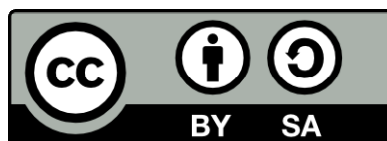




Optimización de ensayos celulares para la detección de toxinas marinas responsables de intoxicaciones alimentarias. Aplicación en extractos lipofílicos de muestras naturales de *Mytilus galloprovincialis*

Elisabet Cañete Ortiz



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartir Igual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartir Igual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

Esta tesis doctoral tiene por objeto el estudio de la aplicabilidad de los cultivos celulares de mamífero como uso de métodos toxicológicos alternativo al uso de métodos establecidos con animales de experimentación en la detección y cuantificación de toxinas marinas responsables de intoxicaciones alimentarias.

En la introducción del trabajo he creído necesario introducir un primer bloque para presentar las intoxicaciones alimentarias causadas por toxinas marinas y definir los principales grupos de toxinas implicadas con su estructura molecular, mecanismo de acción, toxicidad relativa y sintomatología descrita en humanos (punto 1.1). Se dedica también un apartado para localizar la importancia de cada grupo de toxinas a nivel mundial mediante la distribución geográfica de la presencia de estas toxinas (punto 1.2).

Es necesario ubicar también al lector (punto 1.3) sobre la implicación de estos episodios en el sector agroalimentario y los sistemas actuales de regulación y control informando sobre los actuales sistemas de detección ya que éstos deben ser el punto de partida en la optimización de un nuevo método.

Y finalmente, se presenta una pequeña revisión sobre las diferentes variables estudiadas, metodologías y resultados obtenidos en la aplicación de los cultivos celulares en el ámbito de las toxinas marinas (punto 1.4) que sirvieron de base en la estructuración y desarrollo de este trabajo.

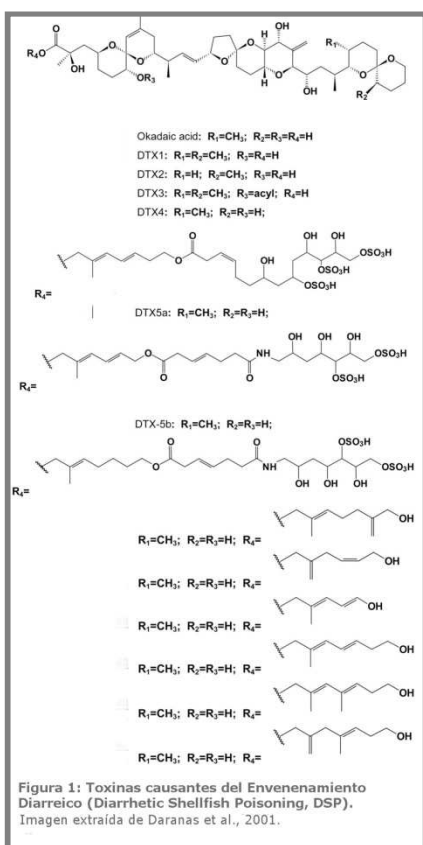
1.1 Generalidades sobre las toxinas marinas de origen fitoplanctónico

Determinadas condiciones ambientales favorecen la proliferación masiva de una especie fitoplanctónica en un momento y lugar determinado. Estas proliferaciones, generalmente inofensivas, pueden resultar nocivas (Harmful Algal Blooms, HABs) por la generación de espumas o mucosidades que provocan mortalidad de organismos marinos por anoxia o bien por su capacidad productora de potentes toxinas. Estas toxinas, producidas principalmente por determinadas especies de

dinoflagelados y diatomeas, se acumulan en organismos filtradores y de éstos pasan a la cadena trófica afectando a una gran variedad de especies. Estas toxinas son bastante termoestables de modo que no son destruidas eficientemente por el procesamiento industrial ni por el cocinado. Son responsables de diferentes fenómenos de intoxicación que se han clasificado en función de la sintomatología (en humanos) y de las toxinas asociadas. Estas intoxicaciones producidas por el consumo de alimentos de origen marino suponen un riesgo para la salud pública y para los sectores económicos implicados.

Toxinas causantes del Envenenamiento Diarreico (Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP)

Las toxinas que provocan el envenenamiento diarreico (Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP) son un grupo de compuestos poliéteres lipofílicos. Las principales



toxinas responsables de las intoxicaciones diarreicas son congéneres entre sí: el ácido okadaico (OA), la dinofisistoxina (DTX)-1 y la DTX-2 (Van Dolah, 2000; Yasumoto, et al., 1978). El OA es un potente y específico inhibidor de fosfatasas Ser/Thr (protein phosphatases; PPs) (Bialojan and Takai, 1988). Actúa principalmente en la PP1 y la PP2A. En base a estudios de toxicidad aguda por vía intraperitoneal (i.p.) en bioensayo ratón (mouse bioassay; MBA), el OA presenta unos niveles de toxicidad en torno a una dosis letal del 50 % de la población (Lethal dose fifty; LD50) de 160-200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Para relacionar el

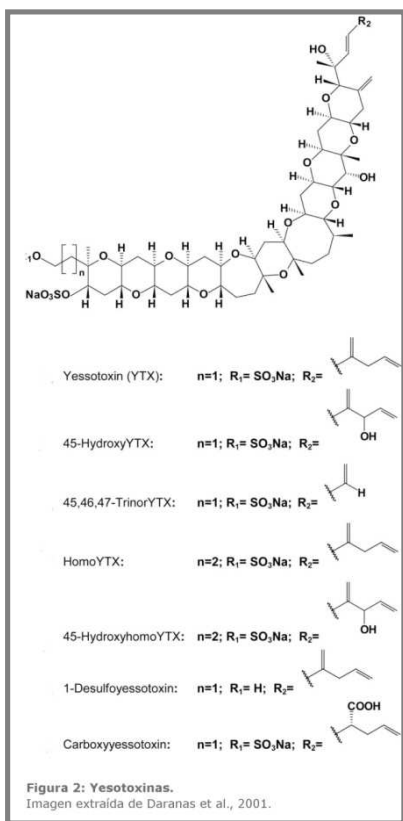
potencial tóxico de otras toxinas con el obtenido para el OA se establecen los siguientes factores de equivalencia tóxica (Toxic equivalent Factors; TEFs) para éste método: OA = 1, DTX-1 = 1, DTX-2 = 0.6 (EFSA, 2008a). El principal síntoma

de intoxicación aguda en humanos es la diarrea acompañada de náuseas, vómitos y dolor abdominal. Los síntomas se pueden presentar hasta los 3 o 4 días después de la ingestión de productos contaminados. No se han descrito muertes por este tipo de intoxicación. También se ha descrito la actividad promotora de tumores (Suganuma et al., 1988) y genotoxicidad (Aonuma et al., 1991).

Las yesotoxinas (YTXs) y las pectenotoxinas (PTXs), fueron tradicionalmente incluidas en el grupo de toxinas DSP ya que al procesar y purificar las muestras para realizar ensayos de toxicidad, éstas aparecían y se extraían junto a toxinas diarreicas, también de naturaleza lipofílica (Murata et al., 1987). Sin embargo, estos dos grupos de toxinas se diferencian de las toxinas diarreicas tanto por su estructura como por su actividad biológica.

Yesotoxinas

Las YTXs y sus análogos son poliéteres cíclicos, no son toxinas diarreicas, y de



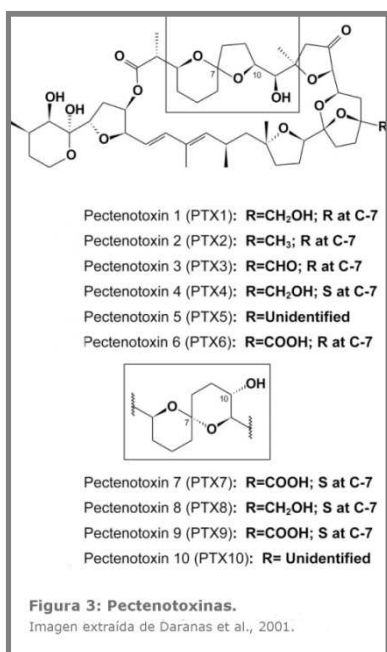
hecho, no hay evidencia clara de que constituyan un riesgo para el ser humano por ingestión. Por una parte, no existen datos epidemiológicos que asocien éstas toxinas a casos de intoxicaciones. Por otra, en roedores la administración oral aguda de hasta 10 mg/kg o administración oral repetida (siete días) de 2 mg/kg por día, no causa ni mortalidad ni signos fuertes de toxicidad (Aune et al., 2002; Tubaro et al., 2003). No obstante, estos animales presentaban alteraciones en células del tejido muscular del miocardio (más pronunciado en zonas cercanas a capilares) por microscopía electrónica.

Respecto al mecanismo de acción y dianas celulares de estas toxinas, hay todavía muchas incógnitas por resolver (Tubaro et al., 2010), aunque se ha descrito la capacidad de las toxinas del tipo YTX a incrementar de

forma directa la actividad de fosfodiesterasas (PDE), concretamente la PDE III, que juega un papel importante en el tejido miocárdico (Alfonso et al., 2003). En base a estudios de toxicidad aguda por inyección intraperitoneal en ratón, se establecen los siguientes TEFs: YTX = 1, 1a-homoYTX = 1, 45-hydroxyYTX = 1 y 45-hydroxy-1a-homoYTX = 0,5 (EFSA, 2008b).

Pectenotoxinas

Las PTXs son compuestos poliéteres cíclicos que en un primer momento fueron clasificados como toxinas diarreas al presentarse en moluscos junto a toxinas del



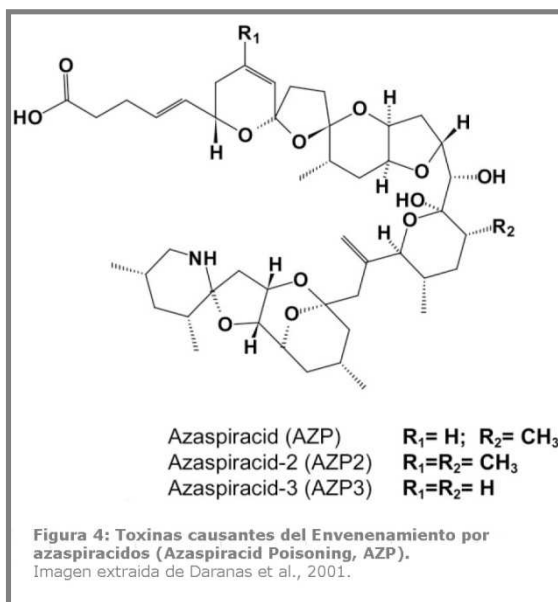
tipo DSP. Estas toxinas se presentan en las mismas especies de dinoflagelados que el OA y sus congéneres (Yasumoto et al., 1985). Existen dificultades metodológicas para el aislamiento completo de estas moléculas y separación de trazas de potentes toxinas diarreas. En estudios de toxicidad aguda en ratón, en los que se utilizaron protocolos de aislamiento de toxinas muy efectivos (Miles et al., 2004), se evidencia que la administración intraperitoneal de PTX-2 purificada

presenta una LD50 de 219 µg/kg, mientras que la administración oral de 5 000 µg/kg no produjo efectos tóxicos en los ratones. Las PTXs purificadas estudiadas (PTX-2 y PTX-2 seco ácido (PTX-2sa)) no causaron diarrea en los animales expuestos. Estudios sobre la toxicidad aguda de la PTX-6 (Ito et al., 2008) demuestran que la dosis letal en ratón por vía intraperitoneal es de 500 µg/kg, mientras que por vía oral no se observaron efectos tóxicos a las dosis estudiadas. Por otro lado, la administración de estas toxinas por vía oral en ratas parece tener mayor efecto tóxico que en ratón (Ito et al., 2008). No se han descrito intoxicaciones en humanos. Las dianas celulares de estas toxinas son aún desconocidas, aunque la evidencia de los estudios realizados hasta el momento

apunta a la implicación en el mantenimiento del citoesqueleto celular, concretamente en la regulación de la polimerización de la actina (Allingham et al., 2007). Por su elevada toxicidad y la constante presencia del compuesto PTX-2 en las microalgas productoras con respecto al resto de las PTXs, se cree que la PTX-2 podría ser el compuesto parental y que otras PTXs podrían formarse a partir de ésta por procesos de metabolización, por ejemplo en los bivalvos (Miles et al., 2004; Sasaki et al., 1997; Suzuki et al., 1998; Suzuki et al., 2001 Yasumoto et al., 1989;). En base a estudios de toxicidad aguda por inyección intraperitoneal en ratón, se establecen unos TEFs de 1 para los analógos: PTX-1, PTX-2, PTX-3, PTX-4, PTX-6 y PTX-11. No se asignan TEFs para los compuestos: PTX-7, PTX-8, PTX-9, PTX-2 sa y 7-epi-PTX2 sa, por presentar toxicidades muy bajas (EFSA, 2009c).

Toxinas causantes del Envenenamiento por azaspirácidos
(Azaspiracid Poisoning, AZP)

Los AZAs al igual que el OA, las DTXs, las YTXs y las PTXs son compuestos poliéter

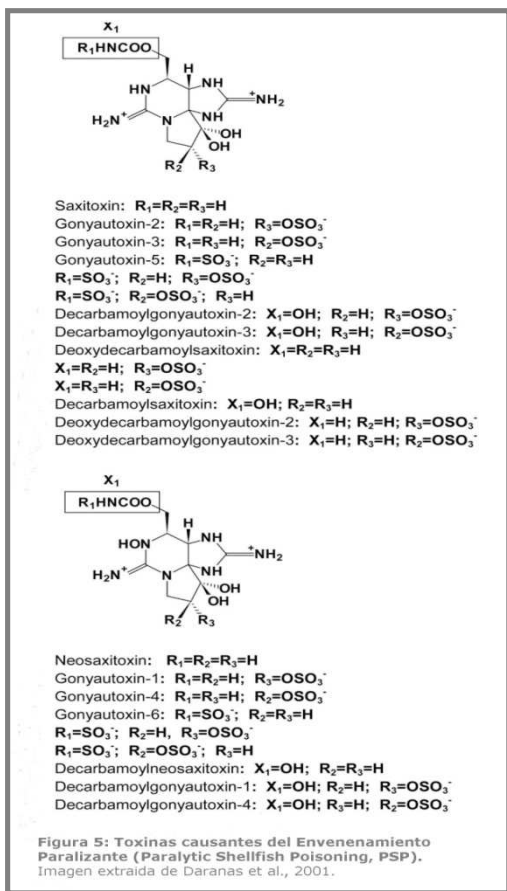


que fueron identificados por primera vez en un episodio tóxico del tipo DSP (Irlanda, 1995) en el que sólo se encontraron trazas de OA y DTXs y una nueva toxina con dos anillos spiro, una amina cíclica y un ácido carboxílico, que posteriormente se denominó Azaspirácido-1 (AZA-1) (Satake et al., 1998). El envenenamiento causado por este tipo de moléculas, que presentaba

un cuadro sintomático diferente al resto de síndromes descritos, pasó a llamarse "Azaspiracid shellfish poisoning" (AZP) (Ofuji et al., 1999). Este tipo de envenenamiento en humanos incluye náuseas, vómitos, diarrea, y dolor de estómago siendo similar al cuadro que se presenta en intoxicaciones del tipo DSP.

Sin embargo, los ratones expuestos por vía intraperitoneal a extractos de este tipo de toxinas, padecen además síntomas del tipo neurotóxico; dificultad respiratoria, espasmos, parálisis progresiva, inflamación de estómago e hígado, reducción en tamaño/peso del timo y bazo, y muerte a los 20-90 minutos a una dosis letal mínima de 150 µg/kg (Twiner et al., 2008). La administración oral de 900 µg/kg en ratón no presentaron signos clínicos de intoxicación después de 24 horas, sin embargo, la autopsia de animales con este tratamiento a 4 horas, revelaba perturbaciones gastrointestinales (Ito, E, 1998). Hasta el momento se han descrito 32 análogos de azaspirácido (Twiner et al., 2008), de los cuales los más importantes en base a la ocurrencia y a la toxicidad son el azaspirácido 1, 2 y 3 (AZA-1, AZA-2 y AZA-3). Son compuestos poliéter. El European Food Safety Authority (EFSA) propone unas relaciones de toxicidad relativa (TEFs) de: AZA-1 = 1, AZA-2 = 1,8, AZA-3 = 1,4, AZA-4 = 0,4 y AZA-5 = 0,2 (en base a estudios con MBA i.p.). Se desconocen aún las dianas moleculares de estas toxinas, pero los estudios sobre el mecanismo de acción se centran de forma prioritaria en el estudio de segundos mensajeros implicados: aumento del calcio y el AMPc intracelular (Alfonso et al., 2005; Alfonso et al., 2006; Román et al., 2002; Román et al., 2004), los efectos de reorganización del citoesqueleto de actina (Ronzitti et al., 2007; Twiner et al., 2005; Vilariño et al., 2006), y efectos en la adhesión intracelular mediante la activación del fraccionamiento de proteínas de adhesión (claudinas y cadherinas) (Hess and Aasen, 2007; Ronzitti et al., 2007).

Toxinas causantes del Envenenamiento Paralizante (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)



Debido a su incidencia mundial y gravedad de los síntomas, éste es uno de los envenenamientos causado por toxinas procedentes de microalgas que ha recibido, tal vez, mayor atención. El envenenamiento paralizante es causado por un grupo de más de 30 potentes neurotoxinas (EFSA, 2009b). Son guanidinas heterocíclicas solubles en agua. En este grupo se encuentra la saxitoxina (STX), que es la más potente de las toxinas conocidas del tipo PSP y sus congéneres: neosaxitoxina (NeoSTX), decarbamoysaxitoxina (dcSTX),

decarbamoylneosaxitoxina (dcNeoSTX), gonyautoxinas (GTX), y sus análogos: decarbamoyl y las toxinas C. Se han establecido TEFs entre los congéneres de la STX y la propia STX (tabla 1) para determinar su toxicidad relativa (EFSA, 2009b).

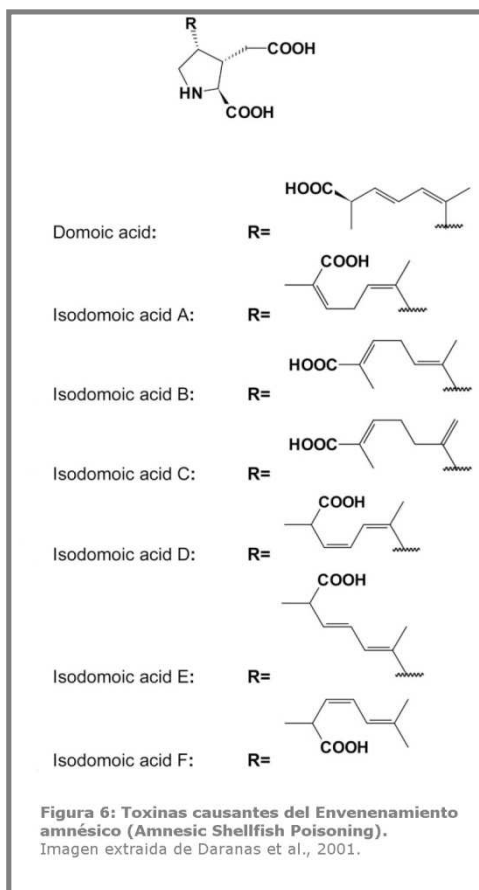
Toxina	TEFs
STX	1.0
NeoSTX	1.0
GTX 1	1.0
GTX 2	0.4
GTX 3	0.6
GTX 4	0.7
GTX 5 (B1)	0.1
GTX 6 (B2)	0.1
C2 (GTX 8)	0.1
C4	0.1
dc-STX	1.0
dc-NeoSTX(GTX-7)	0.4
dc-GTX 2	0.2
dc-GTX-3	0.4
11-hydroxy-STX	0.3

Tabla 1: Toxicity equivalence factors (TEFs) para STX y congéneres.
 Propuesta por el CONTAM Panel en relación a la revisión de diferentes trabajos realizados sobre la toxicidad relativa de estas toxinas (sobre todo por MBA, pero también se incluyen datos de CBA), dando mayor peso a aquellos trabajos que se han realizado recientemente por la calidad de los estándares utilizados y en general por la mejora en la metodología aplicada.

Estas toxinas actúan sobre canales de sodio dependiente de voltaje (voltage gated sodium channels; VGSCs) presentes en las membranas celulares, y con mayor abundancia en las membranas de células neuronales, en la posición 1 del receptor (Catterall et al., 1979; Wang and Wang, 2003). Las STXs y análogos actúan en la cara extracelular de la membrana y bloquean la conductancia del sodio a través del canal (Cestèle and Catterall, 2000). Los VGSCs son responsables de la generación de potenciales de acción en músculo esquelético, sistema nervioso y músculo cardíaco. La alteración de la función de estos canales puede tener como consecuencia importantes desajustes en la excitabilidad de la membrana. Las neurotoxinas bloqueadoras de los canales de sodio, de elevada afinidad, pueden causar: parálisis, problemas respiratorios y muerte. Pueden aparecer también síntomas gastrointestinales, pero es menos frecuente.

Toxinas causantes del Envenenamiento Amnésico (Amnesic Shellfish Poisoning, ASP)

Las toxinas que producen envenenamiento amnésico son el ácido domoico (DA) y sus derivados. El DA pertenece al grupo de los aminoácidos y es un potente neurotransmisor excitador. Los síntomas que produce son tanto gastrointestinales



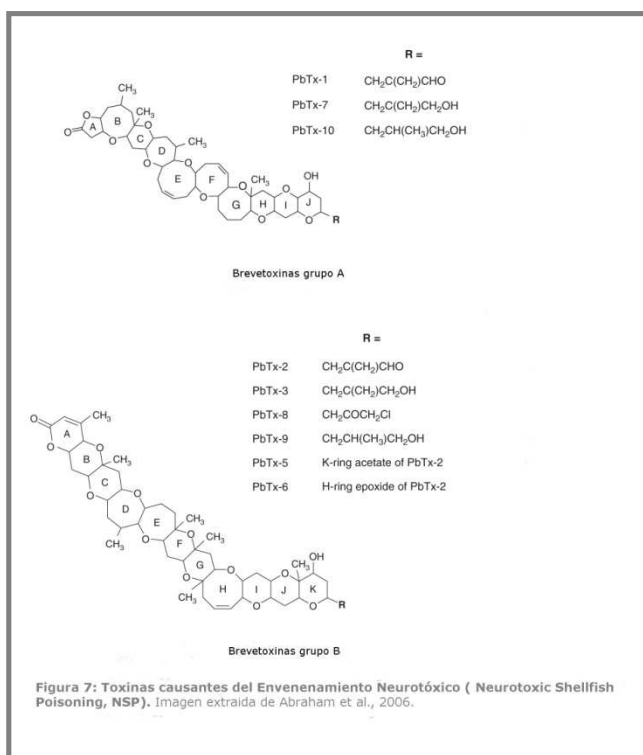
(diarrea, náuseas, vómitos, calambres abdominales) como neurológicos (pérdida de memoria, confusión) que pueden durar hasta 10 días. En intoxicaciones severas, se puede llegar al coma y a la muerte. Se sabe que el DA es un agonista de receptores glutamato. En la intoxicación por DA se sabe que puede haber implicación de receptores glutamato del tipo NMDA (N-metil d-aspartato) y no-NMDA, receptores del tipo AMPA (ácido 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolil) propiónico)-KA (kainato) (Berman and Muray, 1997; Sharp et al., 2003; Van Dolah et al., 1997). El ácido domoico tiene más afinidad por receptores del

tipo no-NMDA (Larm et al., 1997; Qiu et al., 2005). Se sabe también, que la activación de receptores del tipo no-NMDA por el DA puede ser necesaria y suficiente para causar neurodegeneración (Novelli et al., 1992) y que el bloqueo del receptor NMDA no protege totalmente de la neurodegeneración provocada por el DA (Fernández-Sánchez and Novelli, 1993; Novelli et al., 1992). Sin embargo, la activación de receptores NMDA junto a la activación de receptores no-NMDA por DA desencadena una respuesta tóxica muy superior a la obtenida sólo por el DA (Novelli et al., 1992). Los detalles moleculares de la cascada de procesos que se desencadenan tras la activación de receptores glutamato es aún motivo de estudio.

Toxinas causantes del Envenenamiento Neurotóxico

(Neurotoxic Shellfish Poisoning, NSP)

El principal grupo de neurotoxinas que producen el NSP son las brevetoxinas (PbTx). Las PbTx son compuestos poliéteres cíclicos, liposolubles y estables en pH ácido que se agruparon en dos grupos A y B, según su estructura (Lin et al., 1981; Shimizu et al., 1986). Las principales toxinas del tipo B son la PbTx-2 y la PbTx-3,



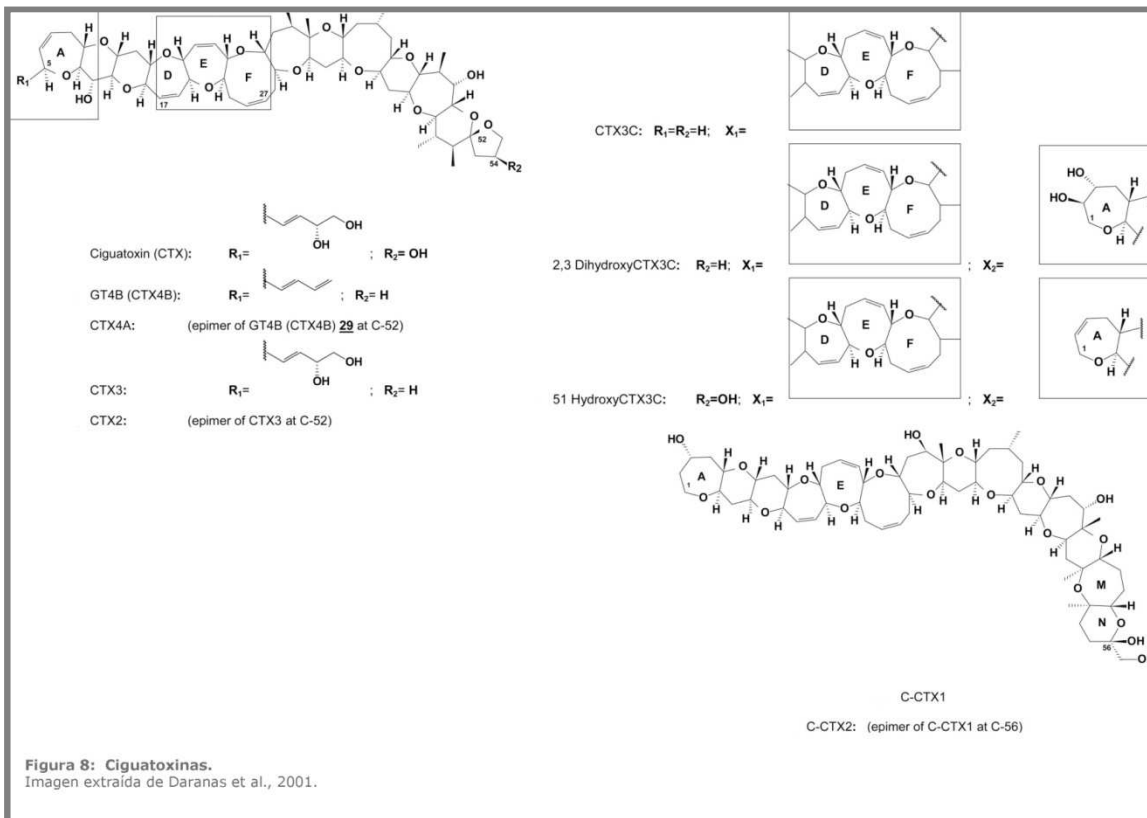
siendo la PbTx-2 la más abundante de las brevetoxinas, mientras que en el grupo A las principales toxinas son la PbTx-1 y la PbTx-7, en este grupo se encuentra la más potente, la PbTx-1 (Landsberg, 2002). Este grupo de toxinas interaccionan con la posición 5 de la subunidad α del VGSC (Caterall and Garnier, 1985; Poli et al., 1987), esta unión provoca prolongación del

tiempo de apertura del canal, cambio en el potencial de acción a valores más positivos, inhibición de la inactivación del canal e inducción de estados de subconductancia (Jeglitsch et al., 1998). Son potentes toxinas activadoras de VGSCs.

Los principales síntomas causados por el envenenamiento neurotóxico incluyen síntomas gastrointestinales (nauseas, vómitos, diarreas) y neurológicos (parestesia, mialgia, ataxia, vértigo, convulsiones).

Toxinas causantes de la Ciguatera (CFP: Ciguatera Fish Poisoning)

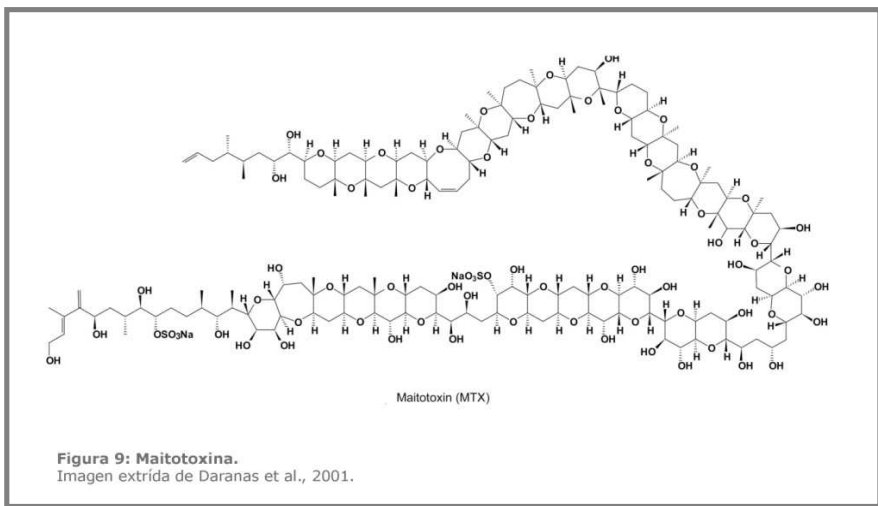
Este síndrome tóxico esencialmente de zonas tropicales y subtropicales va asociado al consumo de pescado contaminado por gambiertoxinas, toxinas producidas



principalmente por diferentes especies de la microalga bentónica Gambierdiscus (por ejemplo *G. toxicus*), que se acumulan en pescado (vía cadena trófica). Las principales toxinas producidas por esta especie son las del tipo ciguatoxina (CTX), gambierol y maitotoxina (MTX).

Las CTXs, consideradas responsables de causar los síntomas tóxicos, son moléculas de naturaleza química y actividad biológica similar a las PbTx. Son compuestos poliéter cíclicos, liposolubles que actúan en la posición 5 de la subunidad α del VGSC (Bottein Dechraoui et al., 1999; Lombet et al., 1987) siendo, al igual que las brevetoxinas, toxinas activadoras de VGSCs.

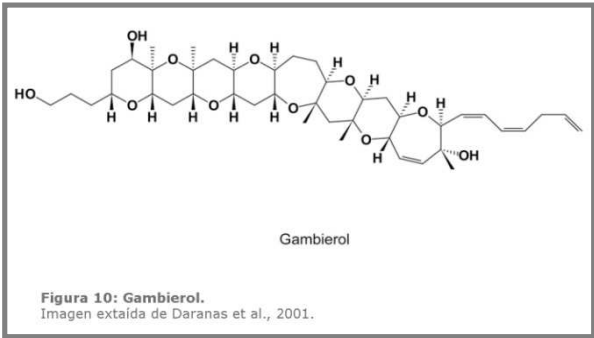
La MTX es un poliéter activador de diferentes tipos de canales de calcio (Gusovsky and Daly, 1990; Wisnoskey et al., 2004). Es una potente toxina muy soluble en



agua y con poca tendencia a acumularse en tejidos, por ello no tiene un papel importante en el síndrome tóxico.

El gambierol es también un poliéter cíclico que bloquea el canal de potasio dependiente de voltaje (VGPC) (Cuypers et al., 2008). Por sus características, se estudia la posibilidad de que participe en el síndrome tóxico además de ser un potente antifúngico (Caillaud et al., 2010).

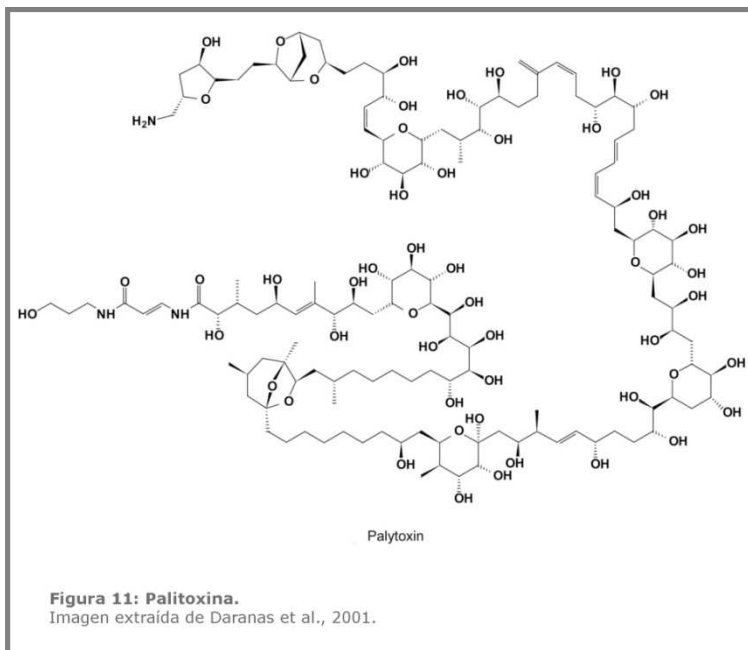
Los principales síntomas de la ciguatera son desordenes gastrointestinales (diarrea, nauseas, vómito) y eventualmente distress cardiovascular y neurológico, la sintomatología es altamente variable entre individuos y entre zonas.



Palitoxina

La palitoxina (PITX) es una de las ficotoxinas más potentes que existen. Es una molécula de 115 átomos de carbono, parcialmente insaturada (Cha et al., 1982). La PITX afecta al equilibrio iónico celular, incrementando la permeabilidad celular a iones Na⁺, K⁺ pero no para el Ca²⁺. Tras encontrar que la ouabaina, inhibidor de la bomba sodio-potasio (Na⁺/K⁺-ATPasa), antagonizaba el efecto tóxico de la PITX en eritrocitos (Habermann and Chhatwal, 1982), se postuló la hipótesis de que estas bombas eran la diana de la PITX, lo que más tarde fue confirmado por otros grupos

de investigación (Hirsh and Wu, 1997; Scheiner-Bobis, 1994). La PITX se comporta como un (ant) agonista parcial, ya que es un agonista al provocar la transformación de la proteína que forma la bomba en un poro y en consecuencia favorece el flujo



iónico a favor de gradiente y por otro lado a elevadas concentraciones actúa como un antagonista, inhibiendo la enzima Na^+/K^+ -ATPasa (Habermann, 1989), de forma similar a la ouabaina. Sin embargo,

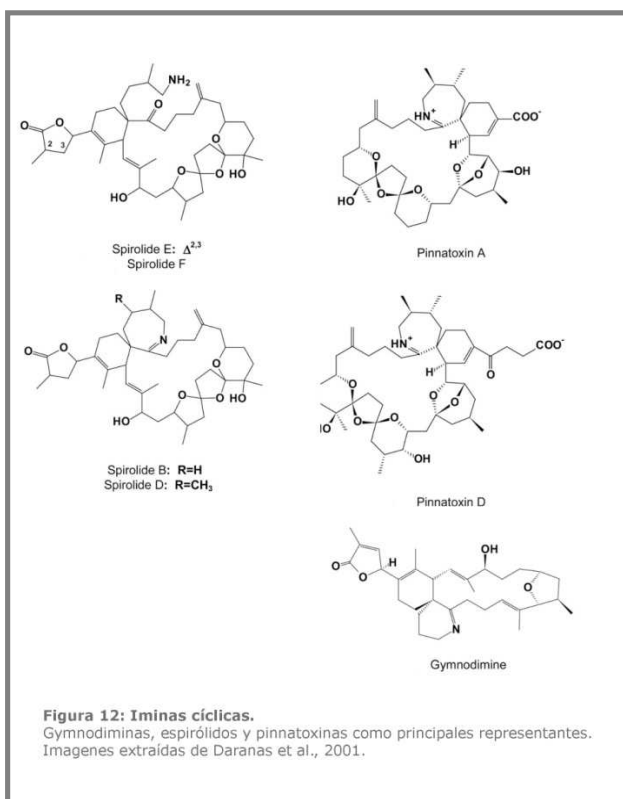
el potente efecto tóxico de la PITX parece no ser explicado por su efecto sobre la Na^+/K^+ -ATPasa (Frelin and Van Renterghem, 1995; Scheiner-Bobis et al., 2002), siendo aún desconocidas las dianas celulares de esta toxina. Los principales síntomas descritos en intoxicaciones alimentarias son: náuseas, vómitos, un sabor intenso metálico o amargo, calambres abdominales, diarrea severa, espasmos musculares, inestabilidad de la presión arterial, hemólisis y dolor respiratorio. La presencia de estas toxinas en aerosoles ha sido relacionada con intoxicaciones respiratorias cuyos síntomas principales son: fiebre, catarro, dolor muscular, irritación de las vías respiratorias y en algunos casos irritaciones en la piel (Riobó, 2008). La aparición de los síntomas es rápida y puede ocasionar la muerte a los pocos minutos de la exposición.

Los datos sobre intoxicaciones alimentarias causadas por este grupo de toxinas son muy escasos. Se han confirmado casos en Madagascar en el año 1994 (Onuma et al., 1999), Japón en el año 2000 (Taniyama et al., 2003) y se sospecha de otros casos esporádicos en Japón (Riobó, 2008). Se relacionan también a episodios de intoxicaciones respiratorias con la presencia de esta toxina en Italia en 2005

(Ciminiello et al., 2006) y en agosto de 2004 en la costa catalana (Llavaneres) por la elevada concentración de microalgas productoras de estas toxinas en ese momento en la costa.

Iminas cíclicas

Este grupo emergente de toxinas entre las que se encuentran las gymnodiminas, espirólidos, pinnatoxinas como principales representantes, también son llamadas "fast acting toxins" o toxinas de acción rápida por la rapidez de sus efectos. Contienen un grupo espiro y función imina, que parecen ser la causa de su



toxicidad (Stewart et al., 1997).

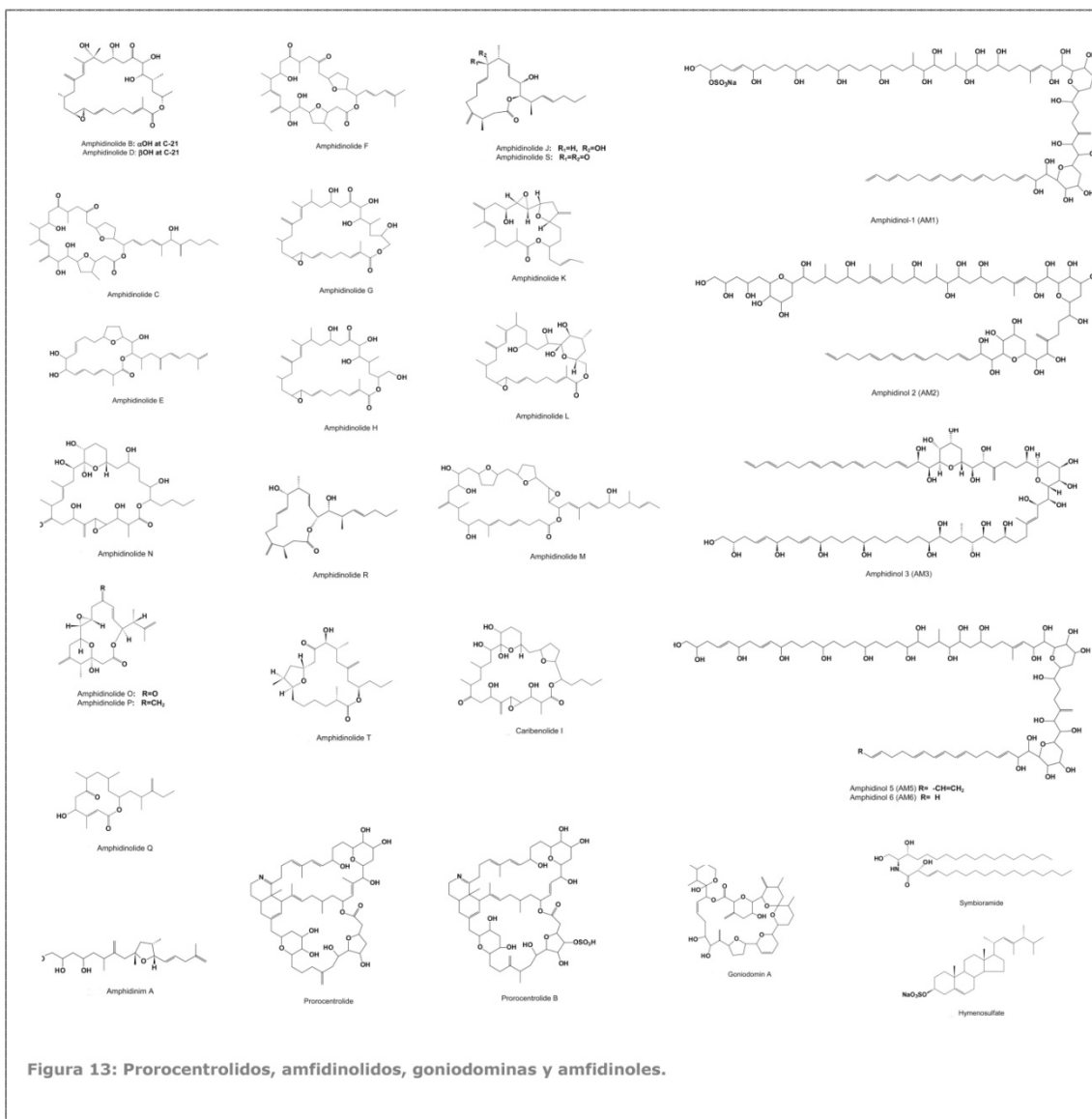
Las dianas celulares de estos compuestos son aún desconocidas, aunque hay hipótesis que apuntan hacia receptores nicotínicos, y muscarínicos (Gill et al., 2003). La toxicidad de estos compuestos en humanos aún no ha sido demostrada. En MBA i.p., se han obtenido toxicidades (LD50s) en torno a 79-118 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en extractos purificados de gymnodimina (Munday et al., 2004), de hasta

6,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en algunos análogos de espirólidos (Botana, 2008) y de hasta 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en pinnatoxinas (Uemura, 1995). Estudios de toxicidad en MBA muestran que tanto la gymnodimina como espirólidos producen mucha menor toxicidad si la administración es por vía oral (Munday et al., 2004; Munday, 2008a). Inhibidores de la colinesterasa, protegen a los ratones de la toxicidad de gymnodimina administrada por vía intraperitoneal (Munday et al., 2004). Los ratones intoxicados con concentraciones letales mueren antes de los 30 minutos después de la

administración y presentan hiperactividad seguida de parálisis y distrés respiratorio en gymnodiminas y letargia, descoordinación motora y problemas respiratorios en espirólidos (Munday, 2008a).

Otras ficotoxinas

El mecanismo de acción y la actividad biológica de las ficotoxinas son por lo tanto muy diversos. Cabe igualmente señalar que además de las toxinas que pertenecen



a los grupos anteriormente mencionados, existen otras toxinas procedentes de microalgas de naturaleza química similar, como otras toxinas poliéter (al igual que el OA o las PbTx) como los procentrolidos, amfidinolidos, goniominas o

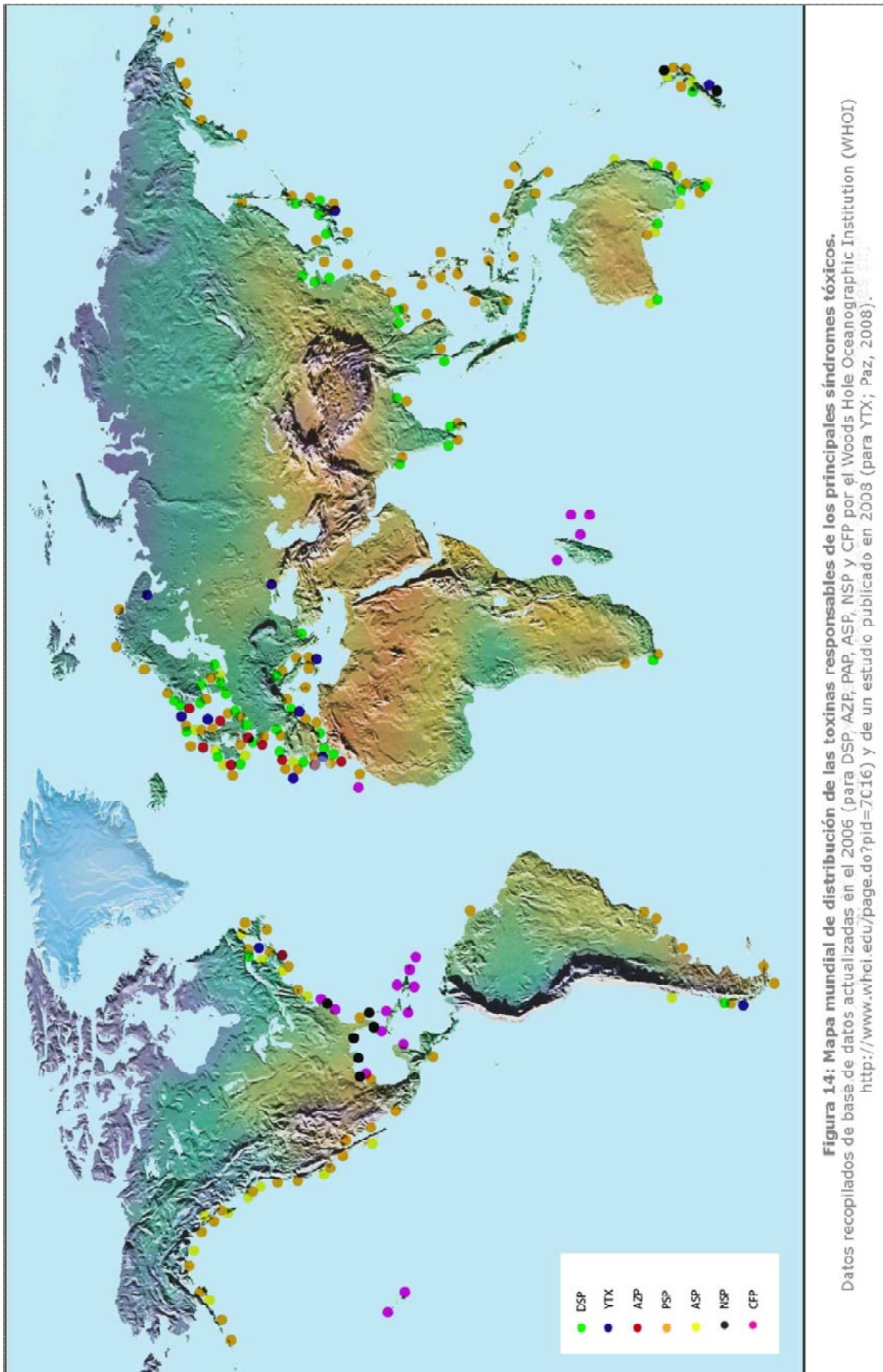
amfidinoles de las que se conocen algunas propiedades, como es el caso de algunos amfidinólidos y goniominas que afectan a las funciones de la actina y miosina (Matsunaga et al., 1999), o bien propiedades antifúngicas y hemolíticas en el caso de algunos amfidinoles (Echigoya et al., 2005).

Otro ejemplo son las toxinas producidas por cianobacterias, como es el caso de algunas hepatotoxinas (microcistinas y nodularinas) y neurotoxinas (anatoxinas) que no se encuentran restringidas a aguas dulces y se pueden encontrar también en aguas salobres (estuarios y marismas).

El continuo descubrimiento de nuevas moléculas tóxicas producidas por microalgas y el desconocimiento sobre muchos de los mecanismos de acción de estas toxinas hacen que la descripción y clasificación de este tipo de toxinas se encuentre en continua modificación.

1.2 Distribución geográfica

En la figura 14 se muestran los puntos geográficos donde se han detectado incidencias de floraciones algales de especies causantes de los principales síndromes tóxicos o bien presencia de las toxinas en moluscos, recogida de bases de datos actualizadas en el 2006 (para DSP, AZP, PSP, ASP, NSP y CFP por el Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI)(<http://www.whoi.edu/page.do?pid=7016>) y de un estudio publicado en 2008 (para YTX; Paz et al., 2008). Esta distribución geográfica está muy relacionada con la intensidad de los análisis que se realizan en cada zona. Es decir, la estimación de la presencia de floraciones de microalgas tóxicas está sesgada por el esfuerzo invertido en cada zona para el estudio y control de las mismas.



1.3 Problemática de las toxinas marinas en el ámbito agroalimentario

El paso de toxinas desde los organismos productores (microalgas) a otros organismos marinos a través de las redes tróficas, produce gradualmente la contaminación de estos organismos superiores generándose dos fenómenos: por una parte, la posible acumulación de toxinas en tejidos, y por otra, la transformación de moléculas (reduciéndose o aumentándose su potencial tóxico) por metabolismo del propio organismo acumulador.

La acumulación de toxinas procedentes de microalgas tóxicas en alimentos de origen marino, sobretodo en moluscos, pero también en peces de zonas tropicales y sub-tropicales (p.e. ciguatera), supone un riesgo para la salud pública y para los sectores económicos implicados. Con el objeto de proteger a la salud pública y gestionar las zonas de producción, se implantan programas de seguimiento de microalgas potencialmente tóxicas y sistemas de control de la presencia de ficotoxinas en aquellos alimentos que pueden ser los principales vectores de transmisión.

1.3.1 Sistemas de detección y cuantificación en alimentos. Legislación vigente

Tradicionalmente, el sistema de detección de toxinas marinas en alimentos de origen marino se ha realizado mediante métodos de bioensayo que utilizan ratones o ratas (con menor frecuencia) para evaluar la toxicidad de una muestra. Estos métodos a pesar de ser inespecíficos, dar problemas de falsos resultados y ser métodos en proceso de eliminación o reducción por motivos éticos, son los que habían demostrado ofrecer un mayor nivel de protección del consumidor debido al desconocimiento de la totalidad de las toxinas que pueden poner en peligro la salud pública.

Diferentes países han establecido regulaciones en seguridad alimentaria que proveen guías para el control de moluscos contaminados por toxinas de origen fitoplanctónico, en función de eventos tóxicos en sus costas o bien siguiendo

legislaciones de otros países. En la actualidad, las regulaciones emitidas por la Unión Europea y por el Interstate Shellfish Sanitation Conference (ISSC), son las de mayor importancia y seguimiento por el resto de países que desean exportar productos hacia zonas reguladas por dichas legislaciones. Los países pueden tener legislación sobre toxinas lipofílicas, toxinas PSP, NSP o ASP, o bien para todas ellas. En 2004 se realizó un encuentro para la consulta a expertos en Oslo (Noruega), con la intención de consensuar y dar respuestas científicas a las siguientes preguntas formuladas por el Codex Committee on Fish & Fishery Products (CCFFP):

- Proporcionar al CCFFP recomendaciones científicas para ser capaces de establecer niveles máximos de toxinas marinas en alimentos de origen marino.
- Proporcionar orientación en los métodos de análisis para cada grupo de toxinas.
- Proporcionar orientación en el monitoreo de fitoplancton tóxico y bivalvos (incluyendo muestreo y metodología).
- Proporcionar información sobre la distribución geográfica de fitoplancton tóxico.

Como resultado del encuentro se publicó, con la colaboración de la Food and Agriculture Organization (FAO), la World Health Organization (WHO) y el International Oceanographic Commission of UNESCO (IOC) el Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs (FAO/IOC/WHO, 2004). En base a estas recomendaciones el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo establecen normas específicas sobre los métodos de detección (Regulation (EC) 2074/2005) y los límites (Regulation (EC) 853/2004) de toxinas marinas lipofílicas, toxinas PSP y ASP en productos alimentarios procedentes de la pesca. Recientemente se publicó una nueva norma (Regulation (EC) 15/2011) que modifica levemente la norma específica sobre métodos de detección (Regulación (EC) 2074/2005).

Los métodos de detección propuestos por el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo son siempre métodos validados. Los niveles establecidos se basan en la concentración máxima de biotoxina admitida en tejido, ya sea en vianda entera como en cualquiera de las partes por separado.

En el caso de las toxinas paralizantes, el contenido en las partes comestibles de moluscos (vianda entera o cualquier parte de forma separada), según la norma descrita, deberá ser detectado por el método de análisis biológico o cualquier otro método reconocido internacionalmente, siendo el método de HPLC de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (en la sigla inglesa, AOAC), nombrado método de Lawrence, el otro método oficialmente prescrito en la UE para detectar este grupo de toxinas. Se aconseja además, que en caso necesario se utilice un método asociado al bioensayo para la detección de saxitoxina y cualquiera de sus análogos para el que exista un estándar, pero que en caso de discrepancia de resultados, el método de referencia es el método biológico. El nivel establecido para las toxinas PSP es de 800 µg de equivalentes de STX/kg.

En el caso de las toxinas amnésicas, la detección de DA en moluscos (vianda entera o cualquier parte de forma separada), según la norma descrita, deberá realizarse mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cualquier otro método reconocido, pero en caso de discrepancia el método de referencia deberá ser el método HPLC. El nivel establecido para las toxinas ASP es de 20 mg de DA/kg.

En el caso de las toxinas lipofílicas, se contempla la necesidad de detectar la presencia de OA, DTX-1, DTX-2 y DTX-3 (incluyendo sus ésteres), PTX-1 y PTX-2; YTX, 45 OH YTX, homo YTX y 45 OH homo YTX; AZA-1, AZA-2 y AZA-3; y para ello deberá utilizarse, en un futuro, el método de cromatografía líquida y espectrometría de masas (EU-RL LC-MS/MS) como método de referencia, aunque hasta el 31 de diciembre de 2014 se pueden seguir empleando los métodos biológicos que se habían empleando hasta el momento (Regulación (EU) 15/2011). Con el método cromatográfico como método de referencia, se establece la necesidad de calcular una toxicidad total utilizando los factores de toxicidad equivalente (TEFs). Los diferentes procedimientos de bioensayo en ratones que difieren en el tipo de tejido utilizado para hacer la extracción (hepatopáncreas o vianda entera) y en los disolventes utilizados en las fases de extracción y purificación. El reglamento exige

que se tenga en cuenta el método utilizado a fin de incluir la gama de toxinas que se deben detectar. Los métodos biológicos reconocidos para la detección de toxinas lipofílicas son:

- Para la detección del OA, DTXs, PTXs y YTXs se puede utilizar un único ensayo en ratones a partir de una extracción con acetona que puede complementarse con partición líquido-líquido con acetato de etilo y agua o diclorometano y agua para eliminar posibles interferencias. A efectos del reglamento, la detección de AZAs mediante este procedimiento requiere la utilización del cuerpo entero como porción de ensayo. En cada ensayo deben utilizarse tres ratones. La muerte de dos de los tres ratones en un período de 24 horas tras la inoculación, en cada uno de ellos, de un extracto equivalente a 5 g de hepatopáncreas o 25 g de vianda entera. Se considerará un resultado positivo con respecto a la presencia de una o más de las toxinas contempladas a niveles superiores a los establecidos.
- Para la detección de OA, DTXs, PTXs y AZAs, puede emplearse un bioensayo en ratones con extracción acetónica seguido de separación líquido-líquido con éter dietílico, pero no podrá ser utilizado para la detección de YTXs, ya que pueden ser eliminadas durante la fase de separación. En cada ensayo deben utilizarse tres ratones. La muerte de dos de los tres ratones en un período de 24 horas tras la inoculación de 5 g de hepatopáncreas o 25 g de vianda entera, se considerará un resultado positivo con respecto a la presencia de una o más de las toxinas contempladas a niveles superiores a los establecidos.
- Para la detección del OA, DTXs y AZAs puede utilizarse el bioensayo en ratas. En cada ensayo deben utilizarse tres ratas. Una reacción diarreica en cualquiera de las tres ratas se considerará un resultado positivo según los niveles establecidos para estas toxinas.

Como métodos de detección alternativos o complementarios al EU-RL LC-MS/MS, el reglamento permite la utilización de HPLC con detección fluorimétrica, la cromatografía líquida (LC), la espectrometría de masa (MS), los inmunoensayos y

los ensayos funcionales como el de la inhibición de fosfatasas. La condición necesaria para poder utilizar uno de estos métodos es que sus características de resolución se deben definir después de ser validados conforme a un protocolo acordado a nivel internacional. En estos métodos, se marca la necesidad de detección de OA, DTXs (recomiendan hacer hidrólisis para detectar DTX-3), PTX-1, PTX-2, YTX, 45-OHYTX, HomoYTX y 45-OH-Homo YTX, AZA-1, AZA-2 y AZA-3. La norma también remarca que en el caso de ser descubiertos nuevos análogos importantes en relación con la salud pública, habría que incluirlos en el análisis. El cálculo de la toxicidad total se calculará mediante factores de conversión basados en los datos sobre la toxicidad de cada toxina. Los niveles establecidos para estas toxinas son: para OA, DTXs y PTXs juntas, 160 µg de OA equivalentes/kg; para YTXs, 1 mg de YTX equivalente/kg; para AZAs, 160 µg de AZA-1 equivalentes/kg. Estudios posteriores a la publicación de las normas específicas del 2004, dan como resultado la publicación de opiniones científicas por la EFSA en las que se recomienda cambiar los límites de aceptación de toxinas en bivalvos por: 45, 120, 3750, 30 y 75 µg/kg para los grupos relacionados al OA, PTX, YTX, AZA y STX, respectivamente (EFSA, 2008a, 2008b, 2009a, 2009b, 2009c).

1.3.2 Métodos alternativos al bioensayo ratón en el ámbito de la detección de biotoxinas marinas

Debido a razones éticas, prácticas y legales, es necesario el reemplazamiento del uso de animales de experimentación en la detección de biotoxinas marinas en productos alimentarios. La utilización de métodos como la cromatografía líquida (LC), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorimétrica o la espectrometría de masa (MS), son métodos que permiten dar datos analíticos muy fiables sobre la cuantificación de toxinas concretas en matrices complejas, basándose en sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, debido a la escasez de estándares y material de referencia para cada una de las toxinas conocidas, además del continuo descubrimiento de nuevas moléculas responsables de

episodios tóxicos, es necesario el poder combinar este tipo de métodos con otros que permitan evaluar la actividad biológica de los compuestos para detectar efectos tóxicos de una muestra problema.

Teniendo en cuenta los mecanismos de acción de las ficotoxinas se han elaborado métodos funcionales que se basan en la capacidad de estos agentes bioactivos a unirse a un componente molecular que selectivamente reconoce la estructura de la molécula y se comporta como su receptor. Esta unión ligando-receptor, en organismos sensibles a las toxinas, desencadenará una cascada de reacciones que finalizará en la respuesta tóxica al componente. Los métodos funcionales pueden basarse en la detección de esos cambios en diferentes fases del proceso (Rossini, 2005). En este grupo de métodos podemos diferenciar entre:

- Ensayos que permiten detectar un efecto tóxico concreto.
- Ensayos que permiten evaluar diferentes efectos tóxicos.
- Ensayos mixtos que permiten obtener a la vez información concreta sobre un determinado efecto tóxico y que a su vez permiten dar un valor general de toxicidad en el sistema estudiado.

1.4 Utilización de los CBAs en el ámbito de las toxinas marinas

Debido a cuestiones éticas y metodológicas parece clara la substitución de los métodos que utilizan animales de experimentación, en los controles rutinarios sobre el contenido de toxinas marinas de los productos de origen alimentario, por métodos analíticos más precisos. Sin embargo, el MBA aún se mantiene en vigor debido a la confianza que supone el mantener un método toxicológico frente a la presencia de posibles toxinas aún no descritas ni reguladas. Por este motivo, la optimización de métodos toxicológicos fiables que no supongan conflictos éticos utilizados como apoyo al análisis químico de los compuestos puede ser la solución a este dilema. De esta manera, la presente tesis propone un profundo trabajo experimental respecto al desarrollo de CBAs como posibles métodos toxicológicos de apoyo ante la posible eliminación de los MBAs.

En el ámbito de las toxinas marinas se han utilizado una gran variedad metodologías basadas en la utilización de cultivos celulares in vitro (Cell-based assays; CBAs), tanto para el estudio de mecanismos de acción como para su uso como herramienta toxicológica en la determinación de los potenciales tóxicos de las mismas.

1.4.1 Tipos celulares utilizados

La toxicidad de las toxinas marinas ha sido estudiada mediante la utilización de cultivos primarios de células y cultivos de líneas estables.

Los cultivos primarios, en general, ofrecen una mayor sensibilidad a las toxinas tal y como sostiene en su estudio Le Page (LePage et al., 2005) y posiblemente mayor correspondencia con el efecto que tendrán las toxinas en las células de organismos vivos intoxicados. Las líneas celulares de cultivos estables pueden acumular, a lo largo de los numerosos pasajes, mayor número de alteraciones genéticas que pueden tener como consecuencia modelos celulares algo alejados de las células originales. Sin embargo, los cultivos primarios ofrecen mayor complejidad en el desarrollo de la técnica, mayor variabilidad en la repetición de los ensayos y supone un mayor número de sacrificio de animales.

En relación a los mecanismos de acción conocidos de las toxinas marinas, los tipos celulares presentaran mayor o menor sensibilidad a las toxinas en función de cómo se expresen las dianas celulares o las moléculas implicadas en la respuesta celular tóxica.

En líneas celulares estables se aplican muchas veces protocolos de diferenciación celular a efectos de favorecer la expresión de moléculas propias del tejido al que pertenece, obteniendo en algunos casos mayor sensibilidad al efecto tóxico de toxinas marinas (Dakshinamurti et al., 2003) y posibilidad de estudio de las toxinas en estructuras celulares propias de células diferenciadas (Molgó et al., 1993).

Los tipos celulares neuronales, son los más utilizados en los estudios de toxicidad de toxinas marinas ya que muchas de ellas son de naturaleza neurotóxica al actuar

sobre VGSCs (PSPs, NSPs y CTXs), receptores glutamato (el grupo del DA). Igualmente, algunas de ellas son sospechosas de participar en la modulación de otros canales iónicos básicos en la regulación neuronal (p.ej. toxinas del tipo gambierol, PITX e iminas cíclicas).

1.4.2 Variables en la evaluación de la toxicidad

En el estudio del mecanismo de acción y potencial tóxico de estas toxinas, se han utilizado una infinidad de técnicas tanto en cultivos celulares primarios como en líneas celulares estables (Alfonso and Alfonso, 2008; Dickey, 2008; Doucette and Tasker, 2008; Louzao et al., 2008; Munday, 2008b, 2008a; Ryan et al., 2008; Tubaro et al., 2008; Vilariño and Espiña, 2008). Sin embargo, sólo algunas de esas técnicas han sido propuestas o utilizadas como métodos de detección y cuantificación de los efectos tóxicos de estas toxinas:

Podemos diferenciar dos grandes grupos de técnicas utilizadas en la optimización de CBA en líneas celulares estables: aquellas que se basan en determinar la viabilidad celular tras la exposición a las toxinas y aquellas que tratan de evaluar un efecto tóxico subletal.

1.4.2.1 Variables en la evaluación de la viabilidad

Este grupo de técnicas permiten la obtención de valores de toxicidad inespecífica en organismos vivos. Entre estas técnicas, las más utilizadas en este área tratan de la descripción de efectos tóxicos de toxinas marinas mediante la observación morfológica de las células (Aune et al., 1991; Croci et al., 2001; Diogène et al., 1995; Fessard, 1994; Fladmark et al., 1998; Hamano et al., 1985; kogure et al., 1988; Pouchus et al., 1997), la evaluación de la integridad de las membranas celulares como el ensayo del Rojo Neutro (Fessard et al, 1994), Cristal de Violeta (Jellet et al.,1992), Fluoresceína diacetato y Bromuro de Etidio (Fernández et al., 1991; The marine); alteraciones del citoesqueleto tales como la despolimerización o reorganización de filamentos de actina (Leira et al., 2000; Leira et al., 2003);

alteraciones en la actividad enzimática celular como el ensayo MTT (Fairey et al., 1997; Flanagan et al., 2001; Katsuo et al., 2007; Ledreux et al., 2009; Manger et al., 1993b; Manger et al., 1995; Manger et al., 1996; Manger, 1993; Truman and Lake, 1996; Tubaro et al., 1996a; Tubaro et al., 1996b), MTS (Okumura et al., 2005), WTS-8 (Hayashi et al., 2006), ensayo de la actividad lactato deshidrogenasa (Bellocci et al., 2008; Sheridan, 2005); o bien medidas de la activación de vías apoptóticas (Dragunow et al., 2005).

1.4.2.2 Variables en la identificación de efectos tóxicos subletales

Este grupo de técnicas permite la cuantificación de un efecto tóxico más concreto que no tiene porqué desencadenar la muerte celular. Suelen ser métodos más sensibles. Entre estos métodos, los más utilizados en la evaluación de toxinas marinas se centran en los cambios en el equilibrio iónico celular (Vélez et al., 2001), en la modificación del pH intracelular, en cambios del potencial de membrana (Louzao, 2000; Louzao et al., 2004), o bien por la detección de un patrón específico de fragmentación de moléculas (E-cadherinas con presencia de YTX (Pierotti et al., 2003) con la exposición a una determinada toxina.

1.4.3 Utilización de agonistas o antagonistas

Se ha utilizado la co-exposición con agonistas o antagonistas para poder hacer evidente el efecto tóxico de un grupo de toxinas o bien contrarrestar su efecto y deducir o concluir sobre su mecanismo de acción. El ejemplo más usado es el del pre-tratamiento de células de neuroblastoma Neuro-2a con ouabaina y veratridina, a diferentes concentraciones para sensibilizar las células frente toxinas que actúan sobre VGSCs (Gallacher and Birkbeck, 1992; Kogure et al., 1988; Manger et al., 1993a).

La **veratridina** es un activador de VGSCs. Potencia la entrada de sodio a la célula (ver figura 15), creando una inestabilidad iónica celular.

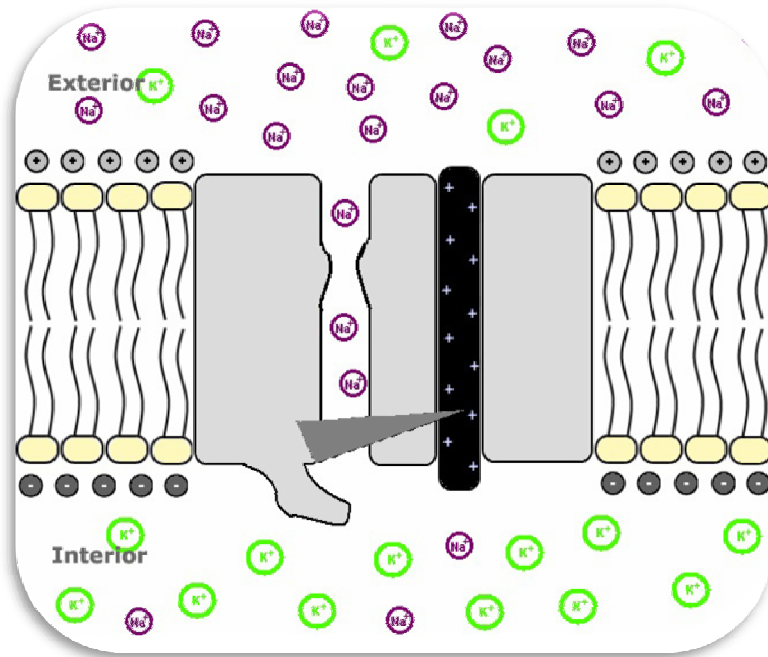


Figura 15: Esquema de un VGSC. La despolarización de la membrana permite la activación del canal y como consecuencia la entrada de iones sodio en el interior celular. Seguidamente, el canal se inactiva hasta que se ha finalizado totalmente la repolarización de la membrana, volviendo finalmente el canal al estado de reposo inicial. La unión de moléculas tóxicas a este canal lo puede dejar activado o bloqueado de forma continua independientemente al potencial de membrana.

La **ouabaina** es un inhibidor de la bomba sodio-potasio. Evita que la célula contrarreste el efecto tóxico producido por la veratridina (ver figura 16). Si esta actividad se bloquea se causará, finalmente, muerte celular en Neuro-2a.

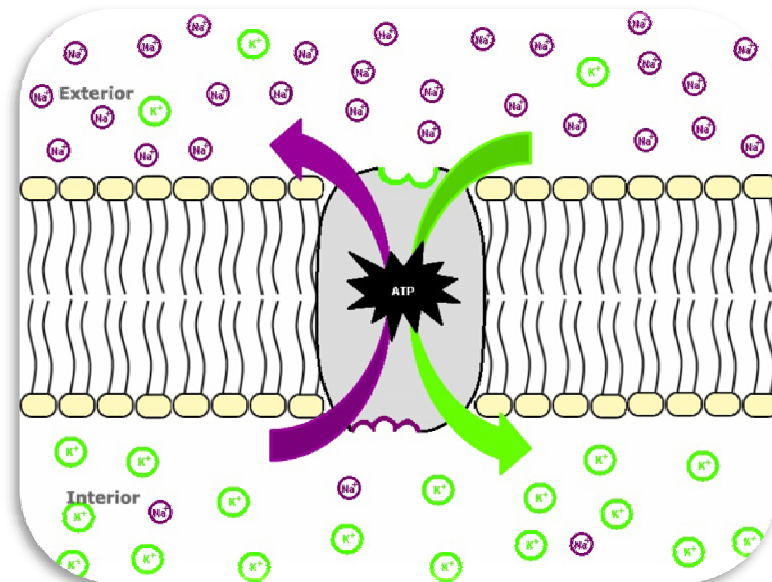


Figura 16: Esquema de una bomba sodio potasio. Transportador activo de tres iones sodio hacia el interior celular y dos iones potasio hacia el exterior celular con gasto de ATP.

La presencia de toxinas del grupo de las STXs en el ensayo, inhibe la entrada de sodio (por bloqueo de VGSCs) y previene de una manera dosis-dependiente la respuesta citotóxica permitiendo, de esta manera, la cuantificación de toxinas de este grupo. La presencia de toxinas del grupo de las PbTxS (activadoras de VGSCs) en el ensayo, activa aún más la entrada de sodio y se produce una respuesta tóxica dosis-dependiente que permite la cuantificación de las toxinas de este grupo.

La utilización de otras toxinas también se ha usado sólo con el propósito de identificar un efecto tóxico concreto a fin de optimizar CBAs que puedan aportar información específica de la presencia de un efecto tóxico concreto, como es el caso de la utilización de ouabaina en la evaluación de los efectos de la PITX, (método propuesto en Ledreux et al., 2009).

1.4.4 Tiempos de exposición

Otra de las variables en un CBA, tanto en cultivos celulares primarios como en cultivos celulares estables, es el tiempo de exposición. El efecto de las toxinas marinas en un CBA concreto es muy dependiente del tiempo de exposición llegando a límites de efectos máximos en pocas horas, un día o varios días dependiendo del tipo de toxina. Como norma general, los ensayos de evaluación de efectos en la viabilidad celular se estandarizan a 24 horas de exposición. Ese período es suficiente en la mayoría de grupos de toxinas para observar curvas dosis-respuesta repetibles, con efecto tóxico máximo superiores al 50% (en la mayoría de líneas celulares y metodologías utilizadas) (p. ej.: Fladmark et al., 1998; Ledreux et al., 2009; Manger et al., 1993b; Tubaro et al., 1996b). Pero en muchos CBAs, se ha visto la necesidad de ampliarlos a 48 o incluso 72 horas de exposición (dependiendo del tipo celular utilizado) para algunas toxinas (p.ej. en exposiciones a AZA y YTX; Pérez-Gómez et al., 2006; Twiner et al., 2005).

1.4.5 Los CBAs como herramienta toxicológica de detección y cuantificación de toxinas marinas

Sólo el CBA basado en la detección de toxinas del grupo STX mediante el efecto combinado de la exposición con ouabaina y veratridina en células de neuroblastoma ha sido considerado por el EFSA como posible CBA alternativo al MBA. Sin embargo, no se ha propuesto la aplicación del procedimiento desarrollado por Jellet et al. (1992) al no obtener resultados satisfactorios en un estudio de colaboración dirigido por la AOAC International en 1999 (EFSA, 2009b). El estudio se llevó a cabo mediante la utilización de un kit (Jellet et al., 1998) que parecía facilitar el uso de la técnica en cualquier laboratorio de análisis. Sin embargo, fue precisamente el diseño en este formato el que dio lugar a una acumulación de errores que invalidaron la técnica.

El European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), en el 55 workshop sobre los posibles CBAs alternativos al MBA en 2006 (Hess et al., 2006),

considera principalmente la utilización de CBAs para la detección de las toxinas pertenecientes al grupo de la STX mediante el protocolo optimizado por Jellet (Jellet et al., 1992) o por Louzao (Louzao et al., 2000) y al grupo de las YTXs mediante el protocolo optimizado por Pierotti (Pierotti et al., 2003). Seguramente, la selección de estos métodos viene determinada por los trabajos de validación (pruebas con estándares, dopajes en muestras naturales no contaminadas, muestras naturales contaminadas y estudios de correlación con métodos analíticos) que han resultado satisfactorios, pero aún queda mucho trabajo en la validación de estos métodos.

1.4.5.1 Limitaciones más destacadas de los CBAs como herramientas toxicológicas de detección

Una de las limitaciones más destacadas de los CBAs se encuentra en el efecto matriz de los extractos brutos (no purificados) en determinadas muestras (extractos de moluscos) (Malaguti et al., 2002; Nasser et al., 2008). Para minimizar estas interferencias se puede optar por disminuir el extracto de exposición, sacrificando la sensibilidad del método, o purificar previamente el extracto aumentando la complejidad del ensayo. No obstante, también es verdad que los métodos analíticos precisan igualmente de métodos de purificación previos para eliminar interferencias.

Otra de las limitaciones más importante es que al tratarse de sistemas celulares aislados, aunque sea una herramienta toxicológica existe siempre la duda sobre la correlación de un efecto tóxico en un CBA con el efecto en un organismo complejo. Aunque también es verdad que existen grandes diferencias sobre el efecto tóxico de las toxinas marinas entre diferentes especies de animales, como el ejemplo de las diferencias de toxicidad de las PTXs por vía oral entre ratas y ratones, e incluso entre métodos en una misma especie animal, como el ejemplo de los efectos de la yesotoxina por vía oral o intraperitoneal en ratón. Una de las posibles soluciones a esta limitación sería la identificación de los efectos tóxicos producidos por toxinas

con el mismo mecanismo de acción y generación de unos factores de corrección que relacionen los datos de toxicidad de un CBA con la toxicidad en organismos complejos.