therefore, considering the evidenced signs of cardiotoxicity in the rats repeated exposed to YTX, these cytokine levels should have been increased instead of reduced. Consequently, the evidenced IL-6 reduction may have been due to a direct action in the immune system or by a stress-related secondary effect of the toxin.

The ability of YTX to cause apoptosis has been described by several authors in many cellular models¹⁷ and specifically in human and mouse lymphocytes.^{19,22,29} Therefore, YTX-triggered cell death might also be directly responsible for the reduction of circulating lymphocytes and presence of apoptotic cells in the spleen. Furthermore, the inhibition of macrophage phagocytic activity by YTX³⁰ might contribute to increase apoptotic bodies owed to a reduction of clearing in the spleen.⁴⁰ The absence of histological alterations in the thymus was surprising considering previously reported tissue damage for this toxin in mice,¹⁶ but it may indicate differences in species sensitivity. In addition, the protective role of spleen against pathogens and its function as blood filter imply direct exposure to the toxin, which might explain the higher sensitivity of this organ to the toxic insult in our experiments.⁴¹

YTX undoubtedly causes immune system toxicity after repeated exposures, either directly or secondary to toxicity-triggered stress, or both. These findings provide new evidence on subacute effects after repeated exposures to YTX, which might affect the host immune response to other insults. The question is whether yessotoxin is toxic orally. Clearly, oral toxicity is much lower than i.p. toxicity; however absorption of yessotoxin after oral administration has been reported in mice.^{9,12} Current risk assessment is based on toxicological data obtained with mice, since no toxic episodes in humans have been related to YTX.⁴² Moreover, chronic or subacute toxicity studies are scarce, and risk is estimated from acute toxicity data.⁴² The YTX regulatory limit has been recently raised from 1 to 3.75 mg of YTX equivalents/kg in shellfish in many countries⁶ and it is not regulated in others, which will increase human population exposure to this toxin and, based on our results, might suppose a threat for immune compromised individuals.

In summary, for the first time we report blood leukocyte count alterations, plasma IL-6 level reductions and spleen histopathology alterations in rats treated with YTX which indicated immunotoxicity. Future studies should explore possible chronic immunotoxicity and absorption of this toxin after ingestion with food, but these results raise a concern about human health associated to repeated exposures to low amounts of YTX, especially in immunocompromised populations.

3. Publicaciones

Funding sources

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofunded-grants. From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía y Competitividad, AGL2012-40185-CO2-01, AGL2014-58210-R, and Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, GRC2013-016. From CDTI under ISIP Programme, Spain, IDI-20130304 APTAFOOD.

From the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA – Research Executive Agency (FP7/2007-2013) under grant agreement 312184 PHARMASEA.

Abbreviations: certified reference material, CRM; diaminobenzidine, DAB+; dimethyl sulfoxide, DMSO; di-n-butyl phthalate in xylene, DPX; European Medicines Agency, EMA; haematocrit, HCT; hematoxylin and eosin, H&E; interleukina-6, IL-6; keratinocyte chemoattractant/human growth-regulated oncogene, KC-GRO; CXCL5/LPS-induced chemokine, LIX; light microscopy, LM; protein kinase C, PKC; red blood cells, RBC; phosphate buffer solution, PBS; tumor necrosis factor- α , TNF- α ; white blood cells ,WBC; yessotoxin (YTX).

References

- (1) Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y., and Yasumoto, T. (1987) Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 549–552.
- (2) Rhodes, L., McNabb, P., de Salas, M., Briggs, L., Beuzenberg, V., and Gladstone, M. (2006) Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae* 5, 148-155.
- (3) Satake, M., MacKenzie, L., and Yasumoto, T. (1997) Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Toxins* 5, 164–167
- (4) Paz, B., Riobó, P., Luisa Fernández, M., Fraga, S., and Franco, J. M. (2004) Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon* 44, 251-258.
- (5) European Commission. (2004) Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food animal origin. *Off. J. Eur. Commun. Annex III, Sect VIII, Chap V, 2. L 226 PP 60-61.*
- (6) European Commission. (2013) Regulation (EC) No. 786/2013 of 16 August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs. *Off. J. Eur. Commun. L 220 P14.*

- (7) Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M., and Yasumoto, T. (1990) Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning--5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon* 28, 1095-1104.
- (8) Ogino, H., Kumagai, M., and Yasumoto, T. (1997) Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat. Toxins* 5, 255-259.
- (9) Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H., and Landsverk, T. (2002) Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon* 40, 77-82.
- (10) Tubaro, A., Sosa, S., Carbonatto, M., Altinier, G., Vita, F., Melato, M., Satake, M., and Yasumoto, T. (2003) Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. *Toxicon* 41, 783-792.
- (11) Tubaro, A., Sosa, S., Altinier, G., Soranzo, M. R., Satake, M., Della Loggia, R., and Yasumoto, T. (2004) Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice. *Toxicon* 43, 439-445.
- (12) Tubaro, A., Giangaspero, A., Ardizzone, M., Soranzo, M. R., Vita, F., Yasumoto, T., Maucher, J. M., Ramsdell, J. S., and Sosa, S. (2008) Ultrastructural damage to heart tissue from repeated oral exposure to yessotoxin resolves in 3 months. *Toxicon* 51, 1225-1235.
- (13) Aune, T., Aasen, J. A. B., Miles, C. O., and Larsen, S. (2008) Effect of mouse strain and gender on LD50 of yessotoxin. *Toxicon* 52, 535-540.
- (14) Ferreira, S. F., Carrera, C., Vilariño, N., Louzao, M. C., Santamarina, G., Cantalapiedra, A. G., and Botana, L. M. (2015) Acute cardiotoxicity evaluation of the marine biotoxins OA, DTX-1 and YTX. *Toxins* 7, 1030-1047.
- (15) Ferreira, S. F., Vilariño, N., Carrera, C., Louzao, M. C., Santamarina, G., Cantalapiedra, A. G., Cifuentes, J. M., Vieira, A. C., and Botana, L. M. (2016) Subacute cardiotoxicity of yessotoxin: *in vitro* and *in vivo* studies. *Submitted to Chem. Res. Toxicol.*
- (16) Franchini, A., Marchesini, E., Poletti, R., and Ottaviani, E. (2004) Lethal and sub-lethal yessotoxin dose-induced morpho-functional alterations in intraperitoneal injected Swiss CD1 mice. *Toxicon* 44, 83-90.
- (17) Korsnes, M. S., and Espenes, A. (2011) Yessotoxin as an apoptotic inducer. *Toxicon* 57, 947-958.
- (18) Korsnes, M. S. (2012) Yessotoxin as a tool to study induction of multiple cell death pathways. *Toxins* 4, 568-579.
- (19) Lopez, A. M., Rodriguez, J. J., Miron, A. S., Camacho, F. G., and Grima, E. M. (2012) Cytotoxicity of yessotoxin and okadaic acid in mouse T lymphocyte cell line EL-4. *Toxicon* 60, 1049-1056.
- (20) Fernandez-Araujo, A., Alfonso, A., Vieytes, M. R., and Botana, L. M. (2015) Yessotoxin activates cell death pathways independent of Protein Kinase C in K-562 human leukemic cell line. *Toxicol. In Vitro* 29, 1545-1554.
- (21) Rubiolo, J. A., Lopez-Alonso, H., Martinez, P., Millan, A., Cagide, E., Vieytes, M. R., Vega, F. V., and Botana, L. M. (2014) Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3. *Cell Signal.* 26, 419-432.
- (22) Alfonso, A., de la Rosa, L., Vieytes, M. R., Yasumoto, T., and Botana, L. M. (2003) Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 65, 193-208.
- (23) Callegari, F., and Rossini, G. P. (2008) Yessotoxin inhibits the complete degradation of E-cadherin. *Toxicology* 244, 133-144.
- (24) de la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilarino, N., Vieytes, M. R., and Botana, L. M. (2001) Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochem. Pharmacol.* 61, 827-833.
- (25) Ronzitti, G., Callegari, F., Malaguti, C., and Rossini, G. P. (2004) Selective disruption of the E-cadherin-catenin system by an algal toxin. *Br. J. Cancer* 90, 1100-1107.

3. Publicaciones

- (26) Ronzitti, G., and Rossini, G. P. (2008) Yessotoxin induces the accumulation of altered E-cadherin dimers that are not part of adhesive structures in intact cells. *Toxicology* 244, 145-156.
- (27) Korsnes, M. S., Hetland, D. L., Espenes, A., and Aune, T. (2007) Cleavage of tensin during cytoskeleton disruption in YTX-induced apoptosis. *Toxicol. In Vitro* 21, 9-15.
- (28) Korsnes, M. S., Roed, S. S., Tranulis, M. A., Espenes, A., and Christophersen, B. (2014) Yessotoxin triggers ribotoxic stress. *Toxicol. In Vitro* 28, 975-981.
- (29) Lopez, A. M., Rodriguez, J. J., Miron, A. S., Camacho, F. G., and Grima, E. M. (2011) Immunoregulatory potential of marine algal toxins yessotoxin and okadaic acid in mouse T lymphocyte cell line EL-4. *Toxicol. Lett.* 207, 167-172.
- (30) Orsi, C. F., Colombari, B., Callegari, F., Todaro, A. M., Ardizzoni, A., Rossini, G. P., Blasi, E., and Peppoloni, S. (2010) Yessotoxin inhibits phagocytic activity of macrophages. *Toxicon* 55, 265-273.
- (31) EMA. (2006) International Conference on Harmonisation; Guidance on S8 Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals. *Fed. Regist.* 71, 19193-19194.
- (32) Tarrant, J. M. (2010) Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: considerations for their use. *Toxicol. Sci.* 117, 4-16.
- (33) Lukacs, N. W., Hogaboam, C., Campbell, E., and Kunkel, S. L. (1999) Chemokines: function, regulation and alteration of inflammatory responses. *Chem. Immunol.* 72, 102-120.
- (34) Ferreiro, S. F., Vilariño, N., Carrera, C., Louzao, M. C., Santamarina, G., Cantalapiedra, A. G., Rodriguez, L. P., Cifuentes, J. M., Vieira, A. C., Nicolaou, K. C., Frederick, M. O., and Botana, L. M. (2014) In vivo arrhythmogenicity of the marine biotoxin azaspiracid-2 in rats. *Arch. Toxicol.* 88, 425-434.
- (35) Franchini, A., Marchesini, E., Poletti, R., and Ottaviani, E. (2005) Swiss mice CD1 fed on mussels contaminated by okadaic acid and yessotoxins: effects on thymus and spleen. *Eur. J. Histochem.* 49, 179-188.
- (36) Everds, N. E., Snyder, P. W., Bailey, K. L., Bolon, B., Creasy, D. M., Foley, G. L., Rosol, T. J., and Sellers, T. (2013) Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment. *Toxicol. Pathol.* 41, 560-614.
- (37) Dhabhar, F. S. (2008) Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection versus Immunopathology. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 4, 2-11.
- (38) Xiao, K., Zou, W. H., Yang, Z., Zia ur, R., Ansari, A. R., Yuan, H. R., Zhou, Y., Cui, L., Peng, K. M., and Song, H. (2015) The role of visfatin on the regulation of inflammation and apoptosis in the spleen of LPS-treated rats. *Cell Tissue Res.* 359, 605-618.
- (39) Van Kimmenade, R. R., and Januzzi, J. L., Jr. (2012) Emerging biomarkers in heart failure. *Clin. Chem.* 58, 127-138.
- (40) Gregory, C. D., and Devitt, A. (2004) The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology* 113, 1-14.
- (41) Cesta, M. F. (2006) Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol. Pathol.* 34, 455-465.
- (42) EFSA. (2008) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-yessotoxin group. *EFSA J.* 907, 1-62.

Tables

Table 1. Hematological parameters in rats that received four administrations of YTX and control rats (Mean \pm SEM).

Hematological parameters (%)	Control (n=4)	YTX 50 μ g/kg (n=4)	YTX 70 μ g/kg (n=6)	Physiologic range
HCT	42 \pm 0.8	40 \pm 0.8	41 \pm 0.5	30-44
MONO ^a	8 \pm 1.9	11.5 \pm 0.9	10.7 \pm 1.1	0-2
EOS ^a	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0-1
BASO ^a	0.4 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	1.1 \pm 0.4	0-1.2
RETIC ^a	2.8 \pm 0.2	3.9 \pm 0.4	3.6 \pm 0.4	1.5-3.9

^a Parameters not validated using blood smears.

Table 2. Histopathological alterations in rat spleen after subacute administration of YTX or vehicle. Data are expressed as number of rats in which the alteration was observed/total number of rats that received the same dose.

	Cellular depletion	Apoptosis	Neutrophil infiltration
Control	0/1	0/1	0/1
YTX 50 μ g/kg	1/6	4/6	3/6
YTX 70 μ g/kg	3/7	6/7	6/7
YTX 100 μ g/kg	1/1	1/1	1/1

3. Publicaciones

Legends to the figures

Figure 1. Lymphocyte and neutrophil percentages in blood of rats treated with YTX.

Neutrophils and lymphocytes were quantified in blood samples collected from rats that received 4 intraperitoneal administrations of 50 or 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX or carrier alone ($n = 4, 6$ and 4 respectively). Lymphocyte (A) and neutrophil (B) percentage in total white blood cells of rats exposed to YTX. Representative images of blood smears used to verify the leukocyte count in a rat treated with 50 (C) or 70 (D) $\mu\text{g}/\text{kg}$ of YTX. Black arrow indicates neutrophil and white arrow indicates lymphocyte. (mean \pm SEM, * statistically different from control). (For color images see the electronic version of the article: www/...).

Figure 2. Inflammation biomarkers in plasma of rats treated with YTX.

Biomarkers were quantified in plasma samples collected after 4 intraperitoneal administrations of 50 or 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX or vehicle ($n = 7, 6$ and 8 respectively). IL-6 (A), TNF- α (B), LIX (C), and KC-GRO (D) concentrations in plasma of rats exposed to YTX and controls (mean \pm SEM, * statistically different from control).

Figure 3. YTX effects on splenic tissue.

Histopathological damage of spleen evaluated by LM in rats injected with 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX or vehicle alone. (A and C) Representative images of hematoxylin/eosin spleen sections from a control rat. (B and D) Representative images of hematoxylin/eosin spleen sections from YTX-treated rats showing apoptotic cells (white arrow), cellular depletion and neutrophil infiltration (black arrow). Microscope magnifications of 200x (A and B) or 400x (C and D). (For color images see the electronic version of the article: www/...).

Figure 4. YTX apoptotic effects on splenic tissue.

An immunohistochemical assay for activated caspases-3 was performed on deparaffinized tissue sections of spleen of rats injected

with 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YTX (n=1) or vehicle alone (n=1). Representative images of splenic tissue sections immunostained for activated-caspase-3 from control (A and C) or YTX- treated rat (B and D). The apoptotic cells are stained in brown color (arrows). Microscope magnifications of 200x (A and B), or 400x (C and D). (For color images see the electronic version of the article: www/...).

3. Publicaciones

Figure 1.

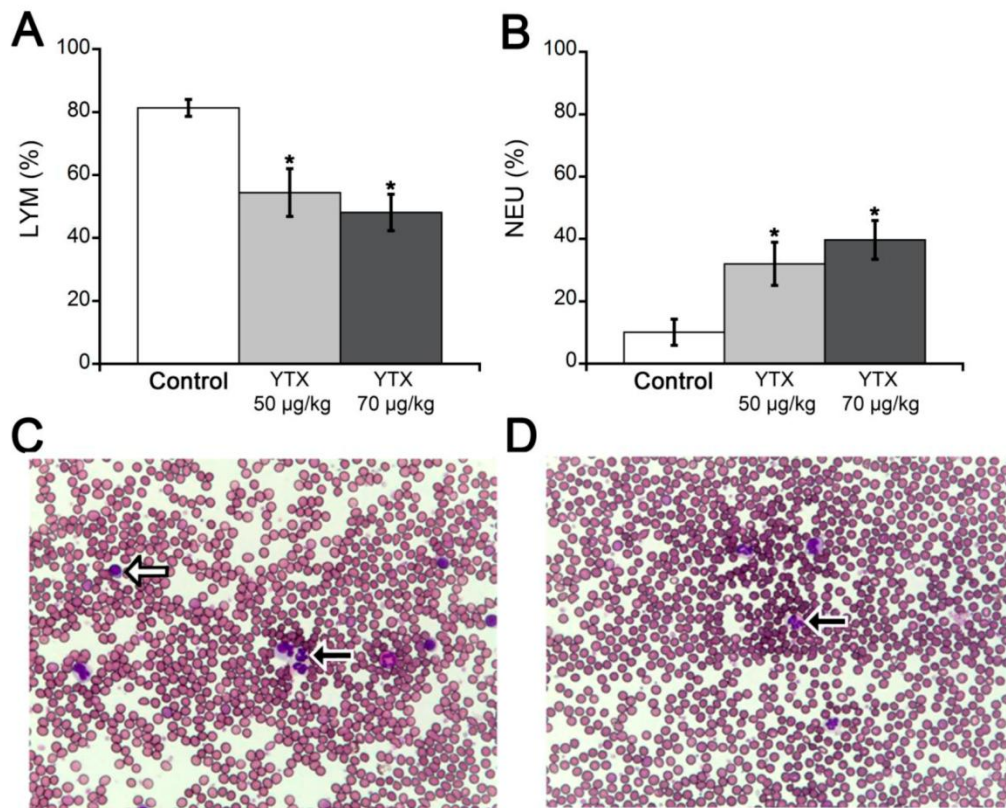


Figure 2

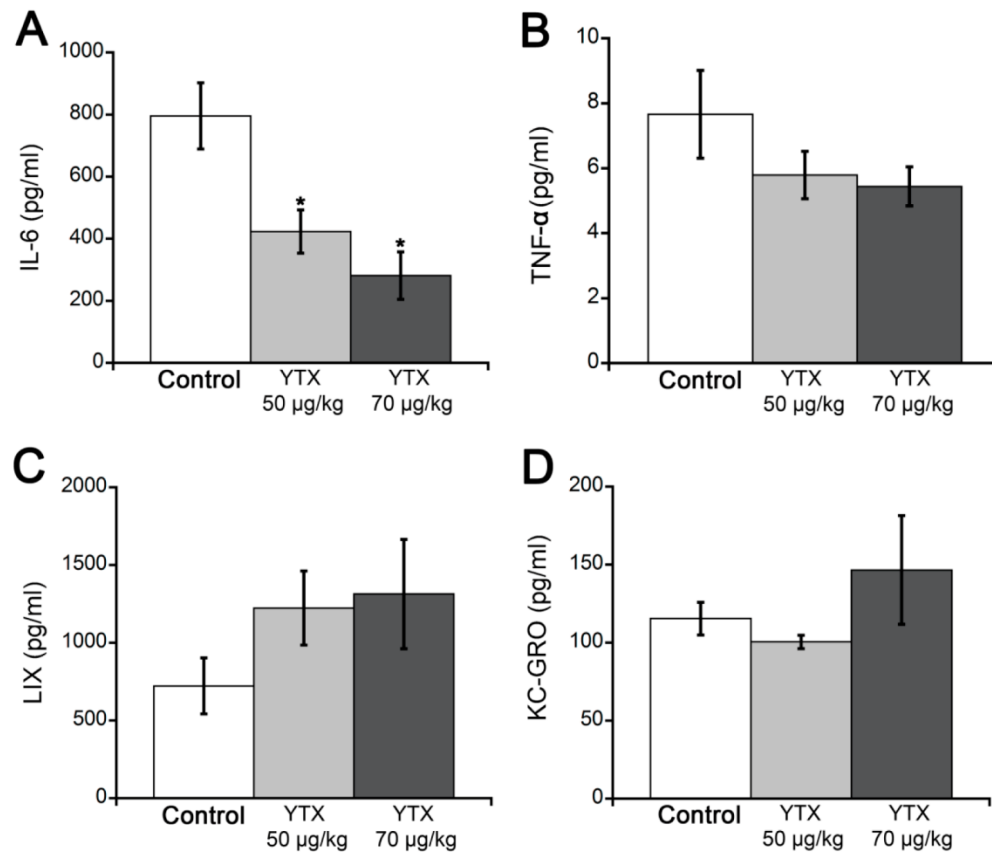


Figure 3.

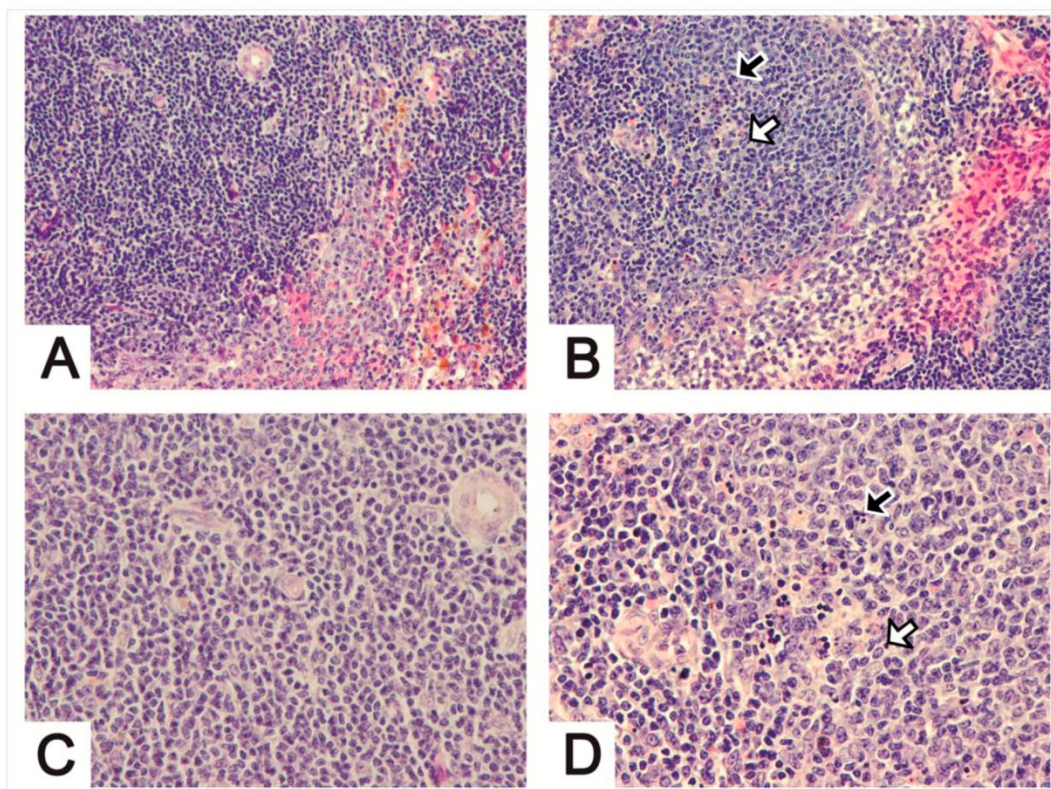
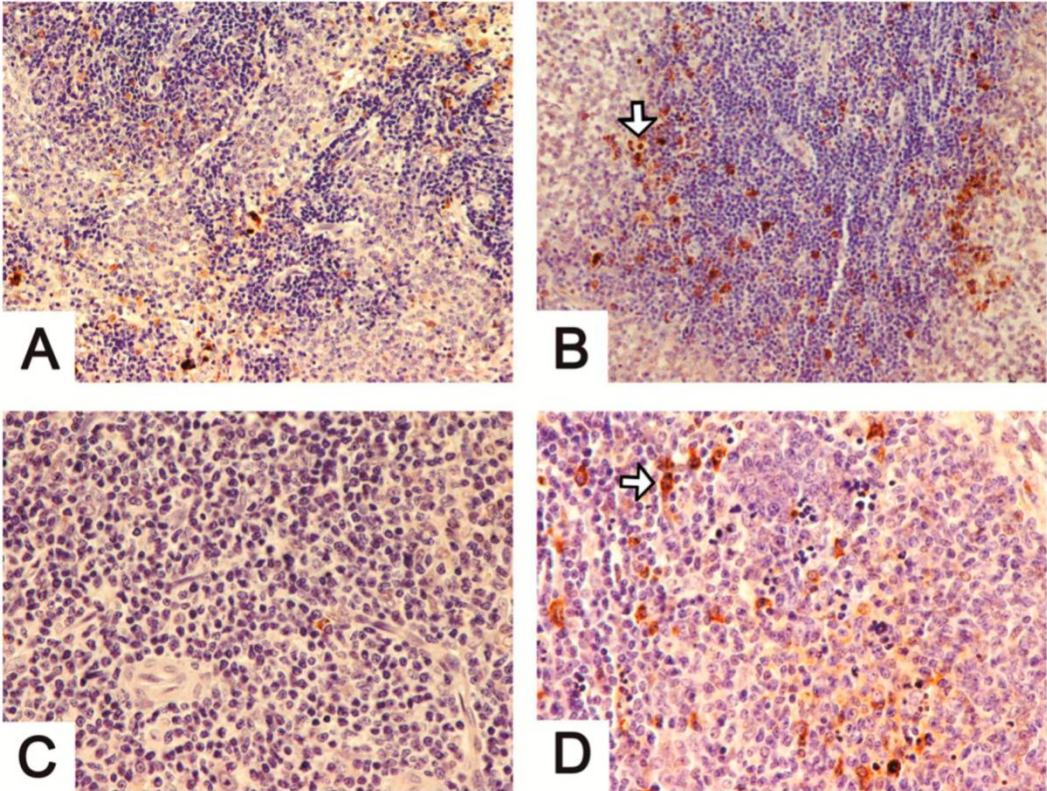


Figure 4.





4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

En los últimos años las floraciones de algas nocivas son un fenómeno mundial de creciente frecuencia, intensidad y duración [8, 9, 12]. Como consecuencia, la investigación en torno a las toxinas marinas que producen se ha convertido en un área prioritaria con importantes desafíos relacionados con el estudio de las intoxicaciones y su impacto sobre la salud [1, 12].

Los efectos de las toxinas marinas a nivel gastrointestinal, en el sistema nervioso o en el sistema cardiovascular, entre otros, depende del tipo de compuesto. Sin embargo, cabe destacar la importancia del sistema cardiovascular, ya que debido al papel vital que ejerce en la función de todos los órganos que componen el organismo, su afectación puede implicar importantes consecuencias.

Para algunas toxinas marinas, concretamente el AO y la YTX, se han descrito efectos ultraestructurales en tejido cardíaco que apuntarían a una posible cardiotoxicidad [45, 55, 56, 79, 81, 83]. Sin embargo, una parte de la comunidad científica pone en duda que estas alteraciones se correlacionen con un trastorno funcional en el corazón, ya que hasta el momento no existían evidencias de que estas toxinas afectasen a la función cardíaca. En la presente Tesis Doctoral se demuestra que mientras una exposición aguda a estas toxinas no provocó alteraciones de la función cardiovascular, una exposición subaguda a YTX, con cuatro dosis repetidas durante un período de 15 días, causó bradicardia e hipotensión como signos funcionales en las ratas tratadas, además de evidentes alteraciones ultraestructurales en los corazones indicativas de muerte celular por activación de la autofagia. Estos efectos *in vivo* de la YTX ponen de manifiesto su toxicidad cardiovascular, hasta hace poco en entredicho, y por tanto sugieren la necesidad de llevar a cabo una revisión de la caracterización del riesgo para la salud del consumidor que suponen los niveles máximos de YTX actualmente regulados [17].

Para el AZA-1, en el transcurso de esta Tesis Doctoral, se publicó su efecto *in vitro* sobre el canal de K⁺ cardíaco hERG, concretamente su bloqueo de carácter agudo [135]. Aunque atendiendo a los criterios de clasificación de potencia de inhibición de este canal, esta toxina se clasificaría dentro de los inhibidores considerados de potencia

4. Discusión

moderada-baja [187]; su posible repercusión *in vivo* sobre la función cardíaca no se había estudiado. Los resultados de nuestra evaluación demuestran por primera vez una actividad cardiotoxica del AZA *in vivo*. De hecho tanto la exposición aguda como subaguda a los AZAs evidenció alteraciones funcionales cardíacas. Además, las dosis subagudas utilizadas en nuestros estudios están muy cercanas a los niveles de exposición de toxina permitidos según los criterios actuales de evaluación de riesgo de la EFSA. Estas dosis produjeron signos de insuficiencia cardíaca, especialmente una marcada ascitis, hipotensión y lesiones en los cardiomiocitos a nivel ultraestructural indicativos de muerte celular por activación de una respuesta apoptótica.

El trabajo presentado comprende estudios *in vitro* e *in vivo*. Aunque las principales evidencias de cardiotoxicidad se obtuvieron con las evaluaciones *in vivo* en ratas, la inclusión de la valoración de la actividad de estas toxinas sobre el canal hERG resulta esencial para la estimación de la cardiotoxicidad en humanos. Esto es debido a la principal disparidad existente entre el potencial de acción cardíaco de una rata y del ser humano, que concretamente se corresponde con las diferentes corrientes responsables de la fase 3 de repolarización de la membrana del cardiomiocito y cuya intervención se considera crítica para un correcto desarrollo del mismo. De este modo, la I_{kr} , corriente de la que es responsable el canal hERG, es el componente principal de esta fase en el caso del ser humano, y la I_{to} lo es en la rata [164]. Por lo tanto, para una estimación completa del potencial cardiotoxico de estas toxinas en las personas, resultaba imprescindible incluir, junto con los estudios realizados *in vivo* en roedores, experimentos *in vitro* en el canal que supone la mayor diferencia entre los potenciales de acción cardíacos de ambas especies, el canal cardíaco hERG.

En estos estudios *in vitro* sólo los AZAs, y concretamente el AZA-2, bloquearon el canal cardíaco hERG con una potencia clasificada como de moderada-baja, confirmando lo descrito recientemente para estas toxinas por otro grupo de investigación [135]. Esta clasificación de potencia de los AZAs reduce sus probabilidades de causar alteraciones en la repolarización cardíaca y por ende en el potencial de acción cardíaco; lo cual se vería como un alargamiento del intervalo QT en el electrocardiograma [164, 187]. El AO, la DTX-1 y la YTX no presentaron ningún efecto agudo sobre el canal hERG. Por

consiguiente, ninguna de las toxinas evaluadas posee una potencia de bloqueo del canal hERG con significación fisiológica como para causar alteraciones funcionales de importancia a nivel cardíaco.

En relación con los estudios *in vitro* de toxicidad a largo plazo, también se exploraron los efectos de AZA-2 y YTX sobre hERG, concretamente sus efectos en la expresión en membrana y en sus corrientes después de exposiciones prolongadas de ambas toxinas. En este caso tampoco se observaron efectos que pudiesen tener relevancia fisiopatológica. De hecho, aunque estas dos toxinas provocaron un aumento significativo de la expresión del canal hERG en la membrana celular después de una exposición de 12 horas, las corrientes dependientes de este canal no presentaron modificaciones debido al efecto originado por las mismas. La YTX y los AZAs se han relacionado con la inhibición del proceso de endocitosis celular [95, 98, 134]. Este efecto podría estar relacionado con una reducción de la internalización del canal hERG y por ello causar el aumento de su número en la membrana celular; teniendo en cuenta en todo caso que aparentemente el número de canales funcionales no se ve afectado de forma significativa.

De forma general, los datos disponibles de los estudios *in vivo* de las toxinas marinas hacen referencia a la toxicidad aguda, y en ellos se basan las estimaciones de riesgo para la salud humana realizadas para la mayor parte de ellas. El estudio de la cardiotoxicidad *in vivo* determinó que la administración intravenosa aguda de AO, DTX-1 y YTX en ratas no altera ni el electrocardiograma ni la concentración plasmática de los biomarcadores cardíacos. Considerando que las evidencias publicadas para estas toxinas, y sobre todo para la YTX, indican cardiotoxicidad a nivel de la ultraestructura de los cardiomiocitos; esta ausencia de efectos funcionales sugiere que el daño causado no es suficiente para provocar una alteración funcional y/o que los mecanismos de compensación del corazón, como el mecanismo Frank-Starling, la activación neurohormonal o la remodelación ventricular [188], mantienen la función cardíaca dentro de la normalidad.

En contraposición, la administración aguda intravenosa de AZA-2 en ratas provocó una prolongación significativa de los intervalos PR, con consecuentes bloqueos de la conducción del impulso cardíaco de diferente grado, y un aumento de la frecuencia

4. Discusión

de aparición de arritmias. Estos efectos demuestran una capacidad del AZA-2 para afectar el ritmo y la conducción cardíacos sin alterar los mecanismos de repolarización cardíaca.

A la vista de estos resultados de toxicidad aguda, y considerando las dosis de toxina utilizadas en los experimentos de administración intravenosa, cabe suponer que el AZA-2 posee un mayor potencial cardiotóxico que el AO, la DTX-1 y la YTX. De hecho, aunque las dosis de AZA-2 (11 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y YTX (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) usadas en nuestros estudios están próximas a la DL_{50} , y son además 10 veces menores que la DL_{50} por vía intraperitoneal en ambos casos [80, 105], solamente se observaron alteraciones de la función cardíaca para el AZA-2. De un modo similar, la dosis de AO (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), que al igual que las anteriores es 10 veces menor que la DL_{50} por vía intraperitoneal [44, 46], fue suficiente para provocar un aumento de ALT, al igual que lo causó el AZA-2, y confirmando para ambas toxinas una actividad hepatotóxica ya descrita [54, 125]. Sin embargo, el AO no indujo ninguna alteración detectable de la función cardíaca, mientras que el AZA-2 si lo hizo.

Como se menciona en líneas anteriores, la valoración de los riesgos para la salud humana está basada en la mayoría de los casos en experimentos de toxicidad aguda debido a la escasez de datos sobre toxicidad crónica en el conjunto de las toxinas marinas. No obstante, lo ideal sería determinar su ingesta diaria admisible (IDA) a partir de estudios de toxicidad con exposiciones repetidas y a largo plazo. La carestía de estos compuestos ha sido la causa que ha impedido en muchos casos la realización de este tipo de experimentos.

Los datos de toxicidad *in vitro* e *in vivo* de los AZAs y la YTX apuntaban un potencial efecto tóxico a largo plazo a nivel cardíaco. En efecto, los AZAs son responsables de daños caracterizados como de lenta recuperación en el estómago, el intestino delgado y el pulmón de ratones después de su exposición oral repetida a dosis subletales [126]. Además de ser toxinas que se han detectado en los corazones de ratones tras su administración por vía oral [189] y para las cuales se ha demostrado que algunos de sus efectos a nivel celular son irreversibles [130]. La YTX, por otro lado, causa la muerte celular de cardiomiocitos *in vitro* [88] y provoca alteraciones

ultraestructurales en los corazones de ratones tanto después de su administración oral e intraperitoneal aguda como de la oral repetida [45, 55, 56, 79, 81, 83].

Los resultados de nuestros estudios subagudos confirmaron que la administración intraperitoneal de cuatro dosis repetidas de YTX o de AZA-1 a ratas a lo largo de 15 días indujo alteraciones funcionales que incluyeron un estado de hipotensión acusado de carácter dosis-dependiente. Además, y también para ambas toxinas, se observaron alteraciones estructurales como un incremento significativo del marcador de remodelación cardíaca TIMP-1 y un aumento de la producción de colágeno entre las fibras cardíacas; siendo éste último solamente significativo en los corazones de las ratas tratadas con AZA-1. En relación con la ultraestructura del miocardio observada por microscopía electrónica, tanto la YTX como el AZA-1 causaron desorganización de las miofibrillas de los cardiomiocitos con ruptura y pérdida del patrón estriado típico de músculo cardíaco, una marcada afectación mitocondrial reflejada tanto en cambios en el tamaño, forma y localización de las mitocondrias como en la vacuolización de su contenido, la aparición de cuerpos lipídicos y la ruptura del sarcolema de los cardiomiocitos.

Hasta aquí, los efectos funcionales y estructurales causados por la YTX y el AZA-1 en las ratas de nuestras evaluaciones cardíacas coinciden para la acción de ambas toxinas; no obstante, existen otros que son claramente diferentes. A nivel funcional, mientras la toxicidad cardíaca de la YTX se manifiesta con una acusada bradicardia a dosis de 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$, la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AZA-1 supone el desarrollo de una clara ascitis, síntoma asociado a la instauración de una insuficiencia cardíaca [188]. Las alteraciones en la estructura del miocardio, y concretamente los cambios en la matriz extracelular, que incluyen de manera fundamental a las redes de colágeno, han sido caracterizados como signos indicadores del proceso de remodelación cardíaca [175, 176]. El remodelado cardíaco se define como el conjunto de cambios anatómicos, geométricos, histológicos y moleculares del miocardio que surgen como resultado de un daño persistente. Estos cambios, y de manera principal la fibrosis, determinan un deterioro de la función ventricular diastólica y sistólica que como última consecuencia suponen el desarrollo de una insuficiencia cardíaca. De esta manera, lo que inicialmente actúa como un mecanismo de reparación ante un daño o a un estrés mecánico existente, puede ser origen del desarrollo gradual de un proceso de fallo cardíaco [175,

4. Discusión

176]. Las evidencias de remodelación cardíaca de las ratas tratadas con AZA-1 permitieron dar explicación fisiopatológica al cuadro ascítico desarrollado por las ratas a lo largo del proceso de administración. Además sugieren, al igual que en su administración aguda, un mayor potencial cardiotoxico para el AZA-1, ya que esta toxina en un mismo periodo de tiempo y con una dosis más de 5 veces menor que la de YTX ocasionó un proceso de remodelado de la matriz intersticial del miocardio con consecuencias funcionales.

Otra evidencia de una superior cardiotoxicidad ejercida por el AZA-1 con respecto a la YTX se encuentra en las alteraciones ultraestructurales detectadas en los tejidos cardíacos. Por primera vez se detectaron autofagosomas en los cardiomiocitos más afectados de las ratas tratadas con YTX, especialmente con la dosis de 70 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, los cardiomiocitos de las ratas tratadas con AZA-1 con una dosis hasta 7 veces menor y que manifestaron un intenso daño ultraestructural cardíaco no presentaron autofagosomas. A estos hallazgos hay que añadir que en estos mismos tejidos, pero a nivel molecular, se comprobó que mientras la YTX indujo el aumento de las señales relacionadas con la autofagia y por tanto de los mecanismos de mantenimiento de la homeostasis celular a nivel funcional y estructural [190, 191], el AZA-1 causó un aumento de los marcadores que indican activación de las rutas de apoptosis, lo cual sigue constatando su mayor potencial cardiotoxico [192, 193].

En la misma línea, la dosis de AZA-1 de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ activó señales que están relacionadas con el disparo de mecanismos de supervivencia de la célula como son las proteínas beclin-1 y Akt [194, 195]. La proteína beclin-1 es un marcador de autofagia de cuya activación depende el inicio del proceso autofágico y que además actúa como punto de inflexión entre la autofagia o la apoptosis. De esta manera su activación conlleva una respuesta protectora frente al daño que dispara la autofagia, y su inhibición supone la apoptosis [195]. De un modo semejante, la Akt es una proteína implicada en la regulación positiva de la autofagia y su activación se ha relacionado con la protección de cardiomiocitos en casos de estrés o daño continuado [194]. Estas señales de supervivencia no aparecieron en los tejidos tratados con la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en los que por otro lado, sí se detectaron claros signos de apoptosis como son la retracción del volumen celular y el aumento de la densidad citoplasmática a nivel ultraestructural, y el

incremento de los marcadores de regulación y/o activación de las rutas apoptóticas como las caspasas 3 y 8, el PARP y el ligando Fas [196-199]. Por tanto parece que a este nivel de dosificación los mecanismos de protección se ven sobrepasados por la intensidad del daño celular y se dispara la muerte por apoptosis.

Para el caso de la YTX el aumento de LC3-II y de beclin-1, ambos marcadores de autofagia [190, 200, 201], resultó significativo a 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$; como además lo fueron los niveles del ligando Fas, que aparte de su implicación en la regulación de la apoptosis por la vía extrínseca, se asocia con un tipo de muerte celular programada conocida como autofagia dependiente de necroptosis, y que ocurre cuando los mecanismos de autofagia se ve superados en su función de mantener la integridad celular [202]. Sin embargo, la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de YTX no activó de modo estadísticamente significativo ninguna de las señales moleculares anteriormente mencionadas. Estos resultados sugieren que el daño en el miocardio es menor en las ratas tratadas con 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de YTX que en el caso del AZA-1, al menos para la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tanto las diferencias evidenciadas entre los efectos funcionales y estructurales causados por la YTX y el AZA-1, como las detectadas en la activación por estas toxinas de las principales rutas de muerte celular de los cardiomiocitos, indican ya no sólo un efecto tóxico superior para el AZA-1 en el corazón sino que ambas toxinas parecen actuar mediante mecanismos de toxicidad diferentes.

A las afirmaciones anteriores se le puede añadir cierta toxicidad selectiva para el AZA-1 a nivel cardíaco. Ello se explica porque aunque ambas toxinas provocaron efectos cardiotóxicos, sólo la YTX ocasionó signos de toxicidad en otros órganos. La toxicidad en el sistema renal y hepático pudo ser secundaria al estado de hipoperfusión, ya que la irrigación sanguínea de ambos sistemas depende directamente del correcto funcionamiento de la hemodinámica del sistema cardiovascular. Sin embargo, frente a un estado de hipotensión acusado similar producido por ambas toxinas, sólo las ratas tratadas con YTX mostraron afectación significativa de los parámetros de daño renal y hepático [203-205], lo que sugiere que la YTX ejerce un efecto tóxico directo también en estos órganos.

Los efectos en el metabolismo lipídico y de la glucosa, de nuevo sólo evidenciados en las ratas tratadas con YTX, se suman a esta inespecificidad de acción tóxica. Esta toxina se ha descrito como un agente causante de estrés tóxico en el retículo

4. Discusión

endoplasmático [100]. La toxicidad en este orgánulo a nivel hepático justificaría las modificaciones en el metabolismo lipídico y de la glucosa manifestadas por la alteración significativa de los niveles plasmáticos de CHOL y GLU; además de dar otra posible explicación al incremento de la ALKP. No obstante, la sola detección de ambos parámetros no nos permite dilucidar si es una acción específica de la YTX o si es consecuencia de su toxicidad secundaria que igualmente puede activar los mecanismos de estrés en el retículo endoplasmático.

Si en este punto consideramos que el estrés en el retículo endoplasmático no sólo ha sido descrito como causante de la aparición del mismo tipo de lesiones en los cardiomiocitos que las evidenciadas en nuestros estudios para la YTX, y principalmente por su implicación en las rutas autofágicas del corazón, sino que además se relaciona con el desarrollo fisiopatológico de alteraciones a nivel cardiovascular, renal y hepático [206-209]; cabe proponer este mecanismo de toxicidad como el causante de los efectos descritos para la YTX en todos los tejidos mencionados. Al mismo tiempo, dado que el sistema cardiovascular tiene una mayor sensibilidad al daño de este orgánulo celular que ningún otro sistema del organismo, fundamentalmente por su participación directa en numerosos aspectos de la fisiología cardíaca como son la regulación de los flujos de Ca^{+2} y el control de los mecanismos de excitación-contracción del corazón [207], la presencia de mayores daños a nivel cardíaco en relación al resto de órganos, adquiriría sentido para el tratamiento de la YTX.

Por último, en relación con la toxicidad de la YTX en otros órganos o sistemas, nuestros resultados también confirmaron su actividad inmunotóxica e inmunomoduladora [84, 98, 210]. De las alteraciones observadas, las discrasias sanguíneas y las alteraciones estructurales de bazo parecen indicar una toxicidad secundaria como consecuencia de un estado de estrés causado por el tratamiento con YTX [211]. Sin embargo, la reducción de la interleuquina-6 plasmática, que habitualmente se encuentra incrementada en casos de daño cardíaco [212] o de estrés en el retículo endoplasmático a nivel del sistema inmunitario [213], puede señalar cierta acción tóxica directa de la YTX en este sistema.

Con todo, los hallazgos referidos para la YTX proporcionan por primera vez una significación fisiológica funcional a los efectos histopatológicos descritos en múltiples estudios *in vivo* realizados hasta la fecha [45, 55, 56, 79, 81, 83], además de mostrar un potencial cardiotoxico *in vivo* de los AZAs que hasta el momento no se había detectado. Por otro lado, la cardiotoxicidad aguda y subaguda de AZAs parece ser superior que la de la YTX y presentar cierta especificidad de acción en el corazón.

Toda esta información debe de ser considerada en relación al riesgo que suponen ambas toxinas para la seguridad alimentaria y por ende para la salud pública. Para el caso de los AZAs, una ración de 400 g de carne de molusco, de acuerdo con el límite máximo permitido de 160 μg de equivalentes de AZA-1 por kg de carne de molusco [13], puede suponer una dosis de toxina de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para una persona de 60 kg de peso. Las dosis de AZAs que mostraron efectos significativos a nivel cardíaco en ratas fueron 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AZA-2 como dosis intravenosa aguda y 1 ó 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AZA-1 como dosis intraperitoneales subagudas. Si a estas dosis se les aplican los factores de corrección intra e inter-especie recomendados por la EFSA [26] y además son corregidas para una vía de administración oral [26, 49, 121, 214], se obtiene una equivalencia de dosis orales agudas en humanos comprendidas en un rango de 8,3 a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AZA-2 y dosis orales subagudas de 0,16 a 3,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AZA-1. El tamaño de la ración establecida por la EFSA para la estimación de riesgos es considerada por algunos expertos extremadamente protectora, y de hecho el Códex Alimentarius recomienda utilizar para el cálculo de riesgos y límites regulados una ración de 250 g de carne de molusco [23]. Sin embargo, aun considerando una ración de 250 g, la exposición para una persona de 60 kg sería de 0,63 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Esta dosis es casi cuatro veces superior a la dosis oral subaguda estimada como equivalente en humanos de la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en ratas y que produjo una clara hipotensión en las mismas.

Si analizamos ahora la YTX, el límite máximo permitido está actualmente en 3,75 mg de equivalentes de YTX por kg de carne de molusco; después de que éste se haya incrementado recientemente por las autoridades europeas de seguridad alimentaria en recomendación tanto de la EFSA como del Códex Alimentarius ante la inexistencia de datos irrefutables de toxicidad en humanos [17, 25, 215]. Atendiendo a esta cantidad máxima permitida, una ración de 400 g o 250 g de carne de molusco puede suponer

4. Discusión

hasta 25 o 15,63 μg de YTX por kg respectivamente para una persona de 60 kg de peso. Si a las dosis de 50 y 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de YTX empleadas en el estudio subagudo en ratas, se les aplica los factores de corrección intra e inter-especie recomendados por la EFSA [25], y se les corrige para una vía de administración oral [81], se obtienen dosis orales en humanos de 25 y 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente. No obstante, para el caso de la YTX, todavía son necesarios más estudios toxicocinéticos que determinen su biodisponibilidad oral y que puedan ser extrapolables a la situación en humanos, proporcionando datos concluyentes que permitan hacer una mejor estimación de los riesgos.

A la vista de estas cifras, las dosis usadas en los estudios subagudos, y que mostraron signos evidentes de cardiotoxicidad para ambas toxinas después de su administración repetida, e incluso en otros órganos y sistemas para el caso de la YTX, están muy cerca de los límites máximos de toxina permitidos en los mariscos destinados al consumo humano. Además si se tuviese en cuenta la población en riesgo cardiovascular preexistente, los factores intra-especie probablemente incrementarían [10]; recordando aquí que las enfermedades cardiovasculares están consideradas como primera causa de muerte en el mundo occidental [182].

La mayoría de los límites de toxinas regulados hasta la fecha se han establecido con el objetivo principal de proteger a la población de sus posibles efectos agudos. Este hecho se justifica, entre otros motivos, por la escasez de datos disponibles de toxicidad crónica o de exposiciones repetidas y por la gravedad y letalidad de alguno de ellos. Al mismo tiempo, esta regulación ha permitido controlar el progresivo aumento de este tipo de intoxicaciones alimentarias que vendría de la mano del incremento de las floraciones de algas nocivas tóxicas de los últimos años [8-10]. Sin embargo, los resultados de los estudios subagudos realizados en esta Tesis Doctoral ponen en evidencia la necesidad de considerar los efectos que a largo plazo las toxinas marinas suponen o pueden suponer cuando son ingeridas de manera repetida en las cantidades legalmente permitidas. En este sentido, la ingesta diaria admisible, como la cantidad de un contaminante que una persona puede ingerir cada día durante toda su vida sin que cause daños para su salud, es el parámetro que las autoridades de seguridad alimentaria utilizan para controlar la exposición a contaminantes alimentarios, y que no está incluida en los análisis de riesgo realizados por las autoridades de seguridad

alimentaria para la YTX y la AZA-1 por no disponer de datos toxicológicos que lo permitieran [25, 26].

Si tenemos presente que los estándares de salud pública de la actualidad se centran cada vez más en los factores desencadenantes de enfermedades de tipo crónico-degenerativo denominadas como “de la civilización” o “no transmisibles”, entre los cuales se incluye el consumo habitual de sustancias nocivas para la salud, como lo son las pequeñas cantidades de toxinas marinas contenidas en los mariscos destinados al consumo humano [216]; los resultados de esta Tesis Doctoral manifiestan una necesaria reevaluación de los análisis de riesgo realizados para estas toxinas en la que se incluya sus toxicidades a largo plazo.





5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. El AO y la YTX no bloquean el canal cardíaco hERG mientras que el AZA-2 lo bloquea con una potencia clasificada como de moderada-baja sin significación fisiológica funcional.
2. La YTX y el AZA-2 incrementan la expresión del canal cardíaco hERG en la membrana plasmática debido a una afectación de los mecanismos de internalización sin consecuencias funcionales en términos de corriente.
3. El AZA-2 tiene un efecto cardiotoxico agudo en ratas que se manifiesta como alteraciones funcionales en el ritmo y la conducción del corazón.
4. La exposición subaguda de las ratas a YTX y AZA-1 evidencia la capacidad de estas toxinas para causar alteraciones funcionales y estructurales a nivel cardíaco.
5. El daño cardíaco subagudo inducido por la YTX desencadena un aumento de los procesos autofágicos y el causado por el AZA-1 activa señales intracelulares apoptóticas.
6. El AZA-1 presenta cierta especificidad cardíaca pues sólo el corazón mostró alteraciones estructurales. Sin embargo, la YTX provoca inmunotoxicidad y efectos tóxicos en riñones e hígado.



6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. James, K.J., Carey, B., O'Halloran, J., Van Pelt, F.N., and Skrabakova, Z., *Shellfish toxicity: human health implications of marine algal toxins*. *Epidemiol Infect*, 2010. 138(7): p. 927-40.
2. Holmes, M.J., Brust, A., and Lewis, R.J., *Dinoflagellate Toxins: An Overview.*, in *Seafood and Freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. Luis M. Botana, CRC press,2014. Boca Ratón. p. 3-25.
3. Daranas, A.H., Norte, M., and Fernandez, J.J., *Toxic marine microalgae*. *Toxicon*, 2001. 39(8): p. 1101-32.
4. Kalaitzis, J.A., Chau, R., Kohli, G.S., Murray, S.A., and Neilan, B.A., *Biosynthesis of toxic naturally-occurring seafood contaminants*. *Toxicon*, 2010. 56(2): p. 244-58.
5. Landsberg, J.H., *The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms*. *Rev Fish Sci*, 2002. 10(2): p. 113-390.
6. Lopes, V.M., Lopes, A.R., Costa, P., and Rosa, R., *Cephalopods as Vectors of Harmful Algal Bloom Toxins in Marine Food Webs*. *Mar Drugs*, 2013. 11(9): p. 3381-3409.
7. Anderson, D.M., *Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs)*. *Ocean Coast Manage* 2009. 52(7): p. 342.
8. Moore, S.K., Trainer, V.L., Mantua, N.J., Parker, M.S., Laws, E.A., Backer, L.C., and Fleming, L.E., *Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health*. *Environ Health*, 2008. 7 Suppl 2: p. S4.
9. Botana, L.M., *Toxicological Perspective on Climate Change: Aquatic Toxins*. *Chem Res Toxicol*, 2016.
10. Munday, R. and Reeve, J., *Risk assessment of shellfish toxins*. *Toxins (Basel)*, 2013. 5(11): p. 2109-37.
11. Van Dolah, F.M., *Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence*. *Environ Health Perspect*, 2000. 108 Suppl 1: p. 133-41.
12. Berdalet, E., Fleming, L.E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L.C., Moore, S.K., Hoagland, P., and Enevoldsen, H., *Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century*. *J Mar Biol Assoc UK*, 2015.

6. Bibliografia

13. European Commission, *Regulation (EU) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Off J Eur Communities. Annex III, Sect VIII, Chap V, 2. L 226 PP 60-61.*
14. European Commission, *Regulation (EU) No. 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No. 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No. 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No. 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No. 853/2004 and (EC) No 854/2004. Off J Eur Communities. L338 P27.*
15. European Commission, *Regulation (EU) No.1664/2006 of November 6, 2006 amending Regulation (EU) No. 2074/2005 as regards implementing measures for certain products of animal origin intended for human consumption and repealing certain implementing measures. Off J Eur Communities.L230 P13.*
16. European Commission, *Regulation (EU) No. 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EU) No. 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. Off J Eur Communities. L6 PP 3-6.*
17. European Commission, *Regulation (EU) No. 786/2013 of 16 August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs. Off J Eur Communities. L 20 P14.*
18. European Commission, *Regulation (EU) No. 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare. Off J Eur Communities. L 165 PP 1-141.*
19. European Commission, *Regulation (EU) No. 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation*

- of official controls on products of animal origin intended for human consumption. Off J Eur Communities. Annex II. L 226 PP 119-121.*
20. FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations; Rome, Italy: Marine Biotoxins, 2004, p. 80.*
 21. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on marine biotoxins in shellfish: Statement on further elaboration of the consumption figure of 400 g shellfish meat on the basis of new consumption data.* EFSA J, 2010. 1706: p. 1-20.
 22. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on marine biotoxins in shellfish-Marine biotoxins in shellfish-Summary on regulated marine biotoxins.* EFSA J, 2009. 1306: p. 1-23.
 23. Lawrence J., L.H., Toyofuku H., Hess P., Iddya K., Ababouch L., *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 551, Assessment and Management of Biotoxin Risks in Bivalve Molluscs. Food and Agriculture Organisation of the United Nations; Rome, Italy: 2011.*
 24. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish- okadaic acid and analogues.* EFSA J, 2008. 589: p. 1-62.
 25. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish-yessotoxin group.* EFSA J, 2008. 907: p. 1-62.
 26. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish- Azaspiracid group.* EFSA J, 2008. 723: p. 1-52.
 27. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on marine biotoxins in shellfish-pectenotoxin group.* EFSA J, 2009. 1109: p. 1-47.
 28. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish- Palytoxin group.* EFSA J, 2009. 7(12):1393: p. 1-38.
 29. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish- Saxitoxin group.* EFSA J, 2009. 1019: p. 1-76.

6. Bibliografía

30. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish- Domoic acid*. EFSA J, 2009. 1181: p. 1-61.
31. Yasumoto, T., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., and Fujita, N., *Identification of Dinophysis fortii as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning in the Tohoku district*. B Jpn Soc Sci Fish, 1980. 46: p. 1405-1411.
32. Murakami, Y., Oshima, Y., and Yasumoto, T., *Identification of okadaic acid as the toxic component of a marine dinoflagellate Prorocentrum lima*. B Jpn Soc Sci Fish, 1982. 48: p. 69-72.
33. Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K., and Clardy, J., *Diarrhetic shellfish toxins*. Tetrahedron 1985. 41: p. 1019-1025.
34. Yasumoto, T., Oshima, Y., and M., Y., *Ocurrence of a new type of shellfish poisoning in in the Tohoku district*. B Jpn Soc Sci Fish, 1978. 44: p. 1249-1255.
35. Kat, M., *Diarrhetic mussel poisoning in the Netherlands related to the dinoflagellate Dinophysis acuminata*. Anton Leeuw Int J G, 1983. 49(4-5): p. 417-27.
36. Paz, B., Daranas, A.H., Cruz, P.G., Franco, J.M., Norte, M., and Fernandez, J.J., *Identification of 19-epi-okadaic acid, a new diarrhetic shellfish poisoning toxin, by liquid chromatography with mass spectrometry detection*. Mar Drugs, 2008. 6(3): p. 489-95.
37. Dominguez, H.J., Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Franco, J.M., and Fernandez, J.J., *Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications*. Toxicon, 2010. 56(2): p. 191-217.
38. Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y., and Yasumoto, T., *Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning*. B Jpn Soc Sci Fish, 1982. 48: p. 549-552.
39. Vale, P. and de, M.S.M.A., *First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (Solen marginatus) and green crabs (Carcinus maenas) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton*. Toxicon, 2002. 40(7): p. 989-96.

40. Torgersen, T., Aasen, J., and Aune, T., *Diarrhetic shellfish poisoning by okadaic acid esters from Brown crabs (Cancer pagurus) in Norway*. *Toxicon*, 2005. 46(5): p. 572-8.
41. Villar-Gonzalez, A., Rodriguez-Velasco, M.L., Ben-Gigirey, B., and Botana, L.M., *Lipophilic toxin profile in Galicia (Spain): 2005 toxic episode*. *Toxicon*, 2007. 49(8): p. 1129-34.
42. Lee, K.J., Mok, J.S., Song, K.C., Yu, H., Lee, D.S., Jung, J.H., and Kim, J.H., *First detection and seasonal variation of lipophilic toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1, and yessotoxin in Korean gastropods*. *J Food Prot*, 2012. 75(11): p. 2000-6.
43. Silva, M., Barreiro, A., Rodriguez, P., Otero, P., Azevedo, J., Alfonso, A., Botana, L.M., and Vasconcelos, V., *New Invertebrate Vectors for PST, Spirolides and Okadaic Acid in the North Atlantic*. *Mar Drugs*, 2013. 11(6): p. 1936-1960.
44. Aune, T., Larsen, S., Aasen, J.A., Rehmann, N., Satake, M., and Hess, P., *Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice*. *Toxicon*, 2007. 49(1): p. 1-7.
45. Tubaro, A., Sosa, S., Carbonatto, M., Altinier, G., Vita, F., Melato, M., Satake, M., and Yasumoto, T., *Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice*. *Toxicon*, 2003. 41(7): p. 783-92.
46. Dickey, R.W., Bobzin, S.C., Faulkner, D.J., Bencsath, F.A., and Andrzejewski, D., *Identification of okadaic acid from a Caribbean dinoflagellate, Prorocentrum concavum*. *Toxicon*, 1990. 28(4): p. 371-7.
47. Tubaro, A., Sosa, S., Bornancin, A., and Hungerford, J., *Pharmacology and toxicology of diarrhetic shellfish toxins.*, in *Seafood and Freshwater Toxins: pharmacology, physiology and detection*. Luis M. Botana, CRC Press, 2008. Boca Raton. p. 229–253.
48. Ito, E., Yasumoto, T., Takai, A., Imanishi, S., and Harada, K., *Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method*. *Toxicon*, 2002. 40(2): p. 159-65.
49. Aune, T., Espenes, A., Aasen, J.A., Quilliam, M.A., Hess, P., and Larsen, S., *Study of possible combined toxic effects of azaspiracid-1 and okadaic acid in mice via the oral route*. *Toxicon*, 2012. 60(5): p. 895-906.

6. Bibliografia

50. Ito, E. and Terao, K., *Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds*. Nat Toxins, 1994. 2(6): p. 371-7.
51. Aune, T., Stabell, O.B., Nordstoga, K., and Tjøtta, K., *Oral toxicity in mice of algal toxins from the diarrhetic shellfish toxin (DST) complex and associated toxins*. J Nat Toxins, 1998. 7(2): p. 141-158.
52. Terao, K., Ito, E., Ohkusu, M., and Yasumoto, T., *A comparative study of the effects of DSP-toxins on mice and rats.*, in *Toxic Phytoplankton Blooms in the sea*. Smayda T.J. and Shimizu Y., Elsevier, 1993. Amsterdam. p. 581-586.
53. Franchinia, A., Marchesini, E., Poletti, R., and Ottaviani, E., *Swiss mice CD1 fed on mussels contaminated by okadaic acid and yessotoxins: effects on thymus and spleen*. Eur J Histochem, 2005. 49(2): p. 179-88.
54. Berven, G., Saetre, F., Halvorsen, K., and Seglen, P.O., *Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionality of rat liver and intestinal cells*. Toxicon, 2001. 39(2-3): p. 349-62.
55. Sosa, S., Ardizzone, M., Beltramo, D., Vita, F., Dell'Ovo, V., Barreras, A., Yasumoto, T., and Tubaro, A., *Repeated oral co-exposure to yessotoxin and okadaic acid: a short term toxicity study in mice*. Toxicon, 2013. 76: p. 94-102.
56. Tubaro, A., Sosa, S., Altinier, G., Soranzo, M.R., Satake, M., Della Loggia, R., and Yasumoto, T., *Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice*. Toxicon, 2004. 43(4): p. 439-45.
57. Suganuma, M., Fujiki, H., Suguri, H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nakayasu, M., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamada, K., and Sugimura, T., *Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter*. Proc Natl Acad Sci, 1988. 85(6): p. 1768-71.
58. Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Murata, M., and Yasumoto, T., *Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin*. Jpn J Cancer Res, 1988. 79(10): p. 1089-93.
59. Suganuma, M., Tatematsu, M., Yatsunami, J., Yoshizawa, S., Okabe, S., Uemura, D., and Fujiki, H., *An alternative theory of tissue specificity by tumor promotion of okadaic acid in glandular stomach of SD rats*. Carcinogenesis, 1992. 13(10): p. 1841-5.

60. Matias, W.G., Traore, A., and Creppy, E.E., *Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome*. Hum Exp Toxicol, 1999. 18(5): p. 345-50.
61. Ehlers, A., Scholz, J., These, A., Hessel, S., Preiss-Weigert, A., and Lampen, A., *Analysis of the passage of the marine biotoxin okadaic acid through an in vitro human gut barrier*. Toxicology, 2011. 279(1-3): p. 196-202.
62. Fernandez, D.A., Louzao, M.C., Fraga, M., Vilariño, N., Vieytes, M.R., and Botana, L.M., *Experimental basis for the high oral toxicity of dinophysistoxin 1: a comparative study of DSP*. Toxins (Basel), 2014. 6(1): p. 211-28.
63. Louzao, M.C., Fernandez, D.A., Abal, P., Fraga, M., Vilarino, N., Vieytes, M.R., and Botana, L.M., *Diarrhetic effect of okadaic acid could be related with its neuronal action: Changes in neuropeptide Y*. Toxicol Lett, 2015. 237(2): p. 151-60.
64. Takai, A., Bialojan, C., Troschka, M., and Ruegg, J.C., *Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin*. FEBS Lett, 1987. 217(1): p. 81-4.
65. Honkanen, R.E., Codispoti, B.A., Tse, K., Boynton, A.L., and Honkanen, R.E., *Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases*. Toxicon, 1994. 32(3): p. 339-50.
66. Valdiglesias, V., Prego-Faraldo, M.V., Pasaro, E., Mendez, J., and Laffon, B., *Okadaic acid: more than a diarrhetic toxin*. Mar Drugs, 2013. 11(11): p. 4328-49.
67. Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y., and Yasumoto, T., *Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning*. B Jpn Soc Sci Fish, 1986. 48: p. 549-552.
68. Satake, M., MacKenzie, L., and Yasumoto, T., *Identification of Protoceratium reticulatum as the biogenetic origin of yessotoxin*. Nat Toxins, 1997. 5(4): p. 164-7.
69. Rhodes, L., McNabb, P., de Salas, M., Briggs, L., Beuzenberg, V., and Gladstone, M., *Yessotoxin production by Gonyaulax spinifera*. Harmful Algae, 2006. 5(2): p. 148-155.
70. Paz, B., Riobó, P., Luisa Fernández, M., Fraga, S., and Franco, J.M., *Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates Protoceratium reticulatum and Lingulodinium polyedrum in culture*. Toxicon, 2004. 44(3): p. 251-258.

6. Bibliografía

71. Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C., Poletti, R., Milandri, A., Ceredi, A., and Pompei, M., *High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea*. *Toxicon*, 1999. 37(8): p. 1187-93.
72. Morton, S.L., Vershinin, A., Leighfield, T., Smith, L., and Quilliam, M., *Identification of yessotoxin in mussels from the Caucasian Black Sea Coast of the Russian Federation*. *Toxicon*, 2007. 50(4): p. 581-4.
73. Krock, B., Seguel, C.G., Valderrama, K., and Tillmann, U., *Pectenotoxins and yessotoxin from Arica Bay, North Chile as determined by tandem mass spectrometry*. *Toxicon*, 2009. 54(3): p. 364-7.
74. Rodriguez, L.P., Gonzalez, V., Martinez, A., Paz, B., Lago, J., Cordeiro, V., Blanco, L., Vieites, J.M., and Cabado, A.G., *Occurrence of lipophilic marine toxins in shellfish from Galicia (NW of Spain) and synergies among them*. *Mar Drugs*, 2015. 13(4): p. 1666-87.
75. Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Riobo, P., Franco, J.M., and Fernandez, J.J., *Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview*. *Mar Drugs*, 2008. 6(2): p. 73-102.
76. Arévalo, F., Pazos, Y., Correa, J., Salgado, C., Moroño, A., Paz, B., and Franco, J.M., *First report of yessotoxins in mussels of Galician Rías during a bloom of *Lingulodinium polyedra* Stein (Dodge)*. Galway, Ireland, 2006: p. 184-189.
77. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Satake, M., Viviani, R., and Yasumoto, T., *Yessotoxin in mussels of the northern Adriatic Sea*. *Toxicon*, 1997. 35(2): p. 177-183.
78. Tubaro, A., Dell'ovo, V., Sosa, S., and Florio, C., *Yessotoxins: a toxicological overview*. *Toxicon*, 2010. 56(2): p. 163-72.
79. Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M., and Yasumoto, T., *Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning--5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative*. *Toxicon*, 1990. 28(9): p. 1095-104.
80. Ogino, H., Kumagai, M., and Yasumoto, T., *Toxicologic evaluation of yessotoxin*. *Nat Toxins*, 1997. 5: p. 255-259.

81. Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H., and Landsverk, T., *Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice*. *Toxicol*, 2002. 40(1): p. 77-82.
82. Aune, T., Aasen, J.A.B., Miles, C.O., and Larsen, S., *Effect of mouse strain and gender on LD50 of yessotoxin*. *Toxicol*, 2008. 52(4): p. 535-540.
83. Tubaro, A., Giangaspero, A., Ardizzone, M., Soranzo, M.R., Vita, F., Yasumoto, T., Maucher, J.M., Ramsdell, J.S., and Sosa, S., *Ultrastructural damage to heart tissue from repeated oral exposure to yessotoxin resolves in 3 months*. *Toxicol*, 2008. 51(7): p. 1225-35.
84. Franchini, A., Marchesini, E., Poletti, R., and Ottaviani, E., *Lethal and sub-lethal yessotoxin dose-induced morpho-functional alterations in intraperitoneal injected Swiss CD1 mice*. *Toxicol*, 2004. 44(1): p. 83-90.
85. Franchini, A., Marchesini, E., Poletti, R., and Ottaviani, E., *Acute toxic effect of the algal yessotoxin on Purkinje cells from the cerebellum of Swiss CD1 mice*. *Toxicol*, 2004. 43(3): p. 347-52.
86. Malaguti, C., Ciminiello, P., Fattorusso, E., and Rossini, G.P., *Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells*. *Toxicol In Vitro*, 2002. 16(4): p. 357-63.
87. Korsnes, M.S., Hetland, D.L., Espenes, A., Tranulis, M.A., and Aune, T., *Apoptotic events induced by yessotoxin in myoblast cell lines from rat and mouse*. *Toxicol In Vitro*, 2006. 20(7): p. 1077-87.
88. Dell'Ovo, V., Bandi, E., Coslovich, T., Florio, C., Sciancalepore, M., Decorti, G., Sosa, S., Lorenzon, P., Yasumoto, T., and Tubaro, A., *In vitro effects of yessotoxin on a primary culture of rat cardiomyocytes*. *Toxicol Sci*, 2008. 106(2): p. 392-9.
89. Korsnes, M.S. and Espenes, A., *Yessotoxin as an apoptotic inducer*. *Toxicol*, 2011. 57(7-8): p. 947-58.
90. Korsnes, M.S., *Yessotoxin as a Tool to Study Induction of Multiple Cell Death Pathways*. *Toxins*, 2012. 4(7): p. 568-579.
91. Fernandez-Araujo, A., Alfonso, A., Vieytes, M., and Botana, L., *Key role of phosphodiesterase 4A (PDE4A) in autophagy triggered by yessotoxin*. *Toxicology*, 2015. 329: p. 60-72.

6. Bibliografía

92. Ronzitti, G., Callegari, F., Malaguti, C., and Rossini, G.P., *Selective disruption of the E-cadherin-catenin system by an algal toxin*. Br J Cancer, 2004. 90(5): p. 1100-7.
93. Korsnes, M.S., Hetland, D.L., Espenes, A., and Aune, T., *Induction of apoptosis by YTX in myoblast cell lines via mitochondrial signalling transduction pathway*. Toxicol In Vitro, 2006. 20(8): p. 1419-26.
94. Korsnes, M.S., Hetland, D.L., Espenes, A., and Aune, T., *Cleavage of tensin during cytoskeleton disruption in YTX-induced apoptosis*. Toxicol In Vitro, 2007. 21(1): p. 9-15.
95. Callegari, F. and Rossini, G.P., *Yessotoxin inhibits the complete degradation of E-cadherin*. Toxicology, 2008. 244(2-3): p. 133-44.
96. de la Rosa, L.A., Alfonso, A., Vilarino, N., Vieytes, M.R., and Botana, L.M., *Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin*. Biochem Pharmacol, 2001. 61(7): p. 827-33.
97. Alfonso, A., de la Rosa, L., Vieytes, M.R., Yasumoto, T., and Botana, L.M., *Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes*. Biochem Pharmacol, 2003. 65(2): p. 193-208.
98. Orsi, C.F., Colombari, B., Callegari, F., Todaro, A.M., Ardizzoni, A., Rossini, G.P., Blasi, E., and Peppoloni, S., *Yessotoxin inhibits phagocytic activity of macrophages*. Toxicon, 2010. 55(2-3): p. 265-73.
99. Korsnes, M.S., Roed, S.S., Tranulis, M.A., Espenes, A., and Christophersen, B., *Yessotoxin triggers ribotoxic stress*. Toxicol In Vitro, 2014. 28(5): p. 975-81.
100. Rubiolo, J.A., Lopez-Alonso, H., Martinez, P., Millan, A., Cagide, E., Vieytes, M.R., Vega, F.V., and Botana, L.M., *Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3*. Cell Signal, 2014. 26(2): p. 419-32.
101. Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U., and Cembella, A., *Azadinium spinosum gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins*. Eur J Phycol, 2009. 44(1): p. 63-79.
102. MCMahon, T. and Silke, J., *Winter toxicity of unknown aetiology in mussels*. Harmful Algae, 1996. 14: p. 2.

103. Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K.J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., and Yasumoto, T., *Azspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, Mytilus edulis*. JACS, 1998. 120(38): p. 9967-9968.
104. James, K.J., Fidalgo Saez, M.J., Furey, A., and Lehane, M., *Azspiracid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption*. Food Addit Contam, 2004. 21(9): p. 879-92.
105. Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., Silke, J., James, K.J., Naoki, H., Oshima, Y., and Yasumoto, T., *Two analogs of azspiracid isolated from mussels, Mytilus edulis, involved in human intoxication in Ireland*. Nat Toxins, 1999. 7(3): p. 99-102.
106. Ofuji, K., Satake, M., McMahon, T., James, K.J., Naoki, H., Oshima, Y., and Yasumoto, T., *Structures of azspiracid analogs, azspiracid-4 and azspiracid-5, causative toxins of azspiracid poisoning in Europe*. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. 65(3): p. 740-2.
107. Díaz Sierra, M., Furey, A., Lehane, M., Magdalena, A.B., and James, K.J. *Detection of six new azspiracids in shellfish using liquid chromatography with multiple tandem mass spectrometry*. in *Xth International Conference on Harmful Algae*. 2002.
108. James, K.J., Sierra, M.D., Lehane, M., Magdalena, A.B., and Furey, A., *Detection of five new hydroxyl analogues of azspiracids in shellfish using multiple tandem mass spectrometry*. Toxicon, 2003. 41(3): p. 277-83.
109. James, K.J., Furey, A., Lehane, M., Ramstad, H., Aune, T., Hovgaard, P., Morris, S., Higman, W., Satake, M., and Yasumoto, T., *First evidence of an extensive northern European distribution of azspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish*. Toxicon, 2002. 40(7): p. 909-915.
110. Magdalena, A.B., Lehane, M., Krys, S., Fernández, M.L., Furey, A., and James, K.J., *The first identification of azspiracids in shellfish from France and Spain*. Toxicon, 2003. 42(1): p. 105-108.
111. Taleb, H., Vale, P., Amanhir, R., Benhadouch, A., Sagou, R., and Chafik, A., *First detection of azspiracids in mussels in North West Africa*. J Shellfish Res, 2006. 25: p. 1067-1070.

6. Bibliografia

112. Lopez-Rivera, A., O'Callaghan, K., Moriarty, M., O'Driscoll, D., Hamilton, B., Lehane, M., James, K.J., and Furey, A., *First evidence of azaspiracids (AZAs): A family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (Argopecten purpuratus) and mussels (Mytilus chilensis) collected in two regions of Chile*. *Toxicon*, 2010. 55(4): p. 692-701.
113. Twiner, M.J., Rehmann, N., Hess, P., and Doucette, G.J., *Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an Emphasis on Human Health Impacts*. *Mar Drugs*, 2008. 6(2): p. 39-72.
114. Klontz, K.C., Abraham, A., Plakas, S.M., and Dickey, R.W., *Mussel-associated azaspiracid intoxication in the United States*. *Ann Intern Med*, 2009. 150(5): p. 361.
115. Furey, A., O'Doherty, S., O'Callaghan, K., Lehane, M., and James, K.J., *Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: toxicological and health considerations*. *Toxicon*, 2010. 56(2): p. 173-90.
116. Furey, A., Magdalena, A.B., Lehane, M., Moroney, C., James, K.J., Satake, M., and Yasumoto, T., *Determination of azaspiracids in shellfish using liquid chromatography/tandem electrospray mass spectrometry*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002. 16(3): p. 238-42.
117. Furey, A., Moroney, C., Magdalena, A.B., Fidalgo Saez, M.J., Lehane, M., and James, K.J., *Geographical, Temporal, and Species Variation of the Polyether Toxins, Azaspiracids, in Shellfish*. *Environ Sci Technol*, 2003. 37(14): p. 3078-3084.
118. Magdalena, A.B., Lehane, M., Moroney, C., Furey, A., and James, K.J., *Food safety implications of the distribution of azaspiracids in the tissue compartments of scallops (Pecten maximus)*. *Food Addit Contam*, 2003. 20(2): p. 154-60.
119. Torgersen, T., Bremnes, N.B., Rundberget, T., and Aune, T., *Structural confirmation and occurrence of azaspiracids in Scandinavian brown crabs (Cancer pagurus)*. *Toxicon*, 2008. 51(1): p. 93-101.
120. Ueoka, R., Ito, A., Izumikawa, M., Maeda, S., Takagi, M., Shin-ya, K., Yoshida, M., van Soest, R.W., and Matsunaga, S., *Isolation of azaspiracid-2 from a marine sponge Echinoclathria sp. as a potent cytotoxin*. *Toxicon*, 2009. 53(6): p. 680-4.

121. Marine Institute, *Azaspiracids. Toxicological evaluation, test methods and identification of the source organisms (ASTOX II). Marine Research Sub-programme*. NDP 2007-13.
122. McMahan and T. Silke, J., *Re-occurrence of winter toxicity*. Harmful Algae News, 1998. 17: p. 12.
123. Ito, E., Terao, K., McMahan, T., Silke, J., and Yasumoto, T., *Acute pathological changes in mice caused by crude extracts of novel toxins isolated from Irish mussels*. Harmful Algae, 1997: p. 588-589.
124. Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., McMahan, T., Silke, J., James, K., and Yasumoto, T., *Small intestinal injuries in mice caused by a new toxin, azaspiracid, isolated from Irish mussels.*, in *Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms*, 2000a. p. 395-398.
125. Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Kurita, N., McMahan, T., James, K., and Yasumoto, T., *Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland*. Toxicon, 2000. 38(7): p. 917-930.
126. Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Higashi, M., Harigaya, K., McMahan, T., and Yasumoto, T., *Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels*. Toxicon, 2002. 40(2): p. 193-203.
127. Ito, E., *Toxicology of Azaspiracid-1*, in *Seafood and Freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. Luis M. Botana, CRC Press, 2008. Boca Ratón. p. 775-784.
128. Twiner, M.J., Hess, P., Bottein Dechraoui, M.Y., McMahan, T., Samons, M.S., Satake, M., Yasumoto, T., Ramsdell, J.S., and Doucette, G.J., *Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines*. Toxicon, 2005. 45(7): p. 891-900.
129. Vale, C., Nicolaou, K.C., Frederick, M.O., Gomez-Limia, B., Alfonso, A., Vieytes, M.R., and Botana, L.M., *Effects of azaspiracid-1, a potent cytotoxic agent, on primary neuronal cultures. A structure-activity relationship study*. J Med Chem, 2007. 50(2): p. 356-63.
130. Vilariño, N., Nicolaou, K.C., Frederick, M.O., Vieytes, M.R., and Botana, L.M., *Irreversible cytoskeletal disarrangement is independent of caspase activation*

6. Bibliografía

- during *in vitro* azaspiracid toxicity in human neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol*, 2007. 74(2): p. 327-335.
131. Vilariño, N., Nicolaou, K.C., Frederick, M.O., Cagide, E., Ares, I.R., Louzao, M.C., Vieytes, M.R., and Botana, L.M., *Cell growth inhibition and actin cytoskeleton disorganization induced by azaspiracid-1 structure-activity studies*. *Chem Res Toxicol*, 2006. 19(11): p. 1459-66.
132. Twiner, M.J., Hanagriff, J.C., Butler, S., Madhkoor, A.K., and Doucette, G.J., *Induction of apoptosis pathways in several cell lines following exposure to the marine algal toxin azaspiracid*. *Chem Res Toxicol*, 2012. 25(7): p. 1493-501.
133. Alfonso, A., Roman, Y., Vieytes, M.R., Ofuji, K., Satake, M., Yasumoto, T., and Botana, L.M., *Azaspiracid-4 inhibits Ca²⁺ entry by stored operated channels in human T lymphocytes*. *Biochem Pharmacol*, 2005. 69(11): p. 1627-36.
134. Bellocci, M., Sala, G.L., Callegari, F., and Rossini, G.P., *Azaspiracid-1 inhibits endocytosis of plasma membrane proteins in epithelial cells*. *Toxicol Sci*, 2010. 117(1): p. 109-21.
135. Twiner, M.J., Doucette, G.J., Rasky, A., Huang, X.P., Roth, B.L., and Sanguinetti, M.C., *Marine algal toxin azaspiracid is an open-state blocker of HERG potassium channels*. *Chem Res Toxicol*, 2012. 25(9): p. 1975-84.
136. Clancy, J., McVicar, A., and Williams, M., *Know your heart*. *Br J Perioper Nurs*, 2001. 11(6): p. 270-7.
137. Pappano, A.J., *El aparato cardiovascular: Elementos de la función cardíaca*, in *Berne y Levy Fisiología*. Bruce M. Koeppen and Bruce A. Stanton, Elsevier, 2009. Barcelona. p. 292-229.
138. Pappano, A.J., *El aparato cardiovascular: Introducción a la circulación*, in *Berne y Levy Fisiología*. Bruce M. Koeppen and Bruce A. Stanton, Elsevier, 2009. Barcelona. p. 289-291.
139. Welsch, U., *Aparato cardiovascular*, in *Histología. I. Sabotta, Johannes Panamericana*, 2008. Madrid. p. 235-258.
140. Welsch, U., *Tejidos*, in *Histología. I. Sabotta, Johannes Panamericana*, 2008. Madrid. p. 85-206.
141. Mangoni, M.E. and Nargeot, J., *Genesis and regulation of the heart automaticity*. *Physiol Rev*, 2008. 88(3): p. 919-82.

142. Bayés De Luna, A., *The Electrical Activity of the Heart*, in *Clinical Electrocardiography*. Wiley-Blackwell, 2012. p. 1-10.
143. Balse, E., Steele, D.F., Abriel, H., Coulombe, A., Fedida, D., and Hatem, S.N., *Dynamic of ion channel expression at the plasma membrane of cardiomyocytes*. *Physiol Rev*, 2012. 92(3): p. 1317-58.
144. Grant, A.O., *Cardiac ion channels*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2009. 2(2): p. 185-94.
145. Pappano, A.J., *El aparato cardiovascular: Regulación del corazón y la vasculatura*, in *Berne y Levy Fisiología*. Bruce M. Koeppen and Bruce A. Stanton, Elsevier, 2009. Barcelona. p. 370-392.
146. Schimmel, K.J., Richel, D.J., van den Brink, R.B., and Guchelaar, H.J., *Cardiotoxicity of cytotoxic drugs*. *Cancer Treat Rev*, 2004. 30(2): p. 181-91.
147. Simkhovich, B.Z., Kleinman, M.T., and Kloner, R.A., *Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 52(9): p. 719-26.
148. Florescu, M., Cinteza, M., and Vinereanu, D., *Chemotherapy-induced Cardiotoxicity*. *Mædica*, 2013. 8(1): p. 59-67.
149. Kockskamper, J., Ahmmed, G.U., Zima, A.V., Sheehan, K.A., Glitsch, H.G., and Blatter, L.A., *Palytoxin disrupts cardiac excitation-contraction coupling through interactions with P-type ion pumps*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 287(2): p. C527-38.
150. James Kang, Y., *Toxic responses of the heart and vascular systems.*, in *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, 2e*. Curtis D. Klaassen and John B. Watkins lii, McGraw Hill Lange, 2001. p. 699-740.
151. Guth, B.D., *Preclinical cardiovascular risk assessment in modern drug development*. *Toxicol Sci*, 2007. 97(1): p. 4-20.
152. Stummann, T.C., Beilmann, M., Duker, G., Dumotier, B., Fredriksson, J.M., Jones, R.L., Hasiwa, M., Kang, Y.J., Mandenius, C.F., Meyer, T., Minotti, G., Valentin, Y.J., Zunkler, B.J., and Bremer, S., *Report and recommendations of the workshop of the European Centre for the Validation of Alternative Methods for Drug-Induced Cardiotoxicity*. *Cardiovasc Toxicol*, 2009. 9(3): p. 107-25.

6. Bibliografia

153. Kettenhofen, R. and Bohlen, H., *Preclinical assessment of cardiac toxicity*. Drug Discov Today, 2008. 13(15-16): p. 702-7.
154. Moller, C. and Witchel, H., *Automated electrophysiology makes the pace for cardiac ion channel safety screening*. Front Pharmacol, 2011. 2: p. 73.
155. Hancox, J.C., McPate, M.J., El Harchi, A., and Zhang, Y.H., *The hERG potassium channel and hERG screening for drug-induced torsades de pointes*. Pharmacol Ther, 2008. 119(2): p. 118-32.
156. Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E., and Keating, M.T., *A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel*. Cell, 1995. 81(2): p. 299-307.
157. Gintant, G.A., Su, Z., Martin, R.L., and Cox, B.F., *Utility of hERG assays as surrogate markers of delayed cardiac repolarization and QT safety*. Toxicol Pathol, 2006. 34(1): p. 81-90.
158. Perry, M., Sanguinetti, M., and Mitcheson, J., *Revealing the structural basis of action of hERG potassium channel activators and blockers*. J Physiol, 2010. 588(Pt 17): p. 3157-67.
159. Priest, B.T., Bell, I.M., and Garcia, M.L., *Role of hERG potassium channel assays in drug development*. Channels (Austin), 2008. 2(2): p. 87-93.
160. EMA, *Guidance on S7B Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals; availability. Notice*. Fed Regist, 2005. 70(202): p. 61133-4.
161. Dennis, A., Wang, L., Wan, X., and Ficker, E., *hERG channel trafficking: novel targets in drug-induced long QT syndrome*. Biochem Soc Trans, 2007. 35(Pt 5): p. 1060-3.
162. Han, S., Zhang, Y., Chen, Q., Duan, Y., Zheng, T., Hu, X., Zhang, Z., and Zhang, L., *Fluconazole inhibits hERG K(+) channel by direct block and disruption of protein trafficking*. Eur J Pharmacol, 2011. 650(1): p. 138-44.
163. Zhou, Z., Gong, Q., Ye, B., Fan, Z., Makielski, J.C., Robertson, G.A., and January, C.T., *Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature*. Biophys J, 1998. 74(1): p. 230-41.
164. Farraj, A.K., Hazari, M.S., and Cascio, W.E., *The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology*. Toxicol Sci, 2011. 121(1): p. 11-30.

165. Parasuraman, S. and Raveendran, R., *Measurement of invasive blood pressure in rats*. J Pharmacol Pharma, 2012. 3(2): p. 172-177.
166. O'Brien, P.J., *Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity*. Toxicology, 2008. 245(3): p. 206-18.
167. Walker, D.B., *Serum chemical biomarkers of cardiac injury for nonclinical safety testing*. Toxicol Pathol, 2006. 34(1): p. 94-104.
168. Martín-Ventura, J.L., Blanco-Colio, L.M., Tuñón, J., Muñoz-García, B., Madrigal-Matute, J., Moreno, J.A., Vega de Céniga, M., and Egido, J., *Biomarcadores en la medicina cardiovascular*. Revista Española de Cardiología, 2009. 62(06): p. 677-688.
169. Mark Richards, A., *Nuevos biomarcadores en la insuficiencia cardiaca: aplicaciones en el diagnóstico, pronóstico y pautas de tratamiento*. Revista Española de Cardiología, 2010. 63(06): p. 635-639.
170. Zile, M.R., Desantis, S.M., Baicu, C.F., Stroud, R.E., Thompson, S.B., McClure, C.D., Mehurg, S.M., and Spinale, F.G., *Plasma biomarkers that reflect determinants of matrix composition identify the presence of left ventricular hypertrophy and diastolic heart failure*. Circ Heart Fail, 2011. 4(3): p. 246-56.
171. O'Brien, P.J., Smith, D.E., Knechtel, T.J., Marchak, M.A., Prumboom-Brees, I., Brees, D.J., Spratt, D.P., Archer, F.J., Butler, P., Potter, A.N., Provost, J.P., Richard, J., Snyder, P.A., and Reagan, W.J., *Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals*. Lab Anim, 2006. 40(2): p. 153-71.
172. Almenar, L.B. and Martínez-Dolz, L., *Péptidos natriuréticos en insuficiencia cardiaca*. Revista Española de Cardiología, 2006. 6(Supl.F): p. 15-26.
173. Fedak, P.W., Verma, S., Weisel, R.D., and Li, R.K., *Cardiac remodeling and failure From molecules to man (Part II)*. Cardiovasc Pathol, 2005. 14(2): p. 49-60.
174. Fedak, P.W., Verma, S., Weisel, R.D., and Li, R.K., *Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part I)*. Cardiovasc Pathol, 2005. 14(1): p. 1-11.
175. Bowers, S.L., Banerjee, I., and Baudino, T.A., *The extracellular matrix: at the center of it all*. J Mol Cell Cardiol, 2010. 48(3): p. 474-82.
176. Brower, G.L., Gardner, J.D., Forman, M.F., Murray, D.B., Voloshenyuk, T., Levick, S.P., and Janicki, J.S., *The relationship between myocardial extracellular matrix*

6. Bibliografía

- remodeling and ventricular function*. Eur J Cardiothorac Surg, 2006. 30(4): p. 604-10.
177. Greaves, P., *Chapter 7 - Cardiovascular System*, in *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies (Fourth Edition)*. Peter Greaves, Academic Press, 2012. Boston. p. 263-324.
178. Anthony, E.W. and John, W.S., *Electron Microscopy*, in *Theory and practice of histological techniques*. John D. Bancroft and Marilyn Gamble, Churchill Livingstone, 2008. p. 601-640.
179. Bancroft, J.D. and Floyd, A.D., *Light Microscopy*, in *Theory and practice of histological techniques*. John D. Bancroft and Marilyn Gamble, Churchill Livingstone, 2008. p. 33-52.
180. Marilyn, G., *The hematoxylin and Eosin*, in *Theory and practice of histological techniques*. John D. Bancroft and Marilyn Gamble, Churchill Livingstone, 2008. p. 121-134.
181. Banegas, J.R., Villar, F., Graciani, A., and Rodríguez, F.A., *Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España*. Revista Española de Cardiología, 2006. 6(Supl.G): p. 3-12.
182. OMS. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. 2015.
183. Templeton, C.B., Poli, M.A., and LeClaire, R.D., *Cardiorespiratory effects of brevetoxin (PbTx-2) in conscious, tethered rats*. Toxicol, 1989. 27(9): p. 1043-9.
184. Frelin, C., Vigne, P., and Breittmayer, J.P., *Mechanism of the cardiotoxic action of palytoxin*. Mol Pharmacol, 1990. 38(6): p. 904-9.
185. Marquais, M. and Sauviat, M.P., *Effect of ciguatoxins on the cardiocirculatory system*. J Soc Biol, 1999. 193(6): p. 495-504.
186. Otero, A., Chapela, M.J., Lago, J., J.M., V., and Cabado, A.G., *Biological activities and potential applications of marine biotoxins*, in *Marine Biomaterials. Characterization, isolation and applications*. Se-Kwon Kim, CRC Press, 2013. Boca Ratón. p. 345-396.
187. Katchman, A.N., Koerner, J., Tosaka, T., Woosley, R.L., and Ebert, S.N., *Comparative evaluation of HERG currents and QT intervals following challenge with suspected torsadogenic and nontorsadogenic drugs*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. 316(3): p. 1098-106.

188. Kemp, C.D. and Conte, J.V., *The pathophysiology of heart failure*. Cardiovasc Pathol, 2012. 21(5): p. 365-71.
189. Aasen, J.A., Espenes, A., Hess, P., and Aune, T., *Sub-lethal dosing of azaspiracid-1 in female NMRI mice*. Toxicon, 2010. 56(8): p. 1419-25.
190. Gustafsson, A.B. and Gottlieb, R.A., *Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection*. J Mol Cell Cardiol, 2008. 44(4): p. 654-61.
191. Gurusamy, N. and Das, D.K., *Autophagy, redox signaling, and ventricular remodeling*. Antioxid Redox Signal, 2009. 11(8): p. 1975-88.
192. Buja, L.M. and Vela, D., *Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart*. Cardiovasc Pathol, 2008. 17(6): p. 349-74.
193. Takemura, G., Kanoh, M., Minatoguchi, S., and Fujiwara, H., *Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart--a critical review from definition and classification of cell death*. Int J Cardiol, 2013. 167(6): p. 2373-86.
194. Miyamoto, S., Rubio, M., and Sussman, M.A., *Nuclear and mitochondrial signalling Akts in cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2009. 82(2): p. 272-85.
195. Nishida, K., Yamaguchi, O., and Otsu, K., *Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease*. Circ Res, 2008. 103(4): p. 343-51.
196. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. 35(4): p. 495-516.
197. Buja, L.M. and Vela, D., *Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart*. Cardiovasc Pathol, 2008. 17(6): p. 349-74.
198. Lee, Y. and Gustafsson, A.B., *Role of apoptosis in cardiovascular disease*. Apoptosis, 2009. 14(4): p. 536-48.
199. Bishopric, N.H., Andreka, P., Slepak, T., and Webster, K.A., *Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte*. Curr Opin Pharmacol, 2001. 1(2): p. 141-50.
200. Dhesi, P., Tehrani, F., Fuess, J., and Schwarz, E.R., *How does the heart (not) die? The role of autophagy in cardiomyocyte homeostasis and cell death*. Heart Fail Rev, 2010. 15(1): p. 15-21.
201. Wesselborg, S. and Stork, B., *Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks*. Cell Mol Life Sci, 2015. 72(24): p. 4721-57.

6. Bibliografía

202. Kolattukudy, P.E. and Niu, J., *Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway*. *Circ Res*, 2012. 110(1): p. 174-89.
203. Alvarez, A.M. and Mukherjee, D., *Liver abnormalities in cardiac diseases and heart failure*. *Int J Angiol*, 2011. 20(3): p. 135-42.
204. Schrier, R.W., Wang, W., Poole, B., and Mitra, A., *Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy*. *J Clin Invest*, 2004. 114(1): p. 5-14.
205. Tonomura, Y., Tsuchiya, N., Torii, M., and Uehara, T., *Evaluation of the usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in rats*. *Toxicology*, 2010. 273(1-3): p. 53-59.
206. Petrovski, G., Das, S., Juhasz, B., Kertesz, A., Tosaki, A., and Das, D.K., *Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. 14(11): p. 2191-200.
207. Groenendyk, J., Sreenivasaiah, P.K., Kim do, H., Agellon, L.B., and Michalak, M., *Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart*. *Circ Res*, 2010. 107(10): p. 1185-97.
208. Malhi, H. and Kaufman, R.J., *Endoplasmic reticulum stress in liver disease*. *J Hepatol*, 2011. 54(4): p. 795-809.
209. Inagi, R., *Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury*. *Nephron Exp Nephrol*, 2009. 112(1): p. e1-9.
210. Lopez, A.M., Rodriguez, J.J., Miron, A.S., Camacho, F.G., and Grima, E.M., *Immunoregulatory potential of marine algal toxins yessotoxin and okadaic acid in mouse T lymphocyte cell line EL-4*. *Toxicol Lett*, 2011. 207(2): p. 167-72.
211. Everds, N.E., Snyder, P.W., Bailey, K.L., Bolon, B., Creasy, D.M., Foley, G.L., Rosol, T.J., and Sellers, T., *Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment*. *Toxicol Pathol*, 2013. 41(4): p. 560-614.
212. Van Kimmenade, R.R. and Januzzi, J.L., Jr., *Emerging biomarkers in heart failure*. *Clin Chem*, 2012. 58(1): p. 127-38.
213. Bettigole, S.E. and Glimcher, L.H., *Endoplasmic reticulum stress in immunity*. *Annu Rev Immunol*, 2015. 33: p. 107-38.

214. Dewi, S., Aune, T., Bunaes, J.A., Smith, A.J., and Larsen, S., *The development of response surface pathway design to reduce animal numbers in toxicity studies*. BMC Pharmacol Toxicol, 2014. 15(1): p. 18.
215. Codex Alimentarius, *Codex Committee on Fish and Fishery Products, Twenty-Eighth Session, Beijing, China, 18–22 September 2006*. Available online: <ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCFFP/ccffp28/fp2806ae.pdf>.
216. Norman, R.E., Carpenter, D.O., Scott, J., Brune, M.N., and Sly, P.D., *Environmental exposures: an underrecognized contribution to noncommunicable diseases*. Rev Environ Health, 2013. 28(1): p. 59-65.

