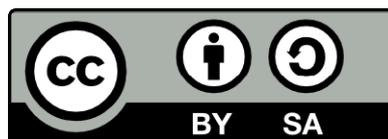




Optimización de ensayos celulares para la detección de toxinas marinas responsables de intoxicaciones alimentarias. Aplicación en extractos lipofílicos de muestras naturales de *Mytilus galloprovincialis*

Elisabet Cañete Ortiz



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

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

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

DISCUSIÓN

4 DISCUSIÓN

4.1 Consideraciones generales

Este trabajo trata de las aproximaciones metodológicas hacia un CBA que permita la evaluación del contenido en toxinas marinas de productos alimentarios de origen marino a fin de optimizar un método toxicológico alternativo al bioensayo ratón en la discriminación entre muestras con contenido en toxinas superior o inferior a los límites regulados actualmente como límites seguros para el consumo humano.

4.1.1 La optimización del método

La optimización del método se realizó teniendo en cuenta los siguientes puntos:

- **Sensibilidad y repetitividad del método al grupo de toxinas que se desean evaluar.**

El límite de detección del ensayo debe ser inferior a los valores legales establecidos. Estos valores están en función de la masa (kg) del producto que se debe evaluar. Por lo tanto, la sensibilidad y repetitividad del ensayo se debe optimizar teniendo en cuenta (como control negativo) la exposición de los extractos del producto a analizar.

- **La complejidad y tiempo de desarrollo del ensayo para su utilización sistemática.**

El método debe ser adaptado para el análisis en rutina de muestras. En este punto se prima la reducción del tiempo de obtención de los resultados y la sencillez del método (tanto en los costes del material que se utiliza como en la necesidad de formación de personal).

- **Los protocolos de extracción y purificación de las toxinas. Interferencia de las matrices naturales en el método.**

La extracción y purificación de las toxinas de alimentos de origen marino deben asegurar la recuperación de las toxinas que se desean evaluar.

La optimización del método debe tener en cuenta la eliminación de las interferencias causadas por los restos de matriz a fin de establecer límites de detección que permitan discriminar muestras con cargas de toxinas superiores o inferiores a los niveles permitidos.

- **Obtención de valores de toxicidad general de una muestra.**

Una de las características que le da mayor potencial a los CBAs como métodos alternativos al MBA, es la capacidad de realizar valoraciones toxicológicas sobre una muestra. Teniendo en cuenta la cantidad de toxinas análogas a los grupos conocidos que se descubren continuamente y el descubrimiento de nuevos compuestos tóxicos, es importante contar con herramientas toxicológicas en la sustitución del MBA para asegurar la salud de los consumidores.

- **La relación de los resultados del CBA con las metodologías actualmente vigentes en la detección y cuantificación de estos compuestos.**

En la sustitución del MBA, es importante asegurar que los nuevos métodos van a ser por lo menos, tan seguros como el que se desea substituir. Por lo tanto es importante la evaluación de muestras naturales por ambas técnicas y realizar estudios de correlación entre métodos. A fin de evaluar solamente el método de detección es importante la utilización de protocolos de extracción y purificación similares.

- **Posibilidad de identificación de las toxinas o grupos de toxinas presentes en una muestra.**

Otra característica que le da un gran potencial a los CBAs es la cantidad de réplicas o ensayos diferentes que se pueden realizar en paralelo. Esto abre un abanico de posibilidades de ensayo sobre una muestra que pueden ayudar a determinar qué

grupo o grupos de toxinas pueden estar presentes en la muestra. Se debe también potenciar esta capacidad en la optimización final del método.

Los pasos seguidos en la optimización se pueden dividir en dos grandes bloques:

Un primer bloque en el que se trabajó con toxinas purificadas estándar a fin de establecer las condiciones de los ensayos para la detección y cuantificación de las toxinas, así como contribuir a la caracterización toxicológica de las diferentes toxinas. Un segundo bloque, en el que se trabajó con toxinas en muestras naturales a fin de establecer las condiciones en situaciones reales.

En nuestro contexto la aproximación a muestras reales priorizó las toxinas que causan más problemas en las zonas de producción de las bahías del Delta del Ebro, nuestra principal zona de estudio, y que en este caso son las toxinas lipofílicas.

4.2 Respuesta del CBA frente a toxinas purificadas (artículo 1 y artículo 2)

Para este grupo de experimentos se escogieron toxinas representativas de los grupos más comunes. Para el primer grupo de ensayos (artículo 1) se utilizó: STX, PbTx-3, PITX, PTX-2, OA, DTX-1, DA. Para el segundo grupo de ensayos (artículo 2) se amplían los estudios en toxinas dependientes de VGSCs (STX, PbTx-3 y P-CTX) y en toxinas lipofílicas (OA, DTX-1, PTX-2, YTX y AZA-1).

4.2.1 Variables estudiadas en la evaluación del CBA como método toxicológico

Sensibilidad

La sensibilidad del método hacia una toxina o grupo de toxinas con un mecanismo de acción común se mide mediante la estimación de valores de toxicidad. En el conjunto del trabajo se evaluaron las concentraciones de toxina que causan el 50% del efecto (EC50s) y el efecto máximo que causa la toxina en el método estudiado.

Capacidad de cuantificación

Para evaluar esta capacidad del método se tuvo en cuenta la adecuación de los puntos generados por la respuesta a diferentes concentraciones de toxina al modelo

de curva dosis-respuesta sigmoideal de una regresión no lineal. La idoneidad de la curva se midió con el valor de la r^2 de la curva. A menor valor (de 0 a 1) de r^2 , menor es la idoneidad de la curva para los puntos que describe la respuesta de la toxina a unas concentraciones determinadas.

Además, se tuvo también en cuenta en este punto el rango de respuesta de la toxina en el ensayo, o bien, el porcentaje del efecto tóxico máximo. A menor rango de respuesta más dificultades en la cuantificación del efecto de la toxina.

La variabilidad asociada a la zona de cuantificación también se consideró mediante los valores de la desviación estándar de los puntos o bien mediante el error estándar de la curva (con un intervalo de confianza del 95%).

Repetitividad

Nos interesa particularmente que la toxicidad causada por una concentración determinada de toxina sea cuantificada con el menor error posible.

Se evaluó tanto la repetitividad del ensayo en función de la variabilidad de la respuesta en un mismo día de experimentación (desviación estándar de las réplicas del ensayo) o bien entre diferentes días de experimentación donde se estudian las r^2 de las curvas formadas por diferentes experimentos y se comparan las EC50s y el efecto tóxico máximo de las diferentes experiencias para escoger la estrategia de cuantificación más adecuada en cada caso.

4.2.2 El tipo celular

La selección del tipo celular se realizó en base a los resultados del artículo 1. Se parte de la base de los estudios que se habían realizado hasta el momento en la línea Neuro-2a, para la que se obtenían muy buenos resultados en la detección y cuantificación de toxinas que actúan sobre VGSCs, y además, había demostrado ser sensible a toxinas marinas con diversos mecanismos de acción. Sin embargo, la baja expresión de receptores glutamato del tipo NMDA se postuló como deficiencia de estas células a la detección sensible de neurotoxinas dependientes de estos receptores para la respuesta tóxica celular.

La línea celular NG108-15, es una línea muy utilizada en el estudio de procesos neuronales y en rastreo farmacéutico, sabemos que expresa receptores glutamato del tipo NMDA y VGSC, entre otros, y se había utilizado en el estudio del efecto tóxico de toxinas marinas por varios grupos de investigación. Teniendo en cuenta estas dos líneas candidatas, se realizó una batería de pruebas con toxinas marinas de diferente naturaleza toxicológica resolviendo que para toxinas que actúan sobre VGSCs (ensayo con O/V) parece haber una mayor sensibilidad en Neuro-2a (artículo 1), se obtienen mayores respuestas máximas. Sin embargo, tal y como se trata en el artículo 2, esto pudo ser, en parte, un artificio del ensayo en relación a las concentraciones utilizadas de O/V para el ensayo. Las EC50s obtenidas en ambos tipos celulares no fueron muy diferentes. Para el OA, la DTX-1 y la PITX no parece haber grandes diferencias en la sensibilidad de ambas líneas celulares. Sin embargo, se observó mayor sensibilidad en NG108-15 a la PTX-2 y el DA, aunque con esta última toxina no se pudo obtener una respuesta repetible en diferentes días de experimentación.

En relación a los resultados obtenidos, se escogió la línea celular NG108-15 para el resto de pasos en la optimización del CBA. En este tipo celular no se observó pérdida de sensibilidad a las toxinas estudiadas frente a la línea Neuro-2a (sólo de forma leve en toxinas dependientes de VGSCs), y además, prometía mejores resultados en la detección de las PTXs (aquellas que comparten mecanismo de acción con la PTX-2) y del DA. Sin embargo, si se considera sólo el uso en toxinas que afectan a VGSCs, la línea celular Neuro-2a es algo más sensible y el ensayo tiene menos costes por las concentraciones de veratrina que se deben usar.

4.2.3 Reducción del tiempo del ensayo

En el artículo 1 y el artículo 2 se realizaron una batería de ensayos a fin de establecer los tiempos previos desde la siembra a la exposición y los tiempos de exposición a fin de obtener una respuesta tóxica sensible, cuantificable y repetible para las toxinas estudiadas.

4.2.3.1 El tiempo entre la siembra y la exposición

En el artículo 1 se observó que reduciendo de 24 a 1 hora el tiempo desde la siembra hasta la exposición se puede alterar la sensibilidad de algunas toxinas (PTX-2 en Neuro-2a y PITX en ambos tipos celulares para las células sin pre-tratamiento con O/V).

Las células no se presentan en las mismas condiciones a 24 que a 1 hora después de la siembra. Probablemente, a las 24 horas de la siembra las células se han fijado firmemente a la superficie de la placa y han creado una monocapa de elevada confluencia. A 1 hora de la siembra, probablemente las células no presentarán la misma disposición de receptores de membrana o de otras moléculas implicadas en la respuesta tóxica que a 24 horas después de la siembra. Sin embargo, en NG108-15 no se vió altamente alterada ni la sensibilidad ni la capacidad de cuantificación tal y como se observó en el artículo 1 (para la PITX, sería necesario el uso de tratamiento O/V).

En el artículo 2, se demuestra que la reducción de 24 a 1 hora el tiempo desde la siembra hasta la exposición, genera igualmente respuestas repetibles entre diferentes días de experimentación (OA, DTX-1 y PTX-2) a 48 horas de exposición.

4.2.3.2 El tiempo de exposición

En el artículo 1 y el artículo 2 se observó que la sensibilidad a las toxinas es muy dependiente al tiempo de exposición. Para cada grupo de toxinas se necesita un tiempo mínimo de exposición para generar una respuesta tóxica cuyos valores permitan realizar una buena cuantificación (3 horas son suficientes para el OA, la DTX-1 y la PTX-2; 24 horas para la STX, la PbTx-3, la P-CTX y la PITX; y 48 horas en el caso de la YTX y el AZA-1). Para aquellas toxinas en las que es suficiente un tiempo menor, las exposiciones a tiempos superiores pueden influir levemente en la sensibilidad de la respuesta, sobretodo en la determinación de la EC50.

En el caso de las toxinas dependientes de VGSCs, se debe tener en cuenta que la determinación del efecto tóxico depende también del pre-tratamiento con O/V. Ya

que, si éste no funciona difícilmente se podría ver efecto tóxico en el CBA para este tipo de toxinas.

En relación a los tiempos del CBA se decidió, con los resultados obtenidos, que para el análisis de toxinas lipofílicas, en las que interesa (a nivel de legislación europea) la detección de toxinas del grupo del OA, las PTXs, las YTXs y los AZAs, sería necesaria una exposición mínima de 48 horas que, tal y como se demuestra en el artículo 2, puede ser realizada en células de 1 hora de crecimiento. Estos ensayos tienen la misma duración que los clásicos de 24 horas de crecimiento y 24 horas de exposición. De esta manera, para el análisis de una muestra ambos ensayos se pueden hacer en paralelo obteniendo mayor información en el mismo espacio de tiempo. Servirá en el estudio cualitativo de la muestra.

4.2.4 Pre-tratamiento de O/V para las toxinas que actúan sobre VGSCs

4.2.4.1 Cuantificación de efectos para toxinas que actúan sobre VGSCs

Las evaluaciones de los efectos tóxicos mediante CBA para toxinas que actúan sobre VGSCs tienen mayor complejidad, sobre todo en toxinas bloqueadoras del canal. Por ello, creo necesario dedicar un pequeño apartado para su explicación detallada:

En toda curva dosis-respuesta deben definirse cuales van a ser los valores de respuesta nula y de máxima respuesta. El ensayo requiere la utilización de otras drogas (pre-tratamiento con O/V) que sensibilicen las células a los efectos tóxicos de este tipo de toxinas. Para ello, se las lleva a un estado de toxicidad (mortalidad) del 20% o el 80% en 24 horas (para el análisis de toxinas activadoras o bloqueadoras de VGSCs, respectivamente) aproximado. Por lo tanto, hay dos maneras de expresar los resultados:

Toxicidad absoluta

Esta representación de la estimación de toxicidad implica que los valores de mortalidad máxima vienen determinados por la absorbancia obtenida en los pocillos

“blanco” (en los que no hay cultivo de células). El promedio de su absorbancia se resta en el resto de valores de la misma placa, es el 0% de viabilidad.

Los valores de toxicidad nula vienen determinados por la absorbancia en los pocillos control, en los que hay cultivo celular sin ningún tratamiento. El promedio de su absorbancia se toma de referencia para calcular el porcentaje de viabilidad del resto de pocillos de la placa, es el 100% de viabilidad.

Para toxinas que actúan sobre VGSCs, esta representación es idónea para evaluar el método ya que permite estimar el rango de detección del sistema. Comparando los rangos de detección en ensayos con diferentes condiciones de O/V podemos evaluar cual de ellos presenta una mejor plataforma para la detección y cuantificación de las toxinas.

Toxicidad relativa

Esta representación tiene sentido aplicarla cuando los puntos de partida para el máximo y el mínimo efecto tóxico son diferentes a los valores del 0% o 100% de viabilidad, como es el caso del ensayo con O/V. Esta representación permite conocer la concentración a la que se produce el 50% del efecto (EC50) o cualquier otra cuestión que implique evaluación del efecto de la toxina independientemente del efecto de la O/V en cada experimento.

Esta representación es idónea para estimar la cuantificación de los efectos tóxicos ya que reducimos la parte de la variabilidad causada por el efecto de la O/V en la viabilidad celular.

Para las toxinas activadoras de VGSCs

Esta representación implica que los valores de toxicidad máxima vienen determinados de la misma manera que en la representación de toxicidad absoluta, ya que los pocillos “blanco” siguen siendo los que determinan el 100% de efecto tóxico.

Los valores de toxicidad nula vienen determinados por la absorbancia en los pocillos control con pre-tratamiento O/V. El promedio de su absorbancia se toma de

referencia para calcular el porcentaje de viabilidad relativa del resto de pocillos de la placa. Es el 0% de efecto tóxico.

Para las toxinas bloqueadoras de VGSCs

Esta representación implica que los valores de toxicidad nula vienen determinados por la absorbancia obtenida en los pocillos control con tratamiento O/V. El promedio de su absorbancia se resta a todos los valores de la misma placa. Es el 0% de efecto tóxico.

Los valores de toxicidad máxima vienen determinados por la absorbancia en los pocillos con las dosis de toxina que provocan el máximo efecto. El promedio de su absorbancia se toma de referencia para calcular el porcentaje de efecto en el resto de pocillos de la placa. Es el 100% de efecto tóxico.

4.2.4.2 Optimización del CBA para NG108-15

Puede parecer curioso el hecho de hablar de la optimización de las concentraciones de O/V en función de la dilución de una proporción fijada y no mediante la optimización de la concentración de ouabaina y de veratridina por separado. Siendo las toxinas que queremos evaluar toxinas que actúan sobre VGSCs, es lógico pensar en una inhibición subletal de la bomba Na^+/K^+ (con ouabaina) para generar un estado de sensibilidad determinado y jugar con las concentraciones de veratridina para aproximar el efecto a un 20% o un 80% de mortalidad según si se evalúan toxinas activadoras o bloqueadoras de VGSCs, respectivamente. Sin embargo, no se puede determinar esta concentración de ouabaina subletal óptima con las propias herramientas del ensayo.

En la optimización del método con células Neuro-2a, teniendo en cuenta tanto la bibliografía (Bottein Dechraoui et al., 1999; Dickey et al., 1999; Jellett et al., 1992; Manger et al., 1993; Okumura et al., 2005), comunicaciones personales (grupo del Dr R. W. Dickey del Gulf Coast Seafood Laboratory) y nuestra propia experiencia, podemos marcar como principales premisas en el ensayo:

- Mantener una proporción de O/V de 1:10.

- o Seleccionar concentraciones de O/V que produzcan el 20 o el 80% de mortalidad para toxinas activadoras o bloqueadoras de VGSCs, respectivamente. Es necesario reajustar esas concentraciones entre laboratorios, en el mismo laboratorio cuando se cambia de cepa celular, o incluso, cuando se modifica algún parámetro en la composición del medio de cultivo (lote del suero bovino fetal (fetal bovine serum, FBS), marca de algún producto, etc).

Siguiendo estas premisas se obtienen curvas patrón óptimas para la cuantificación de los efectos producidos por las toxinas que actúan sobre VGSCs.

Siguiendo el ejemplo del modelo celular Neuro-2a, en la puesta a punto del método para NG108-15 se probaron las mismas condiciones como punto de partida (artículo 1), teniendo que exponer a concentraciones superiores de O/V para poder generar el mismo efecto tóxico. Sin embargo, los resultados sólo ofrecían un 20% de efecto máximo, muy inferior al 50-60% que se estaba obteniendo para Neuro-2a (en nuestro laboratorio). Se observó entonces que en esta proporción de O/V la concentración de ouabaina para el ensayo de toxinas bloqueadoras de VGSCs era de 0,75 mM, que suponía por sí sola una mortalidad del 55% (figura 17).

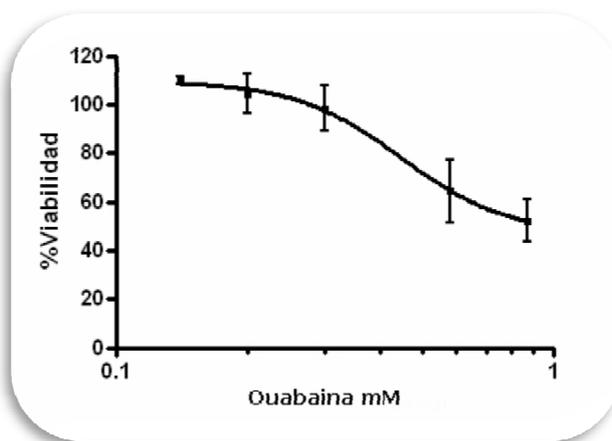


Figura 17: Curvas dosis-respuesta de ouabaina en células NG108-15. El eje de las ordenadas representa las estimaciones de viabilidad usando el porcentaje de reducción de MTT. Se realizaron cuatro replicas por dosis en placas de 96 pocillos a una densidad 25 000 y 50 000 células/pocillo en células NG108-15. Las exposiciones fueron de 24 horas en placas con células que habían sido sembradas 24 horas antes.

Consecuentemente, una toxina bloqueadora de VGSCs no puede contrarrestar más de un 25% del efecto tóxico producido por esa proporción de O/V (80%

mortalidad). En este punto, nos dimos cuenta de la necesidad de cambiar las proporciones de O/V para la optimización del ensayo en NG108-15, aumentado la proporción de veratridina respecto a la ouabaina.

Probamos diferentes proporciones de O/V y comparamos con el porcentaje de reducción de MTT usando una toxina bloqueadora de VGSCs, STX a 67,1 nM (tabla 2).

Concentración (mM)		% Reducción MTT				% Efecto STX	
OUAB	VER	Control O/V +		Con STX 67,1 nM		Average	DS
		Average	DS	Average	DS		
0.3	0.03	42.9	6.8	57.9	3.1	14.9	3.1
0.3	0.05	41.4	5.5	58.2	5.9	16.8	5.9
0.3	0.1	29.8	0.8	53.7	10.6	23.9	10.6
0.2	0.2	50.5	2.3	103.5	2.5	53.1	2.5
0.2	0.3	34.6	9.3	80.5	6.3	45.8	6.3
0.1	0.3	51.2	15.5	108.8	6.7	57.6	6.7
0.1	0.5	11.9	5.6	33.1	2.3	21.2	2.3
0.1	0.87	1	0.8	6.3	5.1	5.3	5.1

Tabla 2: Efecto de la STX en relación a diferentes concentraciones de O/V en células NG108-15. El efecto de la STX se calculó con el incremento del porcentaje de reducción de MTT al exponer STX a 67,1 nM respecto a los pocillos control tratados con O/V (control OV+).

Se seleccionaron dos concentraciones de O/V (mM) en relación a aquellas en las que la STX contrarrestaba mejor el efecto tóxico de O/V: 0,2/0,2 y 0,1/0,3 (tabla 2, azul). Y se estudió la curva dosis–respuesta de la STX en estas dos condiciones:

- o En las concentraciones de O/V: 0,2/0,2, la exposición de diferentes concentraciones de STX generaban una buena curva (r^2 : 0,95), con variabilidad aceptable (error estándar en torno al 5%), pero la mortalidad del control O/V era aproximadamente del 50% (Figura 18; negro).
- o En las concentraciones de O/V: 0,1/0,3, no fue posible generar una curva dosis-respuesta y se presentaba una elevada variabilidad en el ensayo (figura 18; gris).

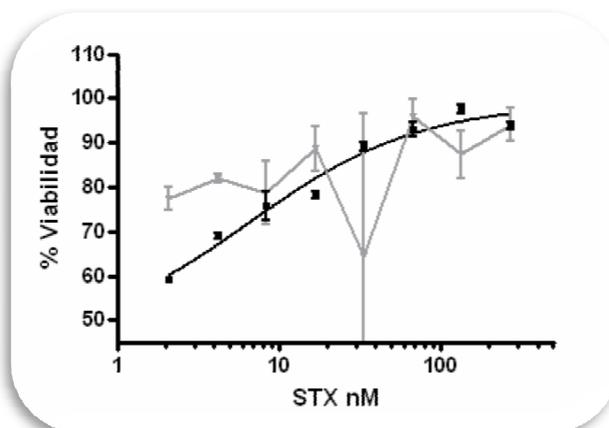


Figura 18: Curvas dosis-respuesta de STX con diferentes concentraciones de O/V: 0,2:0,2 (negro) y 0,1:0,3 (gris). El eje de las ordenadas representa las estimaciones de viabilidad usando el porcentaje de reducción de MTT. Se realizaron tres replicas por dosis en placas de 96 pocillos a una densidad 25 000 y 50 000 células/pocillo en células NG108-15. Las exposiciones fueron de 24 horas en placas con células que habían sido sembradas 24 horas antes.

En relación a estos resultados, se utilizó la misma proporción 1:1 pero aumentando las concentraciones hasta obtener el 80% de mortalidad (0,35/0,35). En esas concentraciones, se obtiene un efecto máximo en torno a 40%, cercano al obtenido para Neuro-2a (50-60%) (figura 19).

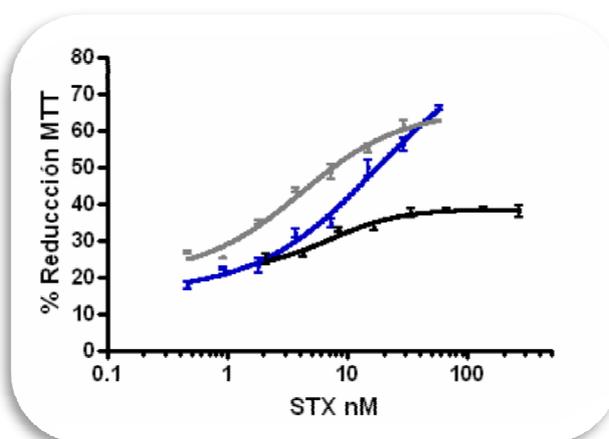


Figura 19: Curvas dosis-respuesta de STX con diferentes proporciones de O/V en células NG108-15 (gris y negro) y una en células Neuro-2a (azul). Para las células NG108-15, las dos curvas corresponden a dos tratamientos con diferentes proporciones de O/V: proporción 10:1 (negro) y 1:1(gris). La curva con células Neuro-2a está realizada con proporción de O/V 10:1. El eje de las ordenadas representa las estimaciones de viabilidad usando el porcentaje de reducción de MTT. Se realizaron tres replicas por dosis en placas de 96 pocillos a una densidad 25 000 y 50 000 células/pocillo en células NG108-15 y de aproximadamente 35 000 células/pocillo en células Neuro-2a. Las exposiciones fueron de 24 horas en placas con células que habían sido sembradas 24 horas antes.

Tal y como se hizo en la optimización del CBA para Neuro-2a, en el CBA para el análisis de toxinas activadoras de VGSCs en la línea celular NG108-15 se utilizó la misma proporción de O/V (1:1) diluida hasta producir un efecto tóxico del 20% de

mortalidad (0,13/0,13). Se obtuvo una buena curva dosis-respuesta ($r^2: 0,94$) de la PbTx-3 en estas condiciones, una variabilidad baja (en torno al 7% de error) y un efecto máximo en torno al 55%, cerca del que se obtiene para Neuro-2a (60%) (figura 20).

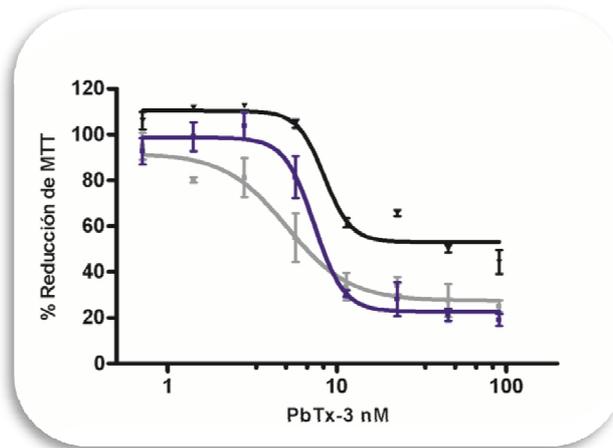


Figura 20: Curvas dosis-respuesta de PbTx-3 con diferentes proporciones de O/V en células NG108-15 (gris y negro) y una en células Neuro-2a (morado). Para las células NG108-15, las dos curvas corresponden a dos tratamientos con diferentes proporciones de O/V: proporción 10:1 (negro) y 1:1(gris). La curva con células Neuro-2a está realizada con proporción de O/V 10:1. El eje de las ordenadas representa las estimaciones de viabilidad usando el porcentaje de reducción de MTT. Se realizaron tres replicas por dosis en placas de 96 pocillos a una densidad 25 000 y 50 000 células/pocillo en células NG108-15 y de aproximadamente 35 000 células/pocillo en células Neuro-2a. Las exposiciones fueron de 24 horas en placas con células que habían sido sembradas 24 horas antes.

En defensa de la metodología basada en el mantenimiento de una proporción de O/V en el ensayo, usada por diferentes grupos de investigación, incluido el nuestro, podemos comentar con los estudios de optimización realizados en la línea celular NG108-15 que:

- o Diferentes diluciones de la misma proporción de O/V, tienen porcentajes similares de efecto en las mismas concentraciones de toxinas que actúan sobre VGSCs (figura 21). La diferencia entre las curvas sólo radica en su punto de inicio, que dependerá de la mortalidad que cause el propio control O/V.

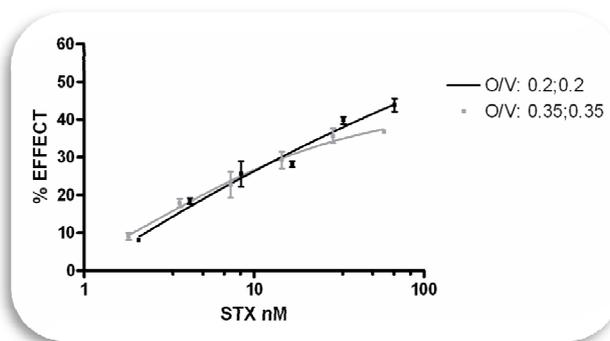


Figura 21: Curvas dosis-respuesta del efecto de STX en células NG108-15 a dos concentraciones de O/V en proporción 1:1. Porcentajes de 0,35:0,35 y 0,2:0,2 de O/V para la curva gris y negra, respectivamente. El porcentaje de efecto está calculado mediante la resta del porcentaje de reducción de MTT obtenido en los pocillos control tratados con O/V al porcentaje obtenido en para cada concentración de STX. Se realizaron tres replicas por dosis en placas de 96 pocillos a una densidad 25 000 y 50 000 células/pocillo en células NG108-15. Las exposiciones fueron de 24 horas en placas con células que habían sido sembradas 24 horas antes.

- Si se incrementa en exceso la proporción de ouabaina en la proporción O/V, el rango de la curva que se genera en la exposición a toxinas que actúan sobre VGSCs se reduce.
- Si se incrementa en exceso la proporción de veratridina en la proporción O/V, se incrementa la variabilidad del ensayo (ejemplo NG108-15 con 0,1/0,3 de O/V en la figura 18, gris).

En el uso rutinario del CBA, es muy útil el escoger una proporción óptima de O/V para la línea celular usada y reajustar sólo las diluciones en función de la sensibilidad de las células frente a los posibles cambios de las condiciones del cultivo.

4.2.4.3 O/V: efecto sobre el análisis de otras toxinas

El análisis de toxinas dependientes de VGSCs, de la misma forma que el resto de ensayos, deben ser tenidos en cuenta desde el punto de vista en que el componente de toxinas de la muestra es desconocido. Por ello, se deben evaluar los cambios de toxicidad que se pueden presentar también en las toxinas que no actúan sobre VGSCs al analizarlas bajo condiciones de tratamiento con O/V. En los experimentos del artículo 1 se realizaron duplicados con O/V para todos los experimentos en OA, DTX-1, PTX-2 y PITX, y sólo se observaron diferencias de

respuesta clara en la exposición a 3 horas de la PITX. Para el resto de toxinas y condiciones experimentales se observaron leves cambios de sensibilidad.

4.2.5 Reducción de la variabilidad en la cuantificación del efecto tóxico

La manera de realizar las curvas patrón en la cuantificación de los efectos tóxicos de las muestras, es también un punto interesante a estudiar.

En la comparación del CBA con el MBA, según la legislación europea vigente, para el análisis de toxinas lipofílicas se debe cuantificar los efectos tóxicos del OA, el de sus análogos (DTXs,...) y el de las PTXs en equivalentes de OA. Igualmente, se deben incluir los efectos tóxicos de las YTXs en equivalentes de YTX y los de los AZAs en equivalentes de AZA-1. Lo ideal en el análisis de estas toxinas sería el generar para cada día de experimentación una curva dosis-respuesta con 8 concentraciones y tres réplicas por concentración. Pero a fin de poder optimizar un protocolo sencillo y económico, se estudió la posibilidad de utilizar curvas formadas por los resultados de diferentes días de experimentación en las que se reduzca el número de diluciones y de réplicas (4 dosis y dos réplicas por dosis), de tal manera que con una simple exposición empleando aproximadamente un 60% menos de toxina estándar en cada prueba, se podría evaluar si la sensibilidad de las células sigue siendo la pauta por la curva combinada (pooled curve) generada por diferentes experimentos. Si la sensibilidad de las células es suficientemente constante, la r^2 de la curva combinada debe aproximarse a 1 y el error estándar que se produce en la cuantificación será cada vez menor con la suma de las experiencias. Se analizó y discutió (en el artículo 2) para tres toxinas (OA, YTX y AZA-1) la variabilidad de las curvas patrón en función del día de experimentación.

Se estudió también el factor del tiempo de evaporación del extracto (bajo flujo de nitrógeno, a 40° de temperatura) en la aportación de variabilidad al ensayo para el OA, la YTX y el AZA-1.

4.2.5.1 Variabilidad entre días de experimentación

Los experimentos del artículo 2 mostraron que para los tiempos de exposición óptimos (suficiente con 24 horas para el OA y un mínimo de 48 horas en el caso de la YTX y el AZA-1) las tres toxinas presentaron curvas dosis-respuesta con buenas r^2 (superior a 0,92), en los diferentes días de experimentación, que dan fiabilidad a su uso como curvas patrón.

Cuando se estudiaron las curvas obtenidas por el conjunto de experimentos realizados para cada toxina en diferentes días (curvas combinadas), se observó que en el caso del OA los puntos dosis-respuesta se adecuaban bastante bien a la curva combinada que se generó (r^2 de 0,879) y no tanto para la YTX y el AZA-1 a 48 horas de exposición en los que se puede observar que la variabilidad entre días de experimentación no hace posible la generación de una curva combinada en las condiciones optimizadas (las r^2 son inferiores a 0,7).

En relación a estos resultados se determinó que para las cuantificaciones en OA equivalentes, se podría utilizar la curva patrón combinada siempre y cuando se haga una prueba con un mínimo de 4 puntos y dos réplicas por punto para añadirla a la curva combinada y verificar que la sensibilidad del ensayo sigue siendo la que describe dicha curva. Además, con esta curva se disminuye el efecto de los errores puntuales que se puedan realizar de forma ocasional en un día determinado, como por ejemplo: el error en la dispensación de la toxina, error en las diluciones, etc. Los datos de la curva combinada de OA muestran (con un 95% de probabilidad) que la curva real (no la empírica) de la respuesta del OA en el CBA yace en la banda de confiabilidad, que en ningún momento supera el $\pm 5\%$ de error.

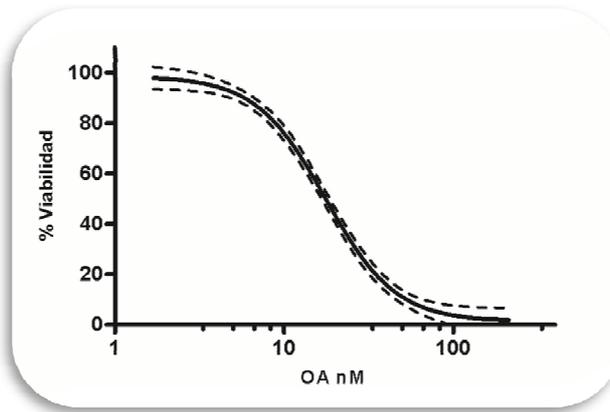


Figura 22: Curva dosis-respuesta común del OA en células NG108-15. El eje de las ordenadas representa las estimaciones de viabilidad usando el porcentaje de reducción de MTT. Se utilizan datos de 12 experimentos independientes en placas de 96 pocillos a una densidad 25 000 y 50 000 células/pocillo en células NG108-15. Las exposiciones fueron de 24 y 48 horas en placas con células que habían sido sembradas 24 y 1 hora horas antes, respectivamente. La línea discontinua marca la banda de confiabilidad (con un 95% de probabilidad).

En el caso de la YTX y el AZA-1, sí parece que el componente de la variabilidad del ensayo causado por el estado de las células en un día determinado tiene mayor importancia que el resto de componentes. Por ello, para estas toxinas no aconsejamos el uso de una curva combinada y creemos que es mejor utilizar curvas generadas el mismo día para cuantificar el efecto tóxico de estas toxinas en un día de experimentación determinado.

4.2.5.2 Importancia del tiempo de evaporación en la respuesta tóxica del patrón

Uno de los factores en los que se producía variación entre días de experimentación era el tiempo de evaporación de los solventes en los extractos de muestras o toxinas patrón. Se estudió, por lo tanto, si este factor podría tener influencia en la variabilidad de la respuesta de las toxinas en el CBA. Los resultados del artículo 2 mostraron que, en efecto, una de las posibles causas de la variabilidad en el efecto del AZA-1 podía ser el tiempo de evaporación. Es importante entonces que en esta fase muestra y toxina patrón (con la que se va a generar la curva patrón para la cuantificación del efecto tóxico del AZA-1) compartan tiempos de evaporación equivalentes.

4.3 Respuesta del CBA frente a toxinas en muestras naturales (artículo 3, artículo 4 y artículo 5)

Para este grupo de experimentos se utilizaron muestras de bivalvos del Programa de seguimiento de la calidad de las aguas en las zonas de marisqueo ejecutado por IRTA para la Dirección General de Pesca y Acción Marítima de la Generalitat de Catalunya. De esta manera, se pudieron utilizar los datos de los MBA realizados para estas muestras y no fue necesario proponer ni un solo MBA extra.

El diseño experimental propuesto en este trabajo para la puesta a punto del CBA en la evaluación de toxinas en muestras de bivalvos, incluye los siguientes puntos:

- Seleccionar las cantidades idóneas de exposición de vianda a fin de detectar y cuantificar un efecto tóxico cercano a los niveles legislados para aquellas toxinas en las que exista legislación.
- Eliminar los efectos producidos por la matriz de las muestras que puedan interferir en la evaluación tóxica de la muestra.
- Reducir y simplificar los ensayos a fin de poder diseñar un CBA óptimo para su uso rutinario.

Por su elevada importancia en el área geográfica en la que nos encontramos, este trabajo se centró en la optimización del CBA para toxinas del tipo lipofílico.

4.3.1 Cálculos de la cantidad de mg equivalentes de vianda idónea para la cuantificación en CBA

En primer lugar, se determinaron las concentraciones óptimas de exposición de la muestra en el CBA para asegurar la detección de las toxinas reguladas de las que tenemos información toxicológica según nuestro ensayo. Para ello se estimaron, para cada toxina, los mg equivalentes de vianda necesarios para causar un 50% del efecto en el CBA, en el caso de presencia de la toxina en la muestra a la concentración máxima permitida según legislación. Estas cantidades fueron determinadas mediante los datos obtenidos en el artículo 2:

Toxinas	límites aceptados	Artículo 2	
	µg toxina/kg	EC50 nM	mg equiv/ mL
OA	160	18	91
DTX-1	160 equiv de OA ^a	12	61
PTX-2	160 equiv de OA ^a	1	5
YTX	1000	5-17	6-20
AZA-1	160	2-11	11-58

Tabla 3: Tabla resumen de los cálculos de la concentración de exposición de la muestra en el CBA en función de las toxinas estudiadas. En esta tabla se muestra, para cada una de las toxinas estudiadas, la concentración de muestra equivalente (mg equiv/ml) necesaria en la exposición, para la carga de una concentración de toxina equivalente a su EC50 en el CBA optimizado (teniendo en cuenta los valores del artículo 2). En negro, los resultados para el CBA a 24 horas de exposición. En rojo, los resultados para el CBA a 48 horas de exposición.
^a Para las DTXs y las PTXs, la legislación indica que los niveles aceptados serán aquellos que no sean superiores a 160 equivalentes de OA.

En el caso de la DTX-1 y la PTX-2, se tuvieron en cuenta los resultados toxicológicos obtenidos para esas dos toxinas en MBA i.p. y su potencial tóxico respecto al OA (Aune et al., 2007; Miles et al., 2004). En estos trabajos se presentó una relación de toxicidad entre la DTX-1 y la PTX-2 con el OA de 1:1 (Toxicity Equivalent Factor, TEF de 1). Por lo tanto, se consideró que el límite de aceptación para estas toxinas sea el equivalente molecular de 160 µg de OA/kg, o lo que es lo mismo, 199 nmoles de toxina/kg.

Teniendo en cuenta estos resultados previos, la evaluación de 100 mg equiv/ml en 24 horas de exposición y 50 mg equiv/mL a 48 horas de exposición, serían suficientes para la detección del efecto tóxico producido por las toxinas estudiadas (OA, DTX-1, PTX-2, YTX y AZA-1).

4.3.2 Eliminación de los efectos tóxicos de la matriz que interfieren en la evaluación de la muestra (artículo 3 y 4)

El protocolo de extracción de toxinas lipofílicas seleccionado para los experimentos con células (extracción acetónica basada en Yasumoto et al.(1978)) fue escogido para asegurar la misma recuperación de moléculas lipofílicas que en los métodos MBA actualmente implementados para la evaluación de toxinas en bivalvos. Sin

embargo, sabíamos que este tipo de extracción podría ser más problemático por su posible interferencia en el ensayo debido al efecto matriz.

Tal y como se observa en el artículo 3 (en Neuro-2a) y en el artículo 4 (en NG108-15), la exposición al extracto bruto durante 24 horas produce, en los controles negativos estudiados, efectos matriz demasiado potentes como para poder detectar efectos de toxinas a 100 mg equiv/mL. Para solventar este problema, los extractos se purificaron mediante fraccionamientos con gradiente de solventes y con ello poder separar las moléculas en la muestra por sus propiedades físicoquímicas de menor a mayor lipofilicidad.

Los primeros ensayos (artículo 3), se llevaron a cabo con numerosas fracciones (60) mediante HPLC. El resultado fue muy satisfactorio ya que se pudieron reducir en gran parte las toxicidades causadas por la propia matriz del molusco e identificar toxicidades probablemente no asociadas al efecto matriz. Sin embargo, teniendo en cuenta que el protocolo de fraccionamiento por HPLC puede ser largo y costoso propusimos una optimización de la estrategia utilizando fraccionamientos en cartuchos de fase reversa C-18 con la ayuda de un sencillo sistema de vacío (artículo 4 y artículo 5). Para ello, se fueron ampliando el número de fracciones hasta optimizar el protocolo en el CBA a 24 horas y con una exposición de 100 mg equiv/ml de vianda en una muestra control negativa tipo. Se priorizó:

- La eliminación del efecto matriz que permitiera la cuantificación del efecto tóxico.
- La reducción del número de fracciones para simplificar el protocolo de purificación de la muestra.
- La utilización de suficiente volumen/fracción para asegurar la elución de las moléculas lipofílicas del C-18.

4.3.3 Optimización del método para la detección y la semicuantificación en rutina

4.3.3.1 Cálculos de la toxicidad de muestras en fracciones

Las cuantificaciones de los efectos tóxicos para muestras lipofílicas se realizaron en OA equivalentes, a fin de utilizar una "moneda única" y poder sumar toxicidades.

Es importante en la evaluación toxicológica de una muestra el poder disponer de un sistema de la cuantificación de efecto tóxico total, pero el hecho de tener el total de la muestra fraccionada en 16 fracciones (la fracción número uno no se tiene en cuenta para esta evaluación), complica un poco la estimación.

4.3.3.1.1 Los parámetros seguidos para la estimación del efecto tóxico de una fracción

En la exposición a muestras negativas por MBA para toxinas DSP, la estimación de viabilidad en las fracciones se determinó que era aproximadamente del 100% con una desviación estándar inferior a ± 10 . Por ese motivo se determinó que el límite de detección de toxicidad debía ser el 10% de mortalidad.

Sin embargo, el rango de cuantificación del efecto tóxico del OA se estableció entre el 20 y 80% de toxicidad, dado que entre esos puntos se pudo observar una buena linealidad en la sigmoideal que representa la curva dosis-respuesta y un error estándar aún más acotado (por debajo del $\pm 3\%$).

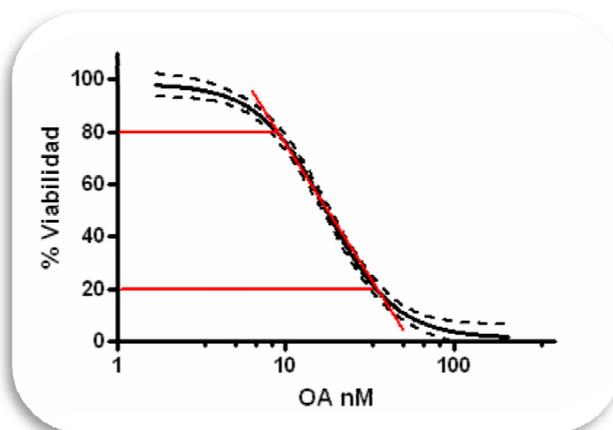


Figura 22: Curva dosis-respuesta común del OA en células NG108-15. El eje de las ordenadas representa las estimaciones de viabilidad usando el porcentaje de reducción de MTT. Se utilizan datos de 12 experimentos independientes en placas de 96 pocillos a una densidad 25 000 y 50 000 células/pocillo en células NG108-15. Las exposiciones fueron de 24 y 48 horas en placas con células que habían sido sembradas 24 y 1 hora antes, respectivamente. La línea discontinua marca la banda de confiabilidad (con un 95% de probabilidad). En rojo, los rangos para asegurar una cuantificación del efecto tóxico en la zona donde se presenta buena linealidad en la sigmoide que describe la curva dosis-respuesta del OA.

Las estimaciones de toxicidad expresadas en μg equivalentes de OA/kg de muestra (en cada fracción) dependen, de esta manera, de la concentración de exposición:

Toxicidad	Categoría	A 100 mg equiv/ ml		A 50 mg equiv/ ml	
		Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel mínimo	Nivel máximo
inferior al 10% de mortalidad	no detectable (nd)	0	47	0	93
entre 10-20% de mortalidad	no cuantificable (nq)	47	71	93	142
entre 20-80% de mortalidad	cuantificable	valor - sd	valor + sd	valor - sd	valor + sd
superior al 80% de mortalidad	toxicidad superior a un valor conocido	> 282	> 282	> 564	> 564

Tabla 4: Tabla esquema de la cuantificación (en μg equivalentes de OA/kg) del efecto tóxico por fracción en función de los valores de mortalidad obtenidos y de la concentración de la exposición.

4.3.3.1.2 Los parámetros seguidos para la estimación del efecto tóxico de una muestra fraccionada

La estimación de la toxicidad de la muestra se hizo en función de la aproximación a un valor mínimo y máximo de toxicidad.

Estimación de la toxicidad detectada

El valor de toxicidad mínimo se obtuvo mediante la suma de los valores mínimos de toxicidad estimados en cada una de las fracciones donde se detectó toxicidad.

Toxicidad	Categoría	A 100 mg equiv/ ml		A 50 mg equiv/ ml	
		Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel mínimo	Nivel máximo
entre 10-20% de mortalidad	no cuantificable (nq)	47	71	93	142
entre 20-80% de mortalidad	cuantificable	valor - sd	valor + sd	valor - sd	valor + sd
superior al 80% de mortalidad	toxicidad superior a un valor conocido	> 282	> 282	> 564	> 564

Tabla 5: Tabla esquema de la cuantificación (en µg equivalentes de OA/kg) del efecto tóxico mínimo detectado.

Según la concentración de muestra expuesta o los valores de toxicidad obtenidos. Sumariamos los correspondientes valores en negrita por cada una de las fracciones donde se detectó efecto tóxico.

El valor de toxicidad máximo se obtuvo mediante la suma de los valores máximos de toxicidad estimados en cada una de las fracciones donde se detectó toxicidad.

Toxicidad	Categoría	A 100 mg equiv/ ml		A 50 mg equiv/ ml	
		Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel mínimo	Nivel máximo
entre 10-20% de mortalidad	no cuantificable (nq)	47	71	93	142
entre 20-80% de mortalidad	cuantificable	valor - sd	valor + sd	valor - sd	valor + sd

Tabla6: Tabla esquema de la cuantificación (en µg equivalentes de OA/kg) del efecto tóxico máximo detectado.

Según la concentración de muestra expuesta o los valores de toxicidad obtenidos. Sumariamos los correspondientes valores en negrita por cada una de las fracciones donde se detectó efecto tóxico.

En el caso de que alguna de las fracciones supere el 80% de mortalidad sólo se puede estimar el valor mínimo de toxicidad. Sólo podemos decir que la toxicidad de la muestra es superior al valor mínimo estimado.

Estimación de la toxicidad potencial

Se hace prácticamente de la misma manera que la estimación de toxicidad detectada sólo que para la estimación del valor máximo de toxicidad se tienen en cuenta también las fracciones en las que no se han detectado toxicidad:

Toxicidad	Categoría	A 100 mg equiv/ ml		A 50 mg equiv/ ml	
		Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel mínimo	Nivel máximo
inferior al 10% de mortalidad	no detectable (nd)	0	47	0	93
entre 10-20% de mortalidad	no cuantificable (nq)	47	71	93	142
entre 20-80% de mortalidad	cuantificable	valor - sd	valor + sd	valor - sd	valor + sd
superior al 80% de mortalidad	toxicidad superior a un valor conocido	> 282	> 282	> 564	> 564

Tabla 7: Tabla esquema de la cuantificación (en µg equivalentes de OA/kg) del efecto tóxico máximo potencial.

Según la concentración de muestra expuesta o los valores de toxicidad obtenidos. Sumariamos los correspondientes valores en negrita por cada una de las fracciones.

Este tipo de cuantificación tiene más sentido utilizarlo en el estudio de la presencia de una toxina concreta en el que se centra en un número concreto de fracciones, tal y como se hizo para el OA en el artículo 4.

4.3.3.1.3 Diferenciación cualitativa

Teniendo en cuenta los resultados cualitativos de diferenciación de efectos tóxicos de las diferentes toxinas y condiciones experimentales estudiadas en este trabajo, se pudo observar que cada una de las toxinas estudiadas presenta un perfil diferenciado (tabla 8). Sin embargo, mantener todas las pruebas en un rastreo rutinario sería inviable.

En el diseño experimental del análisis de toxinas lipofílicas en extractos de muestras de mejillón fraccionadas se escogieron dos condiciones experimentales en células NG108-15 teniendo en cuenta la naturaleza de las toxinas que se deben controlar (OA y derivados, AZAs y YTXs, principalmente): la exposición clásica de 24 horas en placas de 24 horas de crecimiento y la exposición de 48 horas en placas de 1 hora de crecimiento.

La prioridad en el diseño del CBA fue la detección y semicuantificación de los efectos tóxicos globales que presenta la muestra. Sin embargo, tanto la elución de las toxinas en las diferentes fracciones como la comparación de los efectos tóxicos en las diferentes condiciones experimentales nos permitieron dar una aproximación cualitativa del contenido tóxico de la muestra

Tiempo de exposición (h)	48		24		24		3		24		24		24		EN GENERAL	FRACCIONES
	1		1		1		3		24		24		24			
Tiempo entre la siembra y la exposición (h)	SIN		CON		SIN		CON		SIN		CON		CON			
Ensayo con O/V (10:1)	SIN		CON		SIN		CON		SIN		CON		CON			
Ensayo con O/V (1:1)	SIN		CON		SIN		CON		SIN		CON		CON			
Respecto a toxicidad en N2a	SIN		CON		SIN		CON		SIN		CON		CON			
Elución en protocolo de 17 fracciones	SIN		CON		SIN		CON		SIN		CON		CON			
STX	-	NE	++	NE	++	+++	igual/inf	-								
PbTx-3	-	NE	++	NE	++	+++	igual/inf	-								
P-CTX	-	-	-	-	-	-	-	-	NE	NE	+++	+++	igual	-		
PITX	-	+	+++	NE	NE	NE	NE	NE	+++	+++	+++	-	igual	-		
DA	-	+++/NE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	sup/igual	-		
OA	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	igual	5, 6		
DTX-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	igual	7		
PTX-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	sup	6, 7		
YTX	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	3, 4		
AZA-1	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	8, 9 ?		

Tabla 8: Tabla resumen de diferenciación cualitativa del efecto tóxico de las toxinas estudiadas en las diferentes condiciones de este trabajo.

La columna de "FRACCIONES", se refiere al número de las fracciones donde eluyen las toxinas en el protocolo descrito en el artículo 4. En rojo, los resultados que caracterizan, para esa toxina, un comportamiento tóxico diferente al resto de toxinas analizadas. El guión (-), en aquellos ensayos que no se han realizado. NE: no hay efecto tóxico en las condiciones estudiadas. Las "++" indican toxicidad de leve (+) a elevada (+++). En azul, las que contrarrestan el efecto de la O/V. La "/" indica la variación de resultados obtenidos en esas condiciones en diferentes días de experimentación.

4.3.3.2 Evaluación del método de las 17 fracciones para muestras negativas

Para la exposición de 100 mg equiv/ml a 24 horas (artículo 4), las muestras control negativas presentaron $100 \pm 10\%$ de viabilidad en las fracciones 2-17 con excepciones de pequeños incrementos de viabilidad o mortalidad (hasta $\pm 15\%$) en las fracciones 8 y 13 en algunas de las muestras negativas para DSP en MBA estudiadas. Estas toxicidades pueden ser ocasionadas por leves efectos matriz en función de la composición de la matriz de mejillón, o bien, por bajas concentraciones de toxinas no detectables o no buscadas (toxinas desconocidas) en el análisis por LC-MS/MS.

En las mismas muestras estudiadas una exposición de 50 mg equiv/ml a 48 horas, presentan diferencias en las estimaciones de viabilidad de las fracciones que, en general, supone un incremento en la estimación de la toxicidad general de la muestra (artículo 5).

4.3.3.3 Evaluación del método para el spiking de toxinas conocidas (OA, DTX-1, PTX-2, YTX y AZA-1)

En el artículo 4, se demostró que la elución del OA en las fracciones determinadas es independiente de la presencia o no de diferentes matrices de mejillón, con una recuperación del 90%.

Los análisis de las muestras negativas en DSP cargadas con concentraciones de OA, DTX-1, PTX-2, YTX y AZA-1 en el límite de aceptación (para cada una de ellas) por la legislación vigente, mostraron que el ensayo es capaz de detectar y semicuantificar el efecto tóxico en todas ellas con la excepción de la YTX a 48 horas de exposición en la que sería necesaria una dilución superior a 50 mg/ml para la semicuantificación.

Dado a un problema en la estabilidad del AZA-1 en presencia de matriz de mejillón, para la evaluación del método (capacidad de detección, semicuantificación e identificación semicualitativa) frente a este tipo de toxinas se deberían volver a

repetir los análisis con muestras naturales con contenidos de AZA-1 o material de referencia con niveles de toxina en torno a los límites legales.

En relación al estudio semicualitativo de los resultados, el método permitió localizar cada toxina estudiada en una o dos fracciones:

Toxina	Fracción
OA	5 y 6
DTX-1	7
PTX-2	6 y 7
YTX	3 y 4
AZA-1	8 y 9*

Tabla 9: Tabla resumen de la elución de las toxinas estudiadas en el protocolo de las 17 fracciones.

*Probable, pero no confirmado por LC-MS/MS.

Esto se cumple a concentraciones en torno al límite de aceptación de los niveles de legislación. Sin embargo, en condiciones de saturación del cartucho por exceso de toxina, se pueden ampliar el número de fracciones donde eluyen, tal y como se observó en la muestra A.

Además, esta batería de experimentos nos permitió observar que:

Es muy probable la transformación de estas moléculas tóxicas en otras con diferentes propiedades fisicoquímicas (caen en diferentes fracciones a las de la molécula de origen) y biológicas (presentan diferencias en la respuesta tóxica con la molécula de origen) en presencia de matriz de mejillón.

La toxicidad que presentan las toxinas purificadas puede verse alterada por las condiciones del protocolo (p.e.: caso de la PTX-2). Se deben estudiar los posibles sinergismos positivos o negativos de la matriz de mejillón en los análisis toxicológicos.

4.3.3.4 Evaluación del método para muestras positivas

En relación a los resultados obtenidos por LC-MS/MS, las muestras positivas en DSP por MBA resultaron contener principalmente YTXs (YTX, OHYTX y HomoYTX) a unas concentraciones por debajo del límite legal de aceptación pero puede que

suficientes para dar positivo en el MBA. Además, se detectan también pequeñas concentraciones de espirólido 1 (SPX-1) y PTX-2sa. Sin embargo, estas concentraciones no parecían ser suficientes para generar una respuesta tóxica en el CBA (artículo 5):

o SPX-1:

Son concentraciones muy bajas (no detectables por LC-MS/MS) y en ensayos con toxina purificada no se observó una señal tóxica a 24 horas de exposición superior al 10% de toxicidad en concentraciones de hasta 100 nM (datos no mostrados).

Una de las muestras control negativa es la que presentó mayor concentración de SPX-1.

Además, no se da ninguna fracción tóxica común en todas las muestras con SPX-1 en ninguna de las dos condiciones experimentales.

Así que, si participa en el efecto tóxico de alguna de las fracciones de las muestras éste debe ser cercano al límite de detección, de tal forma que sea detectable en algunas muestras mientras que en otras no.

o PTX-2sa:

Las tres muestras presentaron concentraciones muy similares (entre 12 y 17 µg PTX-2sa/kg) y no se dan fracciones tóxicas comunes entre las 3 en la condición experimental 1. En la condición experimental 2, sólo se dio toxicidad común en la fracción 11, pero las toxicidades en estas fracciones no se correlacionan con las concentraciones de toxina cuantificada. Por lo tanto, o no son concentraciones suficientes para generar respuesta tóxica o bien están justo en el límite y algunas de ellas las presentan y otras no.

De esta manera, las toxicidades observadas de algunas fracciones pueden estar relacionadas con la presencia de OA y sus análogos (fracción/muestra: 11/A, 12/A, 9/C, 11/C) o la presencia de homoYTX en una muestra (fracción/muestra: 4/G) y las bajas concentraciones de YTX, homoYTX, OHYTX, PTX-2sa y SPX-1 pueden participar en la respuesta tóxica de la exposición de algunas de las fracciones de las

muestras. Pero teniendo en cuenta que en el fraccionamiento las moléculas suelen eluir en una o dos fracciones seguidas, a lo sumo (en situación de no saturación), las combinaciones de estas toxinas en las muestras no pueden explicar, ni de forma cualitativa ni cuantitativa, todas las toxicidades que se presentaron en las fracciones de las muestras. Por lo tanto, parece más que evidente que gran parte de las toxicidades presentes en las muestras pueden ser causadas por otras moléculas o derivados no identificados de las moléculas detectables en el análisis de LC-MS/MS.

Teniendo en cuenta los resultados semicuantitativos de las toxicidades totales estimadas de las muestras positivas, se observó que sólo la muestra C tiene una equivalencia tóxica similar a la de las muestras control negativas. Las toxicidades observadas en el resto de muestras deben ser estudiadas a fin de determinar qué compuestos son los responsables y que peligro potencial tienen para la salud pública.

4.3.3.4.1 Toxicidad de los incrementos de viabilidad

En muestras naturales positivas se encontraron fracciones en las que se da un incremento anormal de la estimación de la viabilidad (superior al 120%). Estos incrementos anormales en la actividad mitocondrial celular pueden explicarse por la presencia de moléculas bioactivas que deben ser consideradas también en el estudio toxicológico de la muestra. Se deben aislar las moléculas responsables y analizar qué peligro potencial tienen para la salud pública.

4.3.3.5 Puntos positivos y negativos en el CBA como método de rastreo

4.3.3.5.1 Discriminación entre muestras positivas y negativas.

Para la puesta a punto del método, se tuvieron en cuenta los límites cuantitativos legales a fin de poder asegurar la detección de las toxinas estipuladas a las concentraciones legales determinadas. Sin embargo, para establecer unos límites de discriminación cuantitativos y cualitativos se debería tener en cuenta que los

valores de toxicidad siempre son relativos al método que se utiliza y por lo tanto o se generan factores de corrección para las toxinas conocidas a fin de relacionar toxicidades generales del CBA con las obtenidas en el MBA (por ser el método toxicológico oficial), o bien, se establecen límites de discriminación diferentes en función de los datos empíricos tal y como se hizo para el MBA en su momento. La primera opción sería mucho más eficiente si resultara que la mayoría de toxicidades de las muestras estuvieran causadas por la presencia de toxinas conocidas. Pero teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las muestras naturales analizadas, éste no parece ser el caso.

Para establecer unos límites propios del CBA, una de las opciones sería relacionar los resultados obtenidos para las mismas muestras por distintos métodos oficiales (MBA y cromatografía líquida, principalmente) que sirva de referencia comparativa con los resultados obtenidos por el CBA. De esta manera, se tendrían en cuenta tanto los límites de toxinas conocidas, que marca la legislación vigente, como las posibles toxicidades causadas en organismos complejos por moléculas desconocidas.

Para el CBA se podrían establecer:

- Los límites semicuantitativos de toxicidad general (uno para cada condición experimental), que discriminen entre muestras negativas y positivas en concentraciones de toxinas marinas lipofílicas que supongan un riesgo para la salud pública.
- Una aproximación semicualitativa sobre la presencia de toxinas conocidas en función de las fracciones de elución y la respuesta tóxica frente a diferentes condiciones de experimentación.

Puede que la solución más segura, tanto en la sustitución del MBA como en el uso del MBA, sea la combinación de métodos toxicológicos, funcionales y analíticos a fin de confirmar resultados por diferentes vías.

4.4 Resumen de las aportaciones científico-técnicas de este trabajo

La principal aportación de este trabajo recae en la visión totalmente aplicada de optimización de un CBA teniendo en cuenta los sistemas vigentes de regulación de toxinas marinas (tanto los diferentes tipos como sus niveles) presentes en productos alimentarios de origen marino. De esta manera, nos aproximamos aún más al uso real de los CBAs como metodología toxicológica alternativa al uso de animales de experimentación en este campo. En esta labor, se plantearon dos flancos importantes a abordar: la seguridad en la detección de toxinas marinas y la optimización del ensayo para un rastreo práctico de las muestras.

4.4.1 Seguridad en la detección de toxinas

Para trabajar bajo condiciones de detección segura de las toxinas marinas implicadas en los episodios tóxicos fue necesario seguir los puntos descritos a continuación:

- Selección de un CBA óptimo

En este ámbito, hasta la publicación de este trabajo, se habían desarrollado CBAs teniendo en cuenta la evaluación de la toxicidad general producida en tipos celulares no específicos para las toxinas abordadas (Diogène et al., 1995; Fladmark et al., 1998; Hamano et al., 1985; Huynh-Delerme et al., 2003; Leira et al., 2001; Tubaro et al., 1996b), o bien, en CBAs diseñados específicamente para la detección de toxinas dependientes de VGSCs (Gallacher and Birkbeck, 1992; Jellett et al., 1992; Kogure et al., 1988; Manger et al., 1995) o de otras neurotoxinas (Berman and Muray, 1997; LePage et al., 2005).

En este punto, la relevancia de este trabajo recae en la selección de un tipo celular y de unas condiciones experimentales para el CBA capaces tanto de evaluar toxicidades específicas (provocadas por neurotoxinas) como toxicidades de los otros principales grupos de toxinas marinas. En esta tarea, tiene también importancia el gran esfuerzo en la estimación de parámetros para evaluar la sensibilidad, capacidad de cuantificación y repetitividad del CBA que aseguraran la robustez del

método. Esta aproximación permite obtener valores de toxicidad general con la seguridad de que el CBA escogido es óptimo para la detección de los niveles regulados de toxinas marinas en alimentos.

- Selección de un protocolo óptimo en la extracción de toxinas lipofílicas

En relación a los estudios previos, las extracciones lipofílicas de toxinas en moluscos para su estudio en CBAs, se basan en tres tipos: extracciones mediante metanol-agua (Leira et al., 2003; Tubaro et al., 1996b), metanol calentado (Nasser et al., 2008) o acetona (Crocì et al., 2001; Flanagan et al., 2001; Malaguti et al., 2002; Plakas et al., 2002). En este trabajo se escoge la extracción acetónica, a pesar de los problemas en CBAs relacionados con las interferencias por efecto matriz (Malaguti et al., 2002; Nasser et al., 2008), para asegurar la misma recuperación lipofílica que en el MBA.

- Detección de las toxinas en extractos acetónicos de moluscos

El rastreo de toxinas lipofílicas en extractos acetónicos se había focalizado hasta el momento en la detección de diferencias significativas entre muestras positivas y negativas determinadas previamente por MBA (Crocì et al., 2001; Flanagan et al., 2001). Este tipo de aproximación permite un rango mayor de interferencias provocadas por la matriz arrastrada, y puede funcionar en muestras de contenido elevado en toxinas. Sin embargo, da mayor error en concentraciones en torno a los límites regulados.

Con el protocolo de 17 fracciones de este trabajo, se aumenta la complejidad metodológica. Sin embargo, esto permite detectar contenidos por debajo de los niveles regulados de las toxinas estudiadas y, a su vez, dar una aproximación cualitativa hacia el/los tipo/s de toxina/s que se presentan en la muestra.

4.4.2 Optimización del protocolo para su práctico uso en rastreo

Para la optimización del ensayo hacia un uso rutinario de rastreo, fue necesario:

- Selección de un CBA óptimo

La evaluación de la viabilidad en células NG108-15 mediante la reducción del MTT, supone una reducción en la complejidad y tiempo del protocolo en relación a otros ensayos tales como el uso de cultivos primarios (Beani et al., 2000; Vale et al., 2006), otros métodos generales de estimar toxicidad general (Diogène et al., 1995; Oteri et al., 1998) o detección de efectos tóxicos específicos (Leira, F. et al., 2003; Molgó et al., 1993; Pierotti et al., 2003), que obtuvieron también buenos resultados en la detección de toxinas marinas.

- o Cuantificación de los efectos tóxicos

En este trabajo se reduce la concentración usada para algunas toxinas en la generación de curvas patrón, para la cuantificación de los efectos tóxicos, mediante el uso de una curva combinada de diferentes experimentos.

- o Optimización del protocolo de fraccionamiento como herramienta de purificación del extracto

Algunos trabajos anteriores ((Bottein Dechraoui et al., 2005; Dickey et al., 1999) y nuestros primeros pasos en la purificación de extractos lipofílicos (artículo 3), se basan en el desarrollo de largos protocolos de fraccionamiento en fase sólida para reducir los efectos matriz del extracto acetónico de moluscos en CBAs. Estos protocolos resultan ser más efectivos en la purificación de compuestos bioactivos aunque, por otra parte, su complejidad implicaba la imposibilidad de su aplicación en el rastreo rutinario. En este trabajo, se optimiza el uso del fraccionamiento en fase sólida con el mínimo de fracciones necesarias para reducir el efecto matriz en el CBA para la cuantificación del efecto tóxico en torno a los niveles legislados. Esta optimización del protocolo se realiza teniendo en cuenta que se puedan cuantificar los efectos tóxicos de todas las toxinas estudiadas, sin interferencias y asegurando la elución de moléculas lipofílicas del cartucho utilizado en el fraccionamiento.

4.5 Principales puntos futuros de estudio para el desarrollo completo del método

En base a los resultados y las conclusiones derivadas de este trabajo, se pueden identificar los principales puntos de estudio que deberían ser ampliados para el desarrollo completo del método previo a los estudios de validación:

Se debería ampliar el conocimiento sobre la identificación de los derivados no identificados de toxinas lipofílicas o bien nuevos compuestos tóxicos, mediante la combinación del tándem del CBA y métodos analíticos. El sistema permite múltiples ensayos, que junto a otros análisis funcionales pueden llegar a estimar el potencial tóxico de los nuevos compuestos en humanos. Para la purificación más exhaustiva de las moléculas nuevas a describir es más útil seguir un protocolo de purificación similar al utilizado en el artículo 3.

La optimización del método también debería ser ampliada hacia toxinas lipofílicas dependientes de VGSCs (como las PbTx_s), toxinas hidrofílicas dependientes o independientes de VGSCs, la detección con y sin matriz del DA y análogos funcionales, y el estudio en otras matrices (ostrón, vieiras, etc) para todos los grupos de toxinas.

Las últimas recomendaciones científicas publicadas sugieren el cambio de límites legales de toxinas marinas (tabla 10).

Toxinas	límites aceptados µg toxina equiv /kg	límites propuestos µg toxina/kg
OA y derivados	160 (OA)	45 (OA)
DTXs	160 (OA)	45 (OA)
PTXs	160 (OA)	120 (PTX-2)
YTXs	1000 (YTX)	3750 (YTX)
AZAs	160 (AZA-1)	30 (AZA-1)
PSPs	800 (STX)	75 (STX)
DA	20 000 (DA)	4 500 (DA)

Tabla 10: Opiniones Científicas sobre Biotoxinas Marinas del Panel de Contaminantes de la EFSA en 2009. Para cada grupo de toxinas, entre paréntesis la toxina referencia en la que se expresan los µg de toxina equivalentes/kg.

En ese caso, se debería optimizar el protocolo para trabajar con los mg equivalentes de vianda por mililitro necesarios para poder detectar y cuantificar los nuevos límites.

Toxinas	límites aceptados	límites propuestos	según los límites aceptados	según los límites propuestos
	µg toxina/kg	µg toxina/kg	mg equiv/ mL	mg equiv/ mL
OA	160	45	91	322
DTX-1	160 equiv de OA ^a	45 equiv de OA ^a	61	215
PTX-2	160 equiv de OA ^a	120	5	7
YTX	1000	3750	6-20	2-5
AZA-1	160	30	11-58	56-309

Tabla 11: Tabla resumen de los cálculos de la concentración de exposición de la muestra en el CBA en función de las toxinas estudiadas en los límites de detección aceptados actualmente y los propuestos. En esta tabla se muestra, para cada una de las toxinas estudiadas, la concentración de muestra equivalente (mg equiv/ml) necesaria en la exposición, para la carga de una concentración de toxina equivalente a su EC50 (teniendo en cuenta los valores del artículo 2) en el CBA optimizado. En gris, los resultados para el CBA a 24 horas de exposición. En rojo, los resultados para el CBA a 48 horas de exposición.

^a La legislación indica que los niveles aceptados serán aquellos que no sean superiores a 160 equivalentes de OA.

Tras el análisis de este trabajo, la posibilidad de optimizar un método toxicológico alternativo al MBA, sensible y fiable se hace real. Su aplicación implicará tanto la reducción del uso de animales de experimentación de forma rutinaria como la mejora en la calidad metodológica al permitir realizar estadísticas más fiables gracias a la posibilidad de múltiples réplicas o ensayos de forma paralela. Puede o no ser la línea NG108-15, ni las exposiciones a 24 horas y 48 horas, ni el ensayo MTT, ni el protocolo de purificación de 17 fracciones las herramientas finales óptimas para la validación de un método simple y capaz de detectar concentraciones de toxinas marinas en alimentos que pongan en peligro la salud pública. Independientemente a ello, este trabajo supone un gran avance y un punto clave de referencia para su desarrollo.