

**Desarrollo de métodos alternativos para la detección de toxinas marinas:
DETECCIÓN DE VENENO PARALIZANTE DE MOLUSCOS MEDIANTE BIOENSAYO
CELULAR PARA MONITOREOS RUTINARIOS DE MAREA ROJA**

Seminario Internacional 24 de Agosto de 2017



Dra. Allisson Astuya Villalón

Lab. Cultivo Celular y Bioensayos Celulares

COPAS SUR AUSTRAL

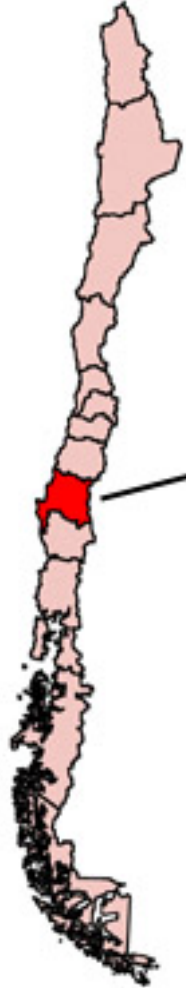
Departamento de Oceanografía

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas, Casilla 160-C, Universidad de Concepción,
Chile. *aastuya@udec.cl





Universidad de Concepción



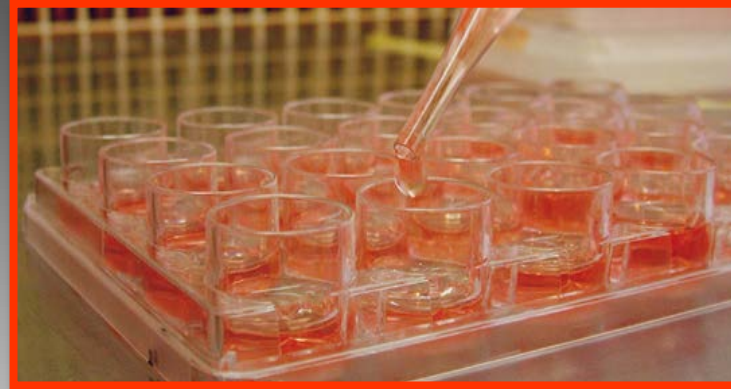
Laboratorio de Cultivo Celular y Genómica Marina

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción



Cultivos celulares

Organismos acuáticos y
mamíferos



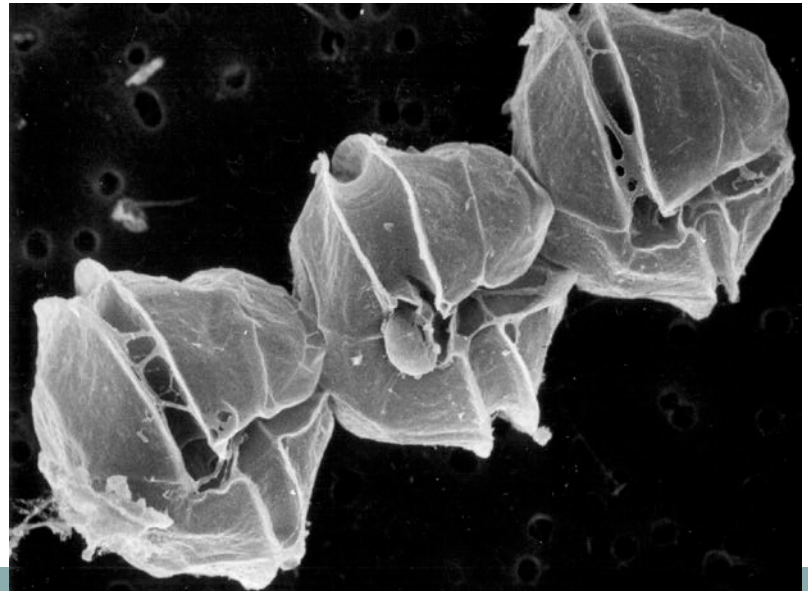
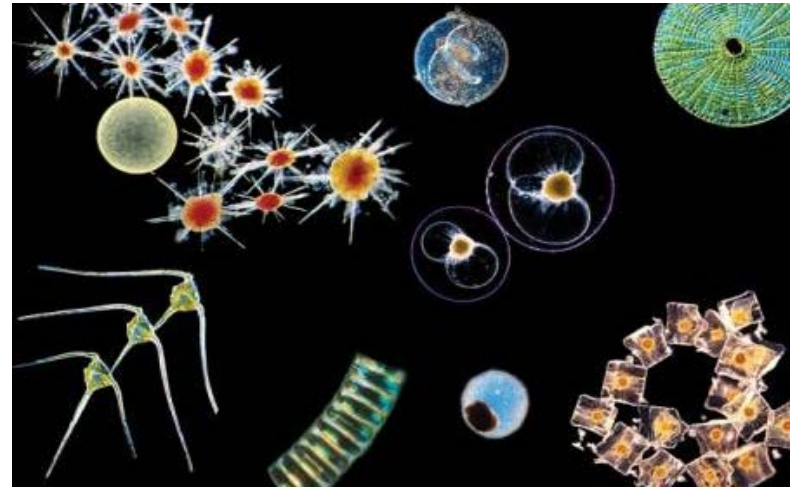
BIOENSAYOS CELULARES

- Ensayos Toxicológicos (Toxinas Marinas)
- Marcadores moleculares de inmunidad
- Marcadores subletales de contaminación

- Moléculas con actividad biológica de organismos acuáticos para uso biotecnológico y biomédico

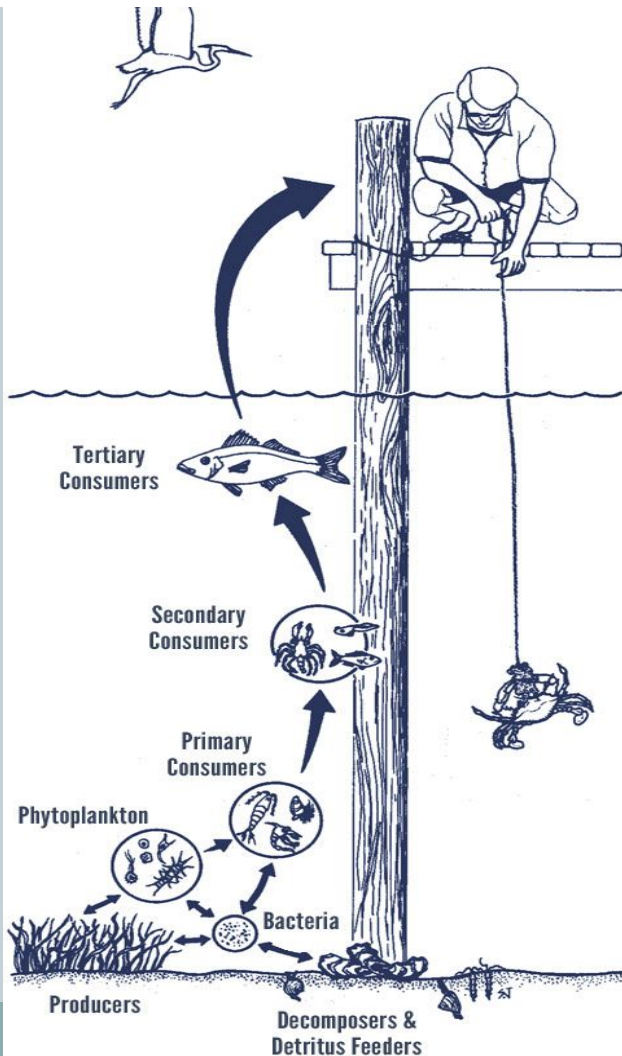
Biotechnología marina

Floraciones algales nocivas



Problemática de las biotoxinas marinas

PSP-Flujo de toxinas paralizantes en la cadena trófica

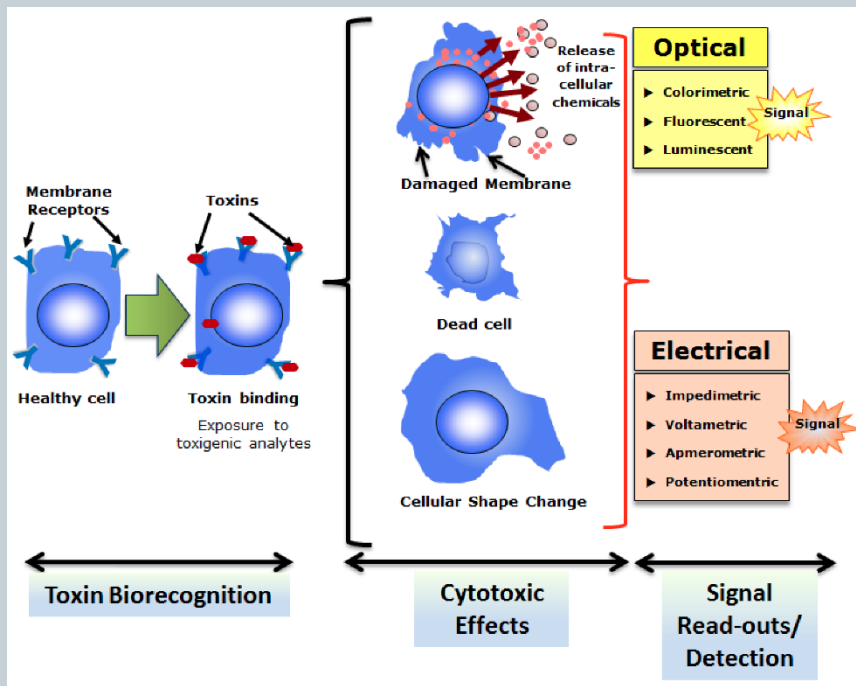


Los sistemas de vigilancia están diseñados para:

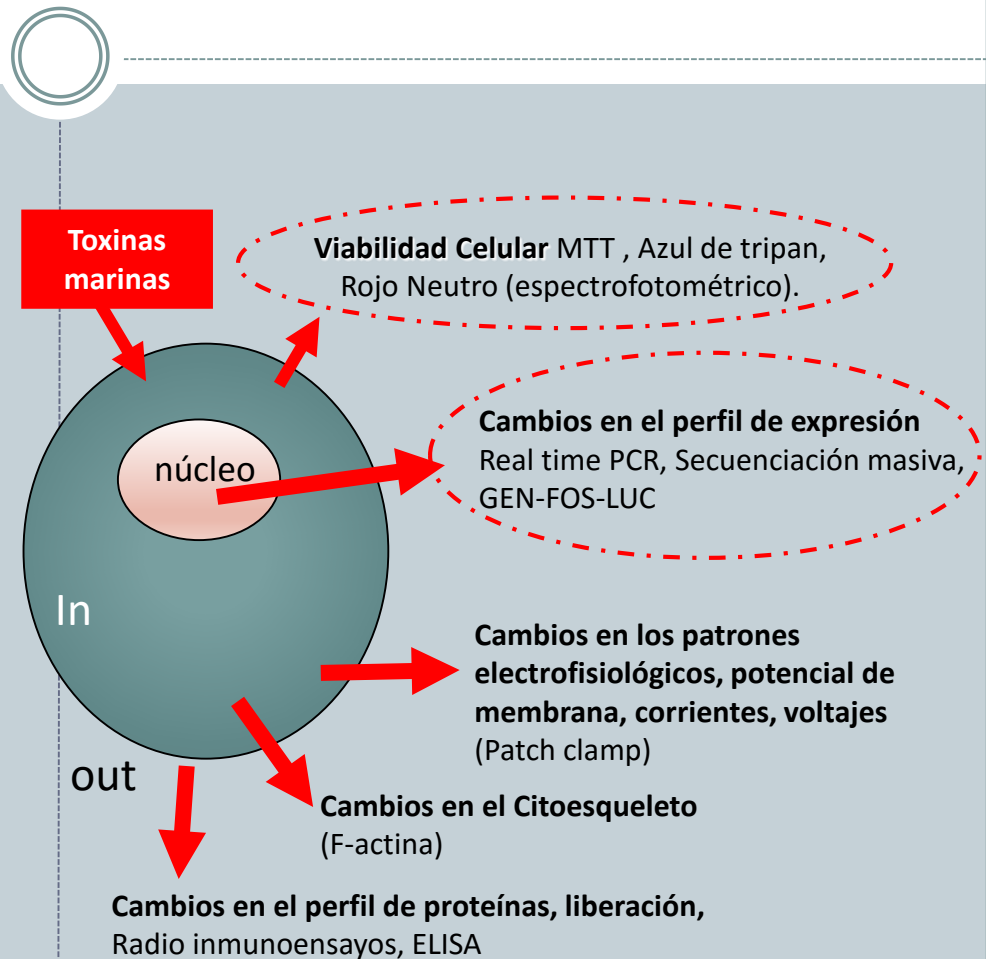
- La protección del consumidor
- Fortalecer el desarrollo del sector de producción dando cumplimiento a las exigencias internacionales

La investigación tiene un papel clave

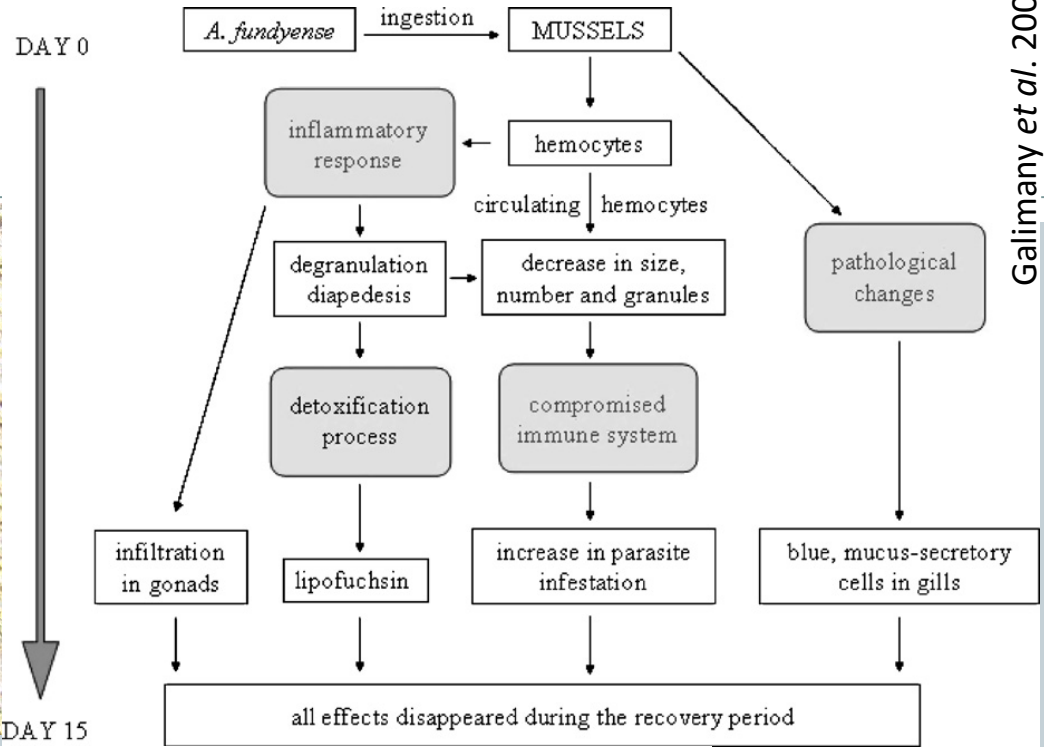
Ensayos alternativos para la detección de toxinas marinas



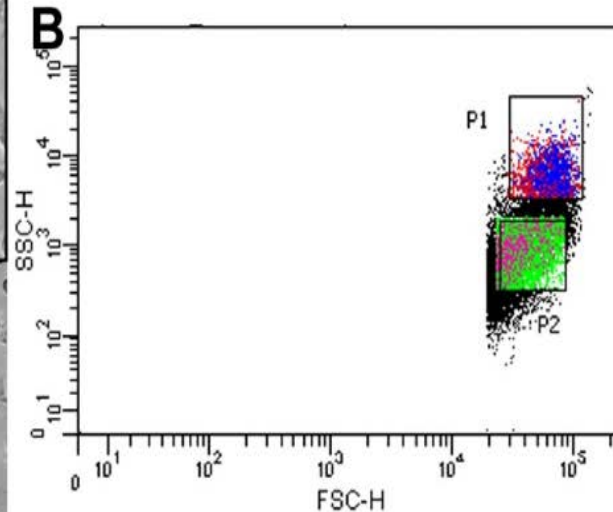
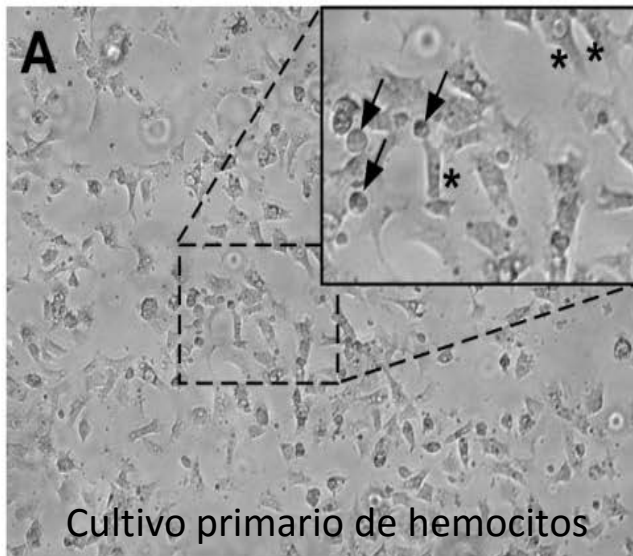
Banerjee et al. 2013. Toxins



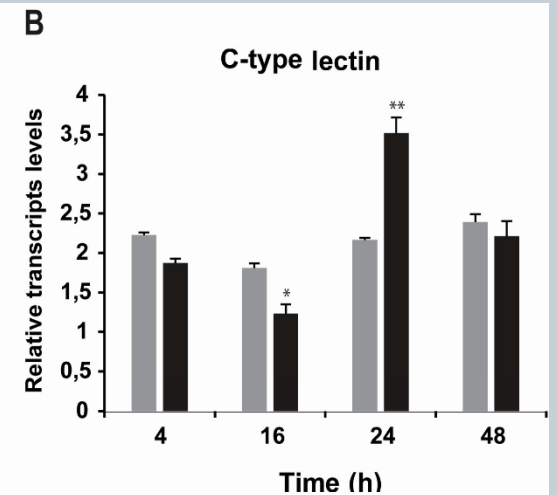
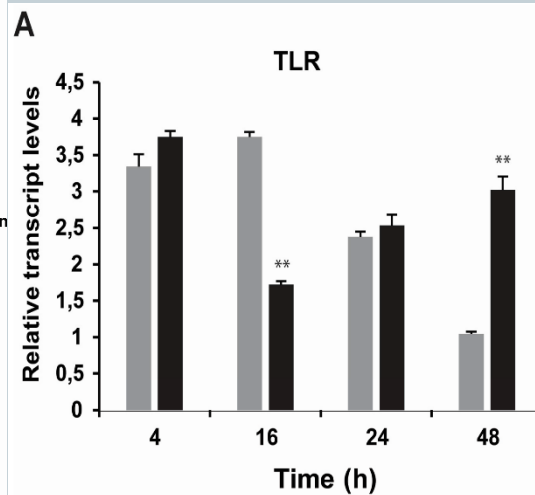
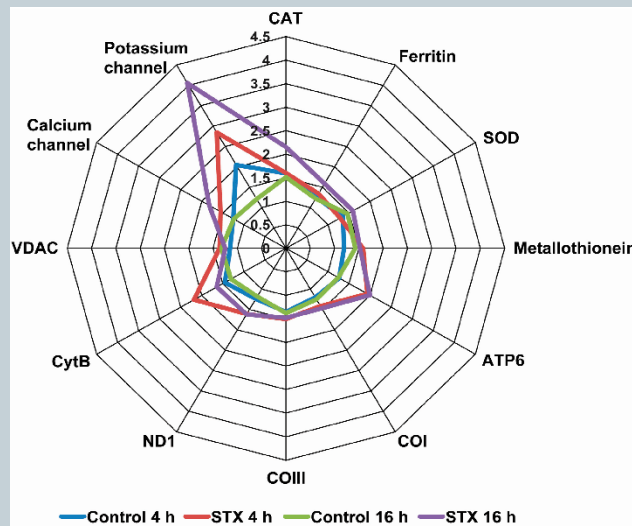
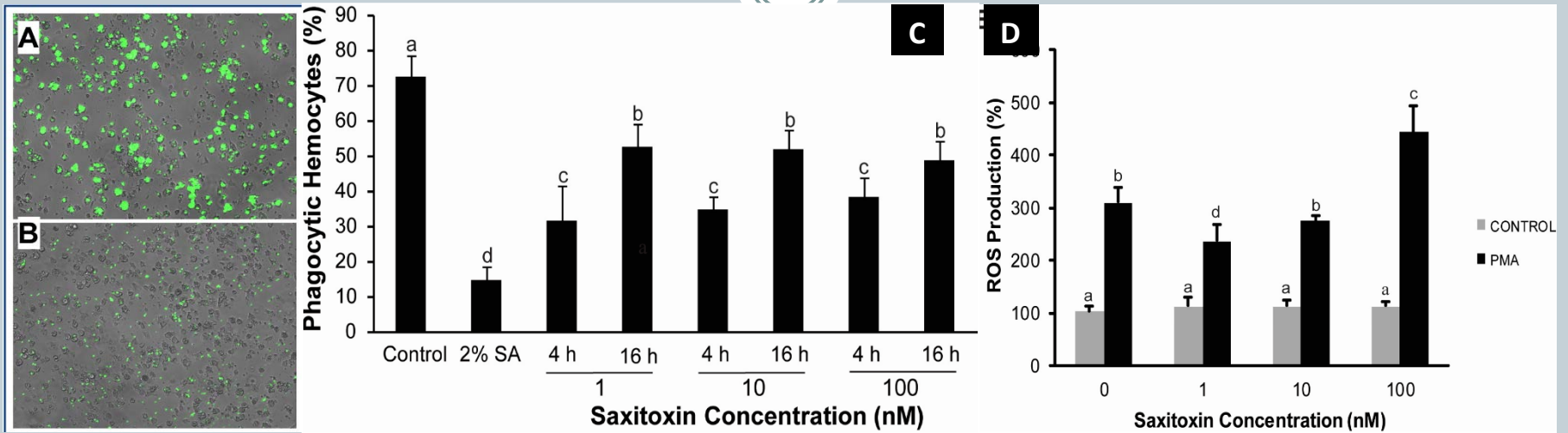
Efectos de toxinas en los bivalvos



Galimany et al. 2008

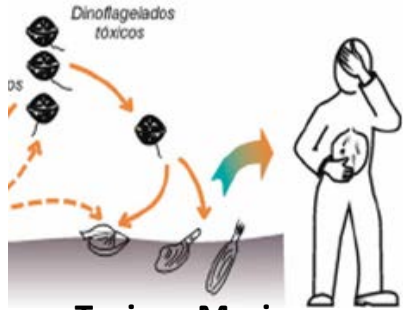


Evaluación de los efectos de saxitoxina sobre la fagocitosis, la producción de especies reactivas de oxígeno y la expresión de genes en cultivo primario de hemocitos



Toxinas Marinas: un problema en salud pública

Necesidad de métodos toxicológicos de screening complementarios a los métodos oficiales



**Toxinas Marinas
Problema
Salud pública**

**507 intoxicados y 34
casos letales (IFOP 2010)**



**Único Método oficial: BR
Éticamente criticado**

El año 2010 se usaron
162.726 ratones
Incluye SEREMIS de Salud, el
ISP y Laboratorios privados

EN

Official Journal of the European Union

COMMISSION REGULATION (EU) No 15/2011

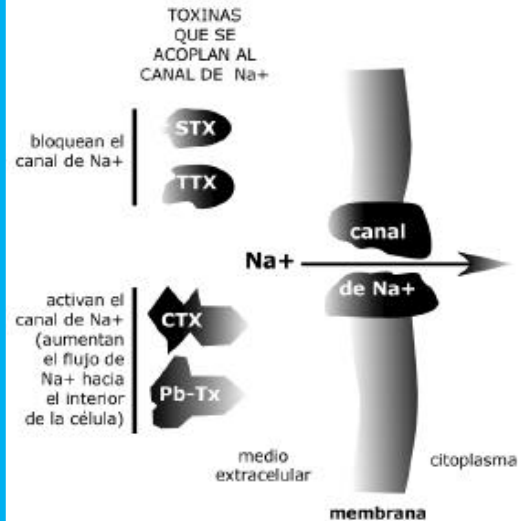
of 10 January 2011

amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs

(Text with EEA relevance)

**¿Disminución del límite permitido?
Bajo 60ug/100g carne "Incerteza Metodológica"**

EL CANAL DE SODIO COMO
MODELO DE ESTUDIO



ENSAYOS QUE EMPLEAN
EL CANAL DE SODIO PARA LA DETECCIÓN
Y CUANTIFICACIÓN DE TOXINAS

ENSAYOS DE RECEPTOR

obtención de sinaptosomas
(preparaciones de membranas de
células neuronales ricas en canales de Na+)

ensayos de receptor que evalúan la competencia
entre las toxinas que se acoplan a los
canales de Na+ (STX, TTX, CTX y Pb-Tx)
y STX* o TTX* radioactivas

ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

cultivos de células neuronales
ricas en canales de Na+
exposición de los cultivos a las muestras
medida de la viabilidad celular modulada
por los cambios en las concentraciones
de Na+ intracelular

Programas de Vigilancia



VPM
(SXT)

Nuestro Objetivo

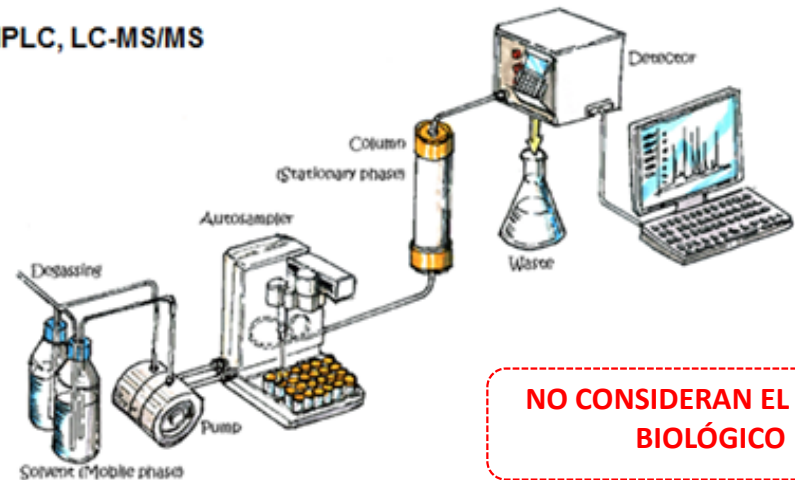
Seleccionar e Implementar métodos de screening basados en bioensayos celulares para la detección y semicuantificación de veneno paralizante de moluscos, que permitan complementar los métodos oficiales, disminuir el uso de bioensayos con animales.

Bioensayo en ratón (MBA)
Sommer and Meyer, 1937



RUTINARIOS

HPLC, LC-MS/MS



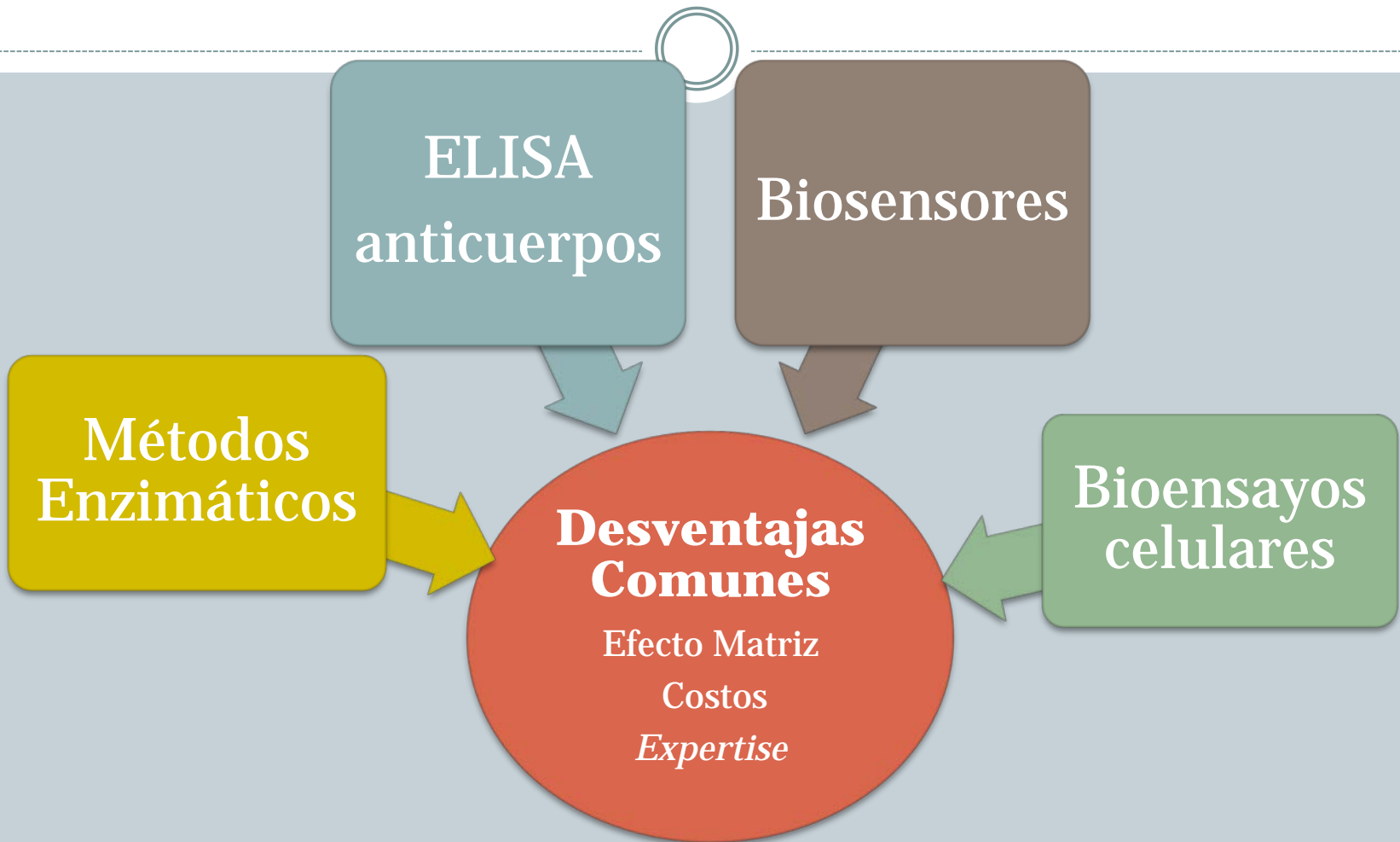
NO CONSIDERAN EL EFECTO BIOLÓGICO

Cultivos *in vitro*
Manger, 1993 (O/V)
Fairey, 1999 (Gen reportero)

DESARROLLO DE MÉTODOS TOXICOLÓGICOS ALTERNATIVOS



Principales problemas de los métodos alternativos



Métodos alternativos en general son buenas aproximaciones específicas y sensibles frente a toxina pura (standard), siendo su principal desventaja, la interferencia de la matriz en muestras naturales

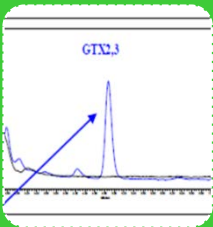
Primer desafío: Seleccionar y optimizar un métodos de extracción de VPM para diferentes matrices de bivalvos para su uso en bioensayo celular.

Muestras Fortificadas y Naturales



Identificación de la matriz central

- Análisis espectrofotométrico del extracto acuoso (Absorbancias)
- Una mayor concentración en el extracto corresponde a una mayor cantidad de interferentes.



Selectividad del método de extracción.

- Análisis HPLC de blancos y muestras fortificadas.
- Ausencia de peaks en la zona de elusión de la toxina, indica que el método es selectivo.



Detección y semicuantificación de STX.

- Porcentaje de rescate celular (bioensayo de citotoxicidad)
- Curva dosis-respuesta: Método de Manger, células N2A expuestas a distintas concentraciones de O/V/STX



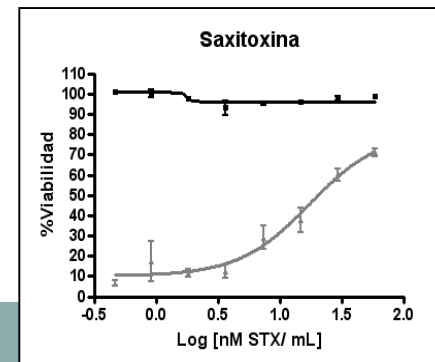
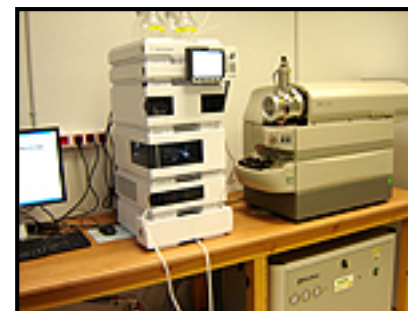
Almejas



Choritos



Ostras



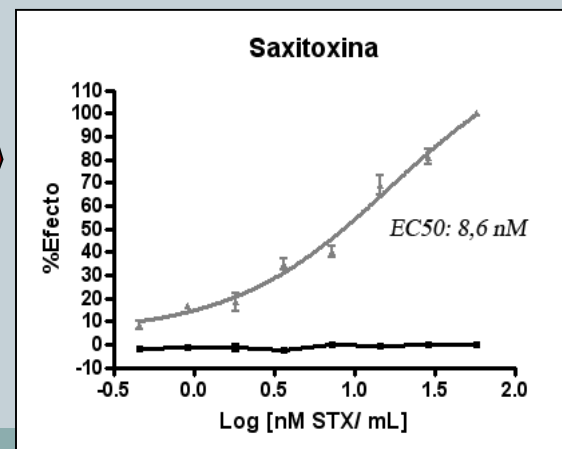
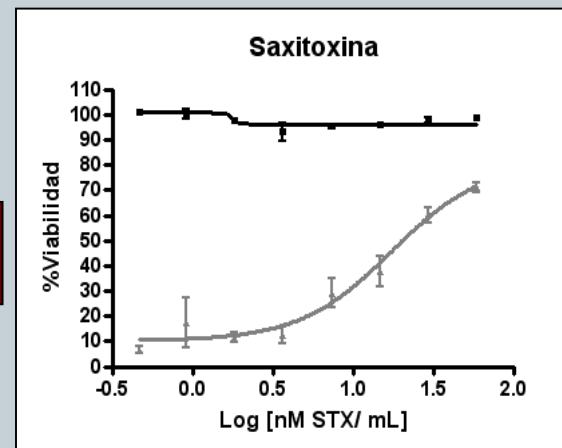
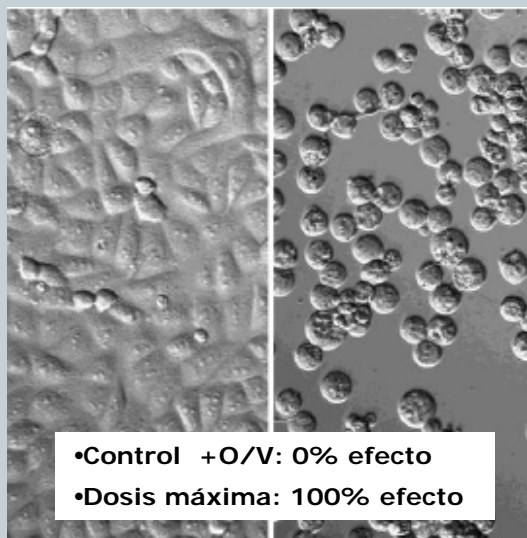
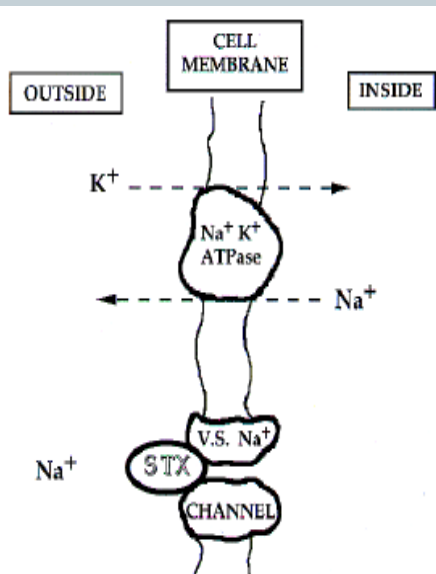
Ensayos celulares para la detección de toxinas PSP, NSP, DSP, ASP y Ciguatera

	Toxinas detectadas	Evaluación en Plotoplancton	Evaluación en bivalvos	Evaluación en otros organismos	Tiempo de respuesta (Horas)	Observación de la toxicidad por microscopía	Cuantificación por observación	Especificidad de la observación	Cuantificación automática	Validación-correlación	Límite de detección	Tipo celular
Na+(PSP, NSP, CIGUATERA)												
Kogare <i>et al.</i> 1988	TTX STX	-	-	-	6-8	+ Membrana	+	-	-	-	3 nM -	Neuroblastomas 2-A de ratón ATCC CCL-131
Jellett <i>et al.</i> 1992	STX									Ratón	33 nM Eq.	Neuroblastomas 2-A de ratón ATCC CCL-131
Jellett <i>et al.</i> 1995	NeoSTX GTXII-III	+	+	-	24	-	-	+	HPLC	30-300 nM		
Jellett <i>et al.</i> 1998	dcSTX											
Gallacher <i>et al.</i> 1992	SCB	-	+	Bacterias	24	-	-	+	Ratón HPLC	25 nM	Neuroblastomas 2-A de ratón ATCC CCL-131	
Manger <i>et al.</i> 1995	CTX 1-3C PbTx1 STX	-	-	Peces Cangrejos	4-22 22-48	-	-	+	-		8.9 pM 2.9 nM -	Neuroblastomas 2-A de ratón ATCC CCL-131
DSP												
Aune <i>et al.</i> 1991 *	AO DTX1 (PTX1 YTX)	-	-	-	2	+ (M.O./M.E.) Membrana	-	+	-	-	0.6 µM 0.6 µM 5.7 µM 8.4 µM	Hepatocitos de ratón (Cultivo primario)
Amzil <i>et al.</i> 1992	AO	-	+	-	3	+ Membrana	+	-	-	HPLC	6.2 µM	Células cancerosas humanas KB
Fessaré <i>et al.</i> 1994	AO	+	-	-	3	+ Membrana	-	+	+	Ratón	22 nM	Fibroblastos de hámster BHK 21 C-13
Diogène <i>et al.</i> 1995	AO	+	-	-	3	+ Citosqueleto	-	+	+	Ratón	5 nM	Fibroblastos de hámster BHK 21 C-13
Fernández-Suárez <i>et al.</i> 1993 García <i>et al.</i> 1998	AO DTX2	-	+	-	24	+	+	+	+	Ratón HPLC	3 nM 3 nM	Neuronas granulares y astrocitos de cerebelo de rata (Cultivo primario)
OTRAS TOXINAS												
Diogène <i>et al.</i> 1994	MTX	+	-	-	1	+ Membrana + Citosqueleto	+	+	+	Ratón	2.7 nM Eq.	Fibroblastos de hámster BHK 21 C-13
Diogène <i>et al.</i> 1995												
Novelli <i>et al.</i> 1992* García <i>et al.</i> 1998	AD (STX)	-	+	-	24	+	+	+	+	Ratón HPLC	3 µM 5 nM	Neuronas granulares y Astrocitos de cerebelo de rata (Cultivo primario)

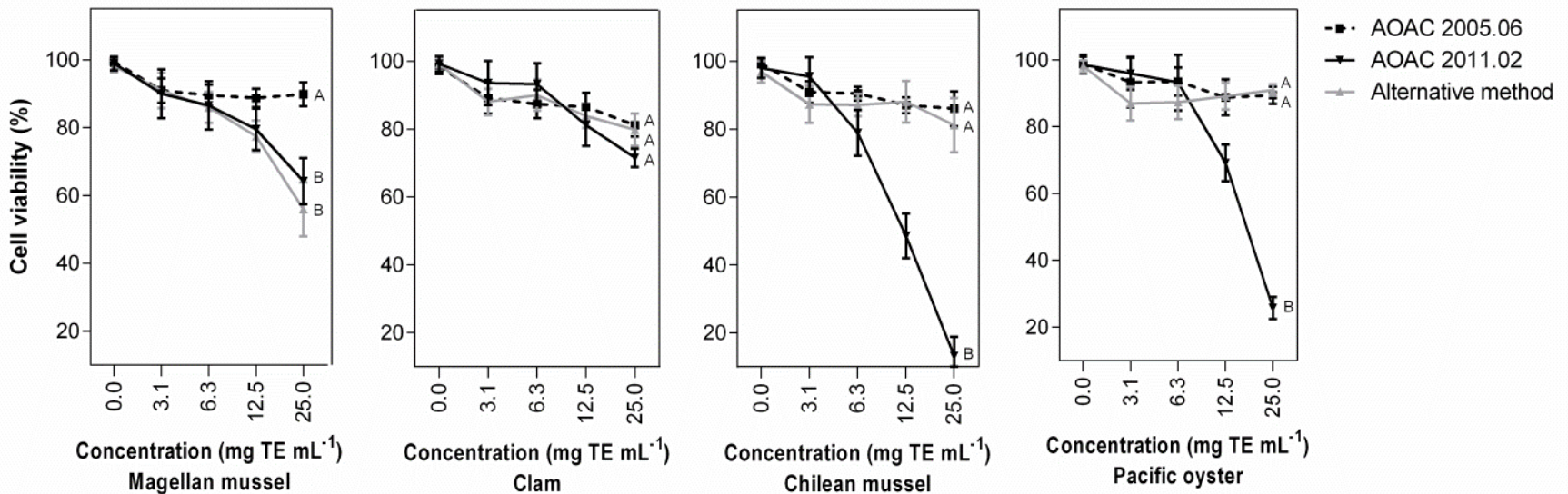
*: Se incluyen además otras toxinas para las cuales el mismo ensayo ha sido propuesto. Toxinas: AD: ácido domóico; CTX: ciguatoxina; dcSTX: decarbamil saxitoxina; ETX: dinofisistoxina; GTX: goniautoxina; MTX: maitoxina; NeoSTX: neo-saxitoxina; AO: ácido okadaico; PbTx: brevetoxina; PTX: pectenotoxina; SCB: toxinas bloqueadoras de canales de sodio; STX: saxitoxina; TTX: tetrodotoxina; YTX: yesotoxina. Abreviaciones: M.O.: Microscopía óptica. M.E.: Microscopía electrónica. HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

Segundo desafío: Optimizar un método alternativo al biosensayo ratón basado en biosensayos celulares para la detección y semicuantificación de VPM desde bivalvos contaminados

Bioensayo Celular para el screening de VPM basado en rescate celular en Neuro2a

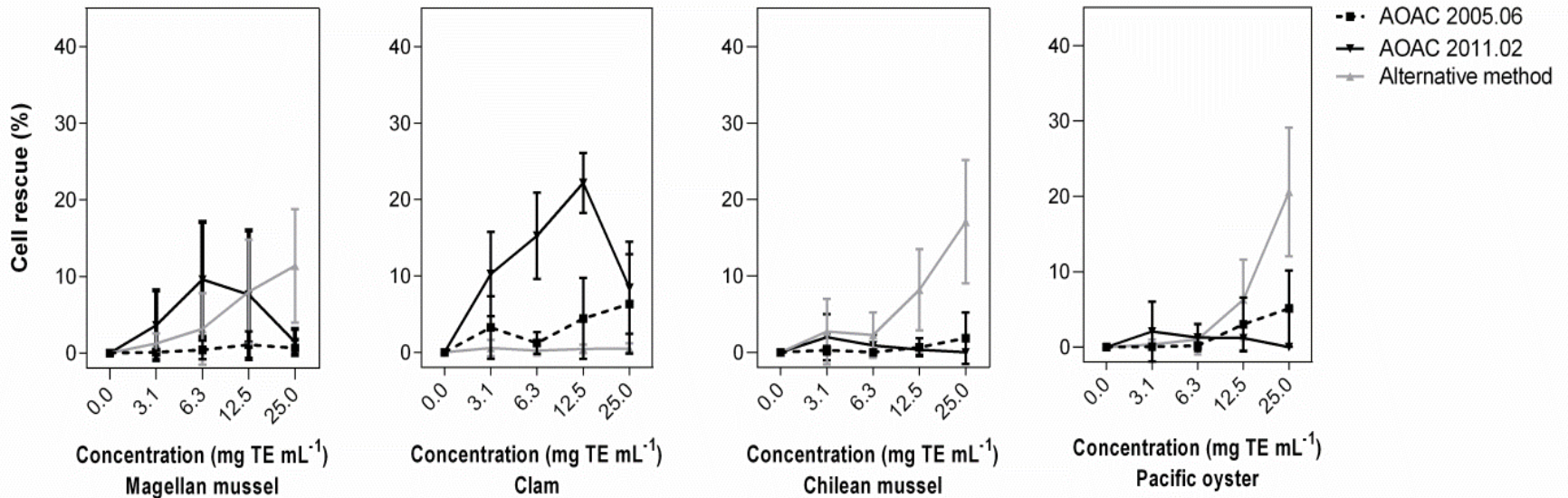


Primera selección del método de extracción de Veneno Paralizante de Moluscos para el Bioensayo celular, basado en toxicidad.

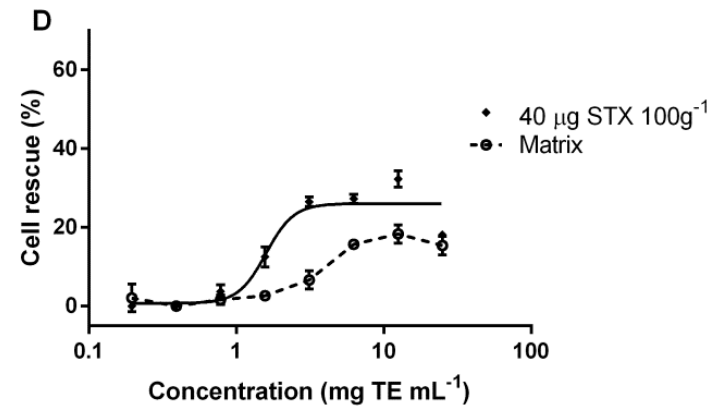
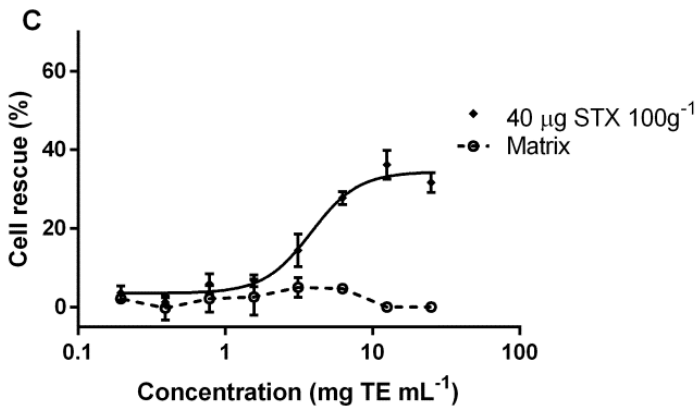
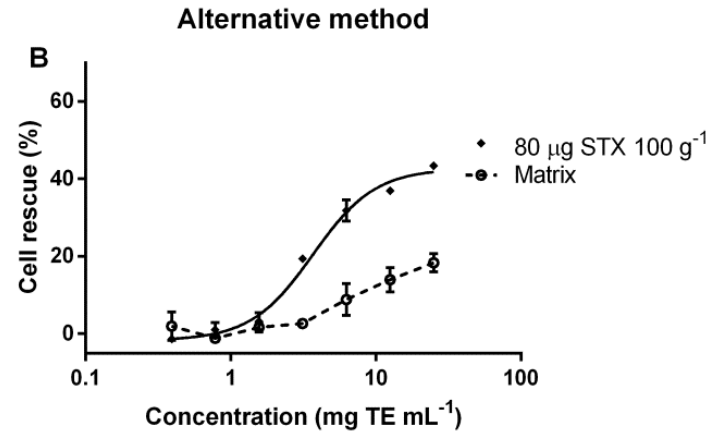
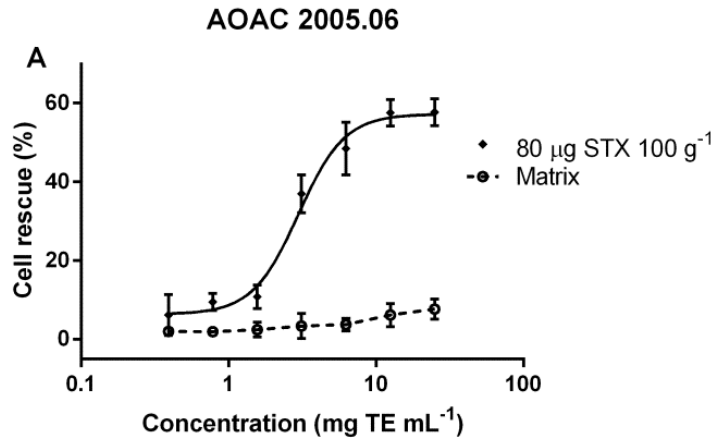


La selección se realiza basado en la comparación de tres métodos de extracción y el menor efecto tóxico en las células Neuro-2a (% viabilidad), tras la exposición de 24 h a extractos de moluscos bivalvos VPM-negativo. (ANOVA, Tukey's HSD test, $p < 0.05$).

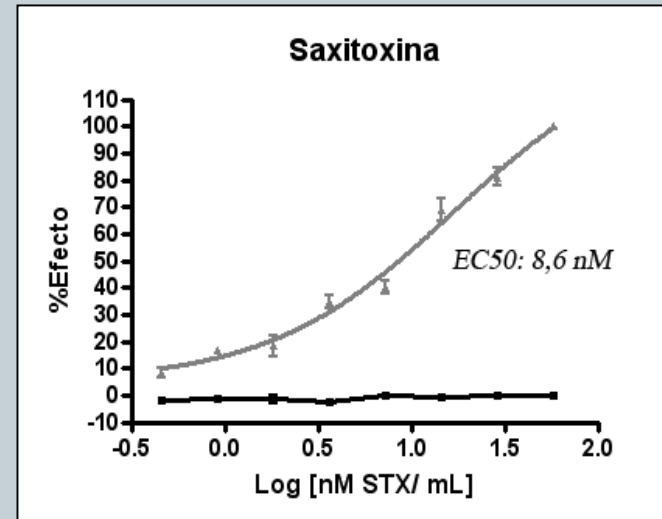
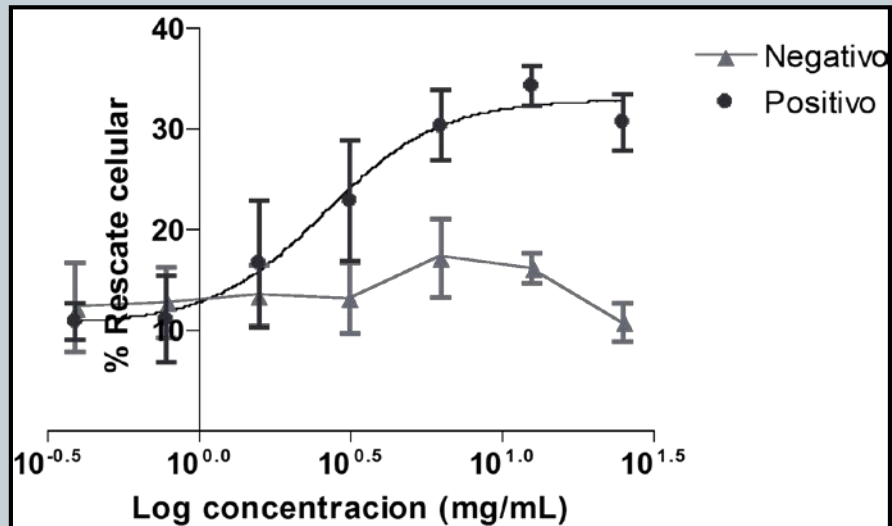
Segunda selección del método de extracción de Veneno Paralizante de Moluscos para el Bioensayo celular, basado en la interferencia en el rescate celular.



Detección de extractos de choritos chilenos fortificados con Saxitoxina mediante bioensayo celular Neuro-2a.



Curva dosis-respuesta en bioensayo celular frente a extracto de chorito contaminado naturalmente con VPM (Extracción AOAC 2005.06).



Bioensayo celular pre-validado del para la detección de VPM en moluscos



Objetivo 1

Método de extracción
AOAC 2005.06

BC en neuro-2a con
ouabaína y veratridina

Objetivo 2

Determinación del límite de detección de VPM
40 µg eq STX/100 g carne

Muestras de chorito
fortificadas con STX

Determinación de parámetros de detección
✓ Viabilidad con O/V en ausencia de extracto < 30%
✓ Rescate celular con extracto > 30%

Muestras naturales
contaminadas con VPM

Selectividad
(sin interferencia con VDM)

Aplicabilidad

- ✓ Identidad de la sustancia
- ✓ Intervalo de concentraciones
- ✓ Matrices
- ✓ Aplicación prevista
- ✓ Consideraciones generales

Conclusiones de la pre-validación del BC



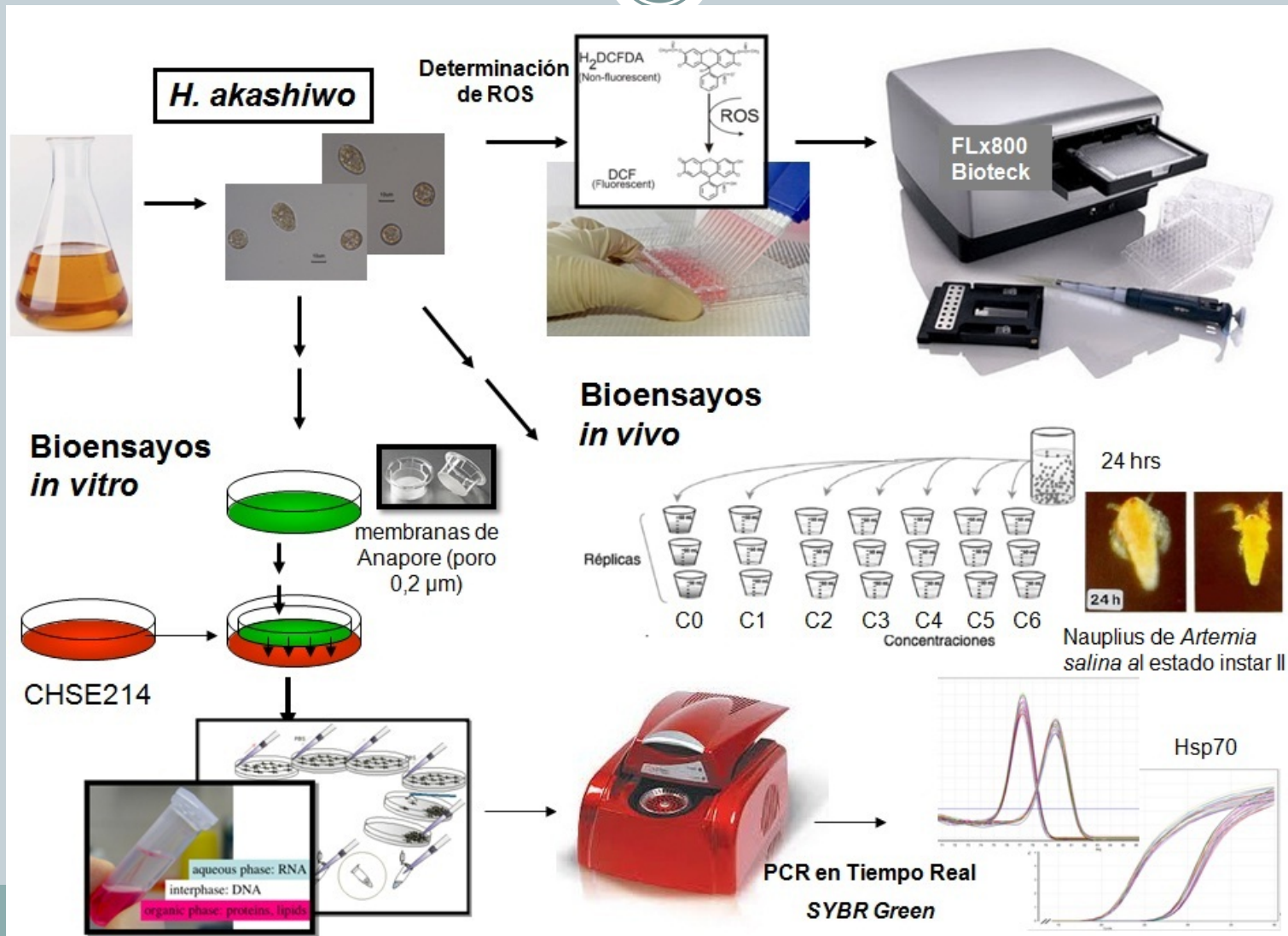
Según los resultados de la pre validación el BC es útil en la detección de VPM

- Selectividad, no mostró interferencia con VDM
- Sensibilidad: detecta muestras sobre el LMP
- Falsos Positivos: 1 de 30

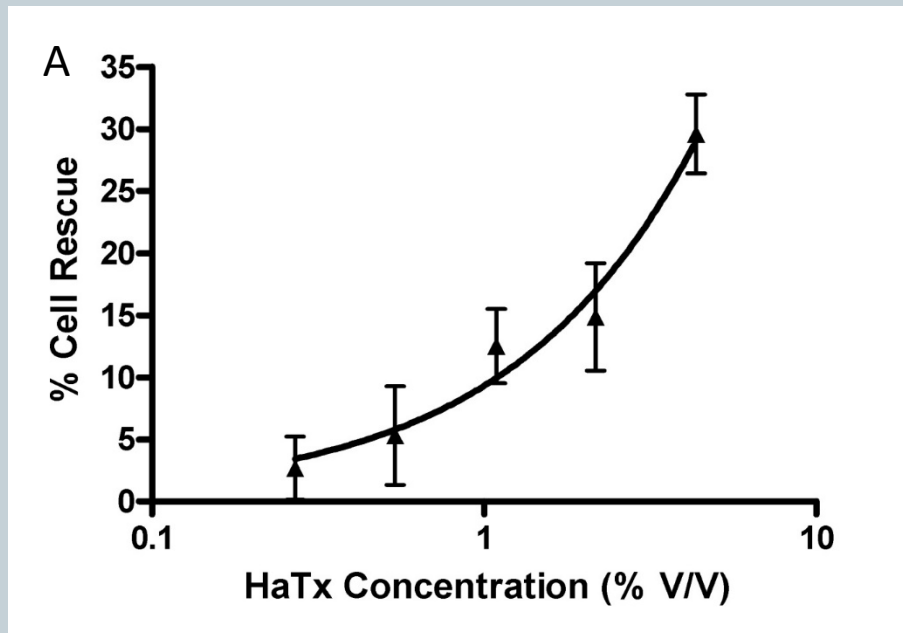
Siguiente etapa: completar la validación

Uso del BC en Investigación:

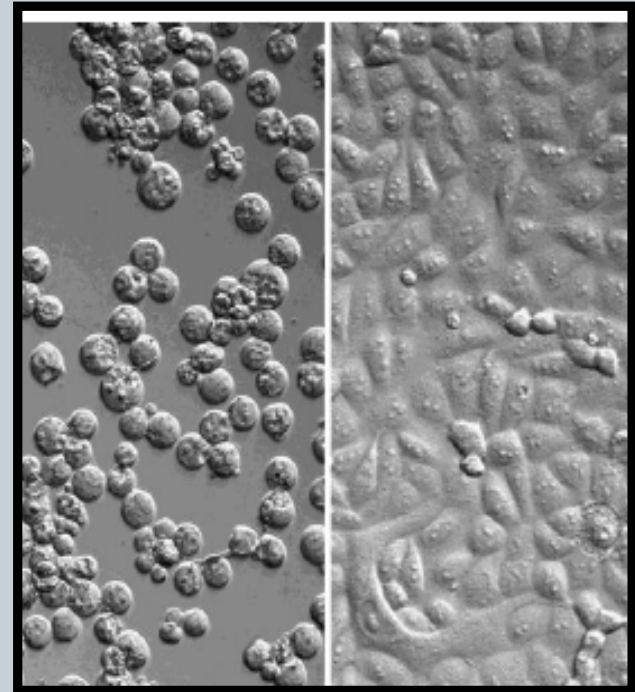
Estudio de nuevas toxinas o mecanismos de toxicidad de microalgas ictiotóxicas



Identificación mediante Bioensayo Celular Neuro-2a de compuestos neurotóxicos desde *Heterosigma akashiwo* antagonistas de brevetoxina

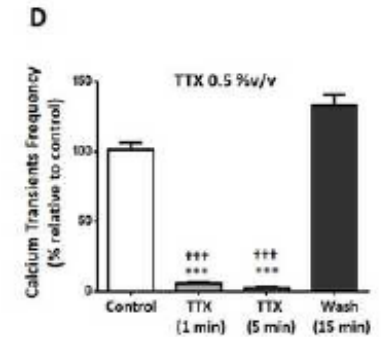
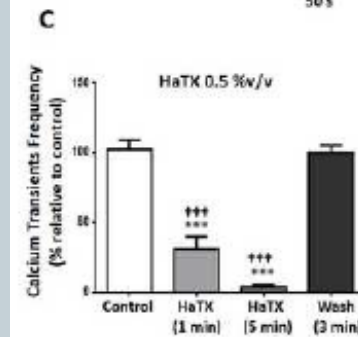
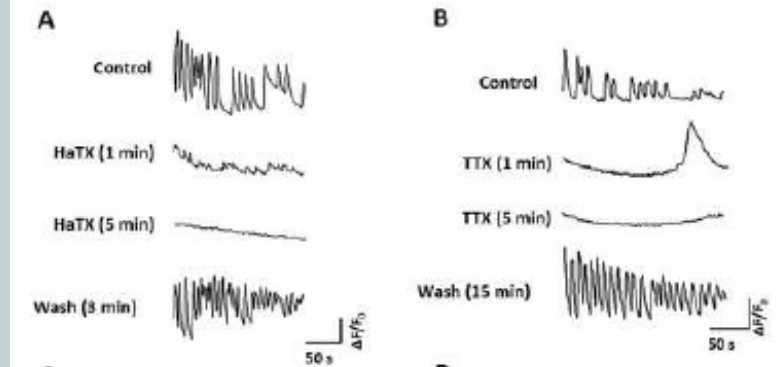
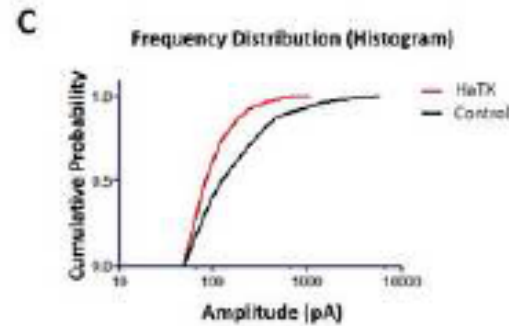
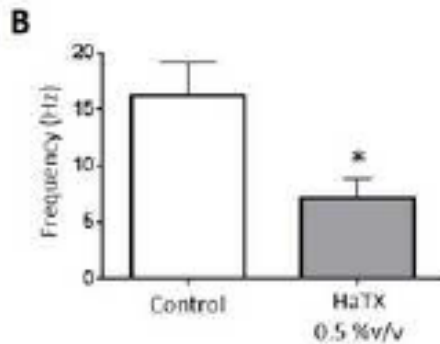
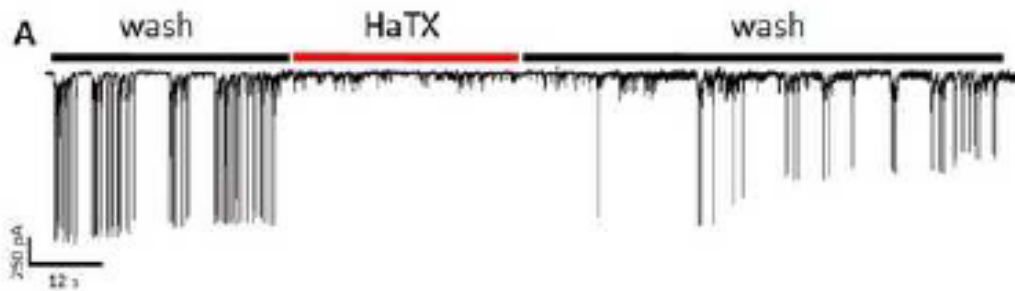


A.- Curva dosis-respuesta para el extracto de *Heterosigma akashiwo* (HaTX) usando el ensayo citotóxico con Neuro-2a



B.- Microscopía del bioensayo celular O/V del rescate usando HaTX

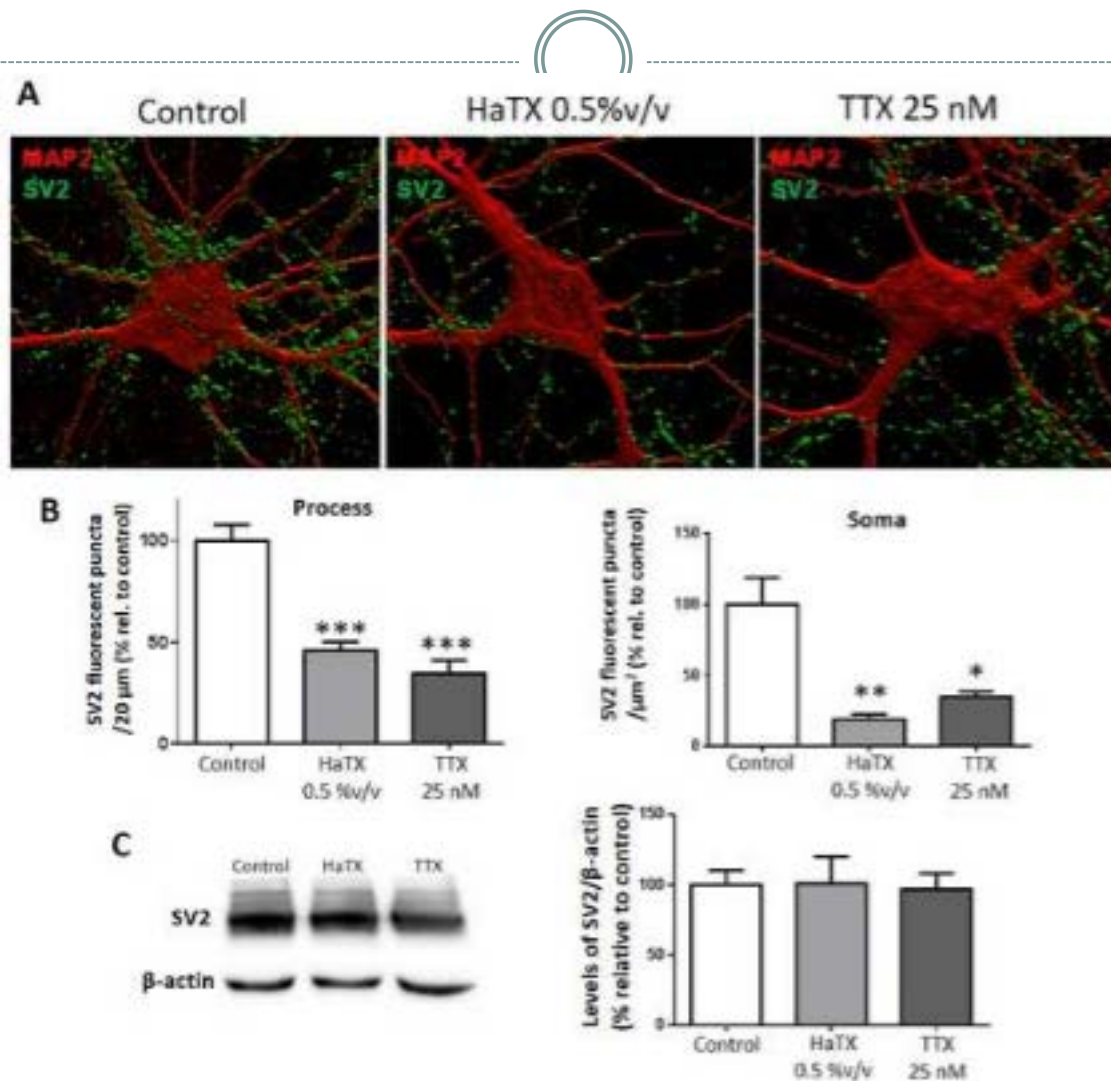
Neurotoxina derivada de *Heterosigma akashiwo* induce silenciamiento sináptico similar a la toxina paralizante TTX en neuronas de mamíferos



HaTX induce silenciamiento de la transmisión sináptica

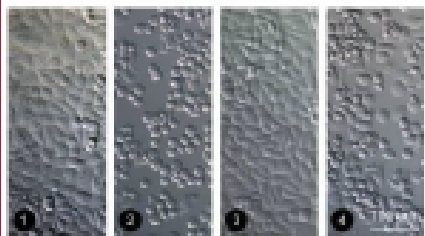
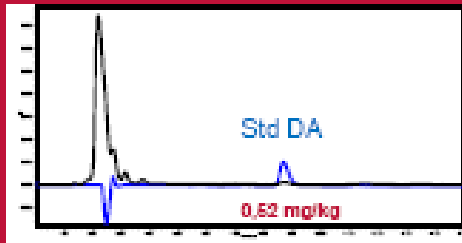
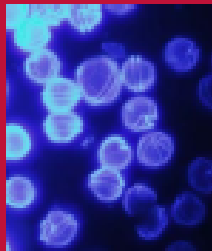
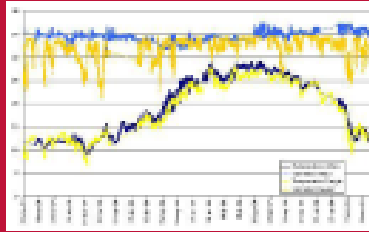
HaTX reduce la frecuencia de las transientes de calcio de igual forma que TTX

HaTX induce silenciamiento sináptico mediante la reorganización sináptica similar al efecto de TTX



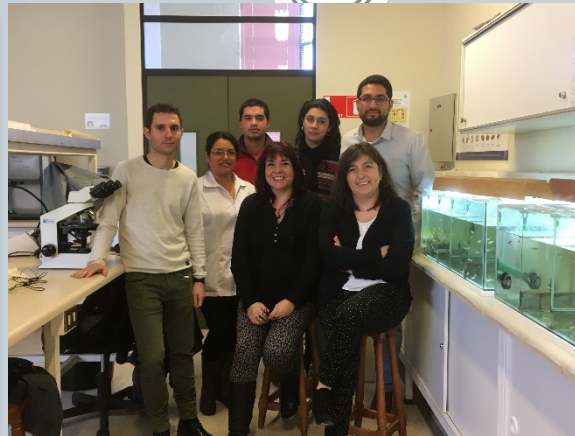
Los tratamientos agudos con HaTX y TTX disminuyen el nivel de la proteína pre sináptica SV2

El desarrollo de herramientas toxicológicas son claves en la investigación sobre microalgas tóxicas, toxinas marinas, sus mecanismos y blancos celulares.



- Permite entender mejor la potencia de las toxinas, proliferación de microalgas y fenómenos de producción y transferencia de toxinas entre organismos
- **Constituye un instrumento para desarrollar métodos de detección de toxinas marinas que velen por la bioseguridad alimentaria y nos permitan convivir con ellas**
- Podrían ser la base de las normativas legales relativas a toxinas según criterios objetivos

Agradecimientos



Agradecimientos

- COPAS-SUR Austral
- Subsecretaria de Salud Pública del Ministerio de Salud MINSAL
- Instituto de Salud Pública ISP
- IFOP, SUBPESCA y SERNAPESCA
- IRTA-España
- Fondo de Fomento al desarrollo Científico y Tecnológico FONDEF e INN BIO

