

Toxicidad de la dinoflagelada *Gambierdiscus* sp. aislada de las Islas Canarias

Amandine Caillaud^{1,2}, Elisabeth Cañete^{1,2}, Santiago Fraga³,
Elena Mallat^{1,2} y Jorge Diogène^{1,2}.

(1) IRTA Sant Carles de la Rapita, Ctra. Poble Nou, Km 5.5,
43540 Sant Carles de la Ràpita.

(2) XRAq, Xarxa de Referencia en Aqüicultura, CIRIT-Generalitat de Catalunya.

(3) Instituto Español de Oceanografía, Apdo. 1552, E-36200 Vigo.

Resumen

En este trabajo presentamos la caracterización de la toxicidad de una cepa de *Gambierdiscus* sp. procedente de las Islas Canarias mediante la utilización de cultivos celulares de neuroblastomas Neuro-2a. Los resultados obtenidos dan una toxicidad muy elevada del extracto bruto. La utilización de un activador específico del canal de sodio (Veratridina) y de un inhibidor de la bomba de sodio potasio (Ouabaina) aplicados conjuntamente con el extracto, permite aumentar la sensibilidad de la respuesta tóxica de las células Neuro-2a ante la presencia de toxinas neurotóxicas que actúan sobre canales de sodio (como las ciguatoxinas). La diferencia de respuesta tóxica obtenida con el extracto de *Gambierdiscus* sp. procedente de las Islas Canarias sin presencia de Ouabaina/Veratridina (IC₅₀= 3,84 células mL⁻¹ RPMI) o con presencia de Ouabaina/Veratridina (IC₅₀= 2,04 células mL⁻¹ RPMI) no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$) pero la respuesta no descarta la posible presencia de neurotoxinas de tipo activadoras del canal de sodio.

Introducción y generalidades

La ciguatera es una intoxicación alimentaria de tipo ictiosarco-toxismo originada por el consumo de pescado con toxinas ciguatéricas. La ciguatera se encuentra de forma endémica en zonas intertropicales del Océano Índico, Pacífico y Atlántico oeste [1]. El organismo productor de las toxinas es una dinoflagelada del género *Gambierdiscus*, identificada por primera vez en el año 1976 en Las Islas Gambier [2]. *G. toxicus* puede producir dos grupos principales de toxinas. La maitotoxina (MTX), poliéter policíclico hidrosoluble, con baja penetración a través de la pared digestiva que se elimina fácilmente y que no parece participar en los síntomas de la ciguatera. Las ciguatoxinas (CTXs), poliéteres de naturaleza lipofílica, se concentran en todos los tejidos del pescado y son responsables de los síntomas observados durante la intoxicación humana por ciguatera. El efecto principal de las CTXs a nivel fisiológico es su acción activadora de los canales de sodio voltaje-dependiente.

Diferentes formas de CTXs han sido identificadas. Las formas menos polares de las CTXs, las gambiertoxinas GTXs (directamente

detectadas en cultivos de *Gambierdiscus*), son precursores de las CTXs [3]. A lo largo de la cadena trófica se producen oxidaciones sucesivas de las formas menos polares de CTXs en formas más polares. Más de veinte formas de GTXs y CTXs han sido identificadas. La CTX del Pacífico P-CTX-1 es la forma más oxidada y más tóxica de las CTXs [4]. Las diferencias dentro de los síntomas de la ciguatera debidos a la toxicidad de las diferentes formas de CTXs y por lo tanto la afinidad para el canal Na^+ son dependientes del nivel de oxidación de la molécula. [5, 6, 7, 8, 9].

Dentro del género *Gambierdiscus* cinco especies más han sido descritas: *G. belizeanus* Faust (1995), *G. yasumotoi* Holmes (1998), *G. australes*, *G. pacificus* y *G. polynesiensis* Chinain (1999) [10]. La producción de CTXs ha sido detectada en *G. australes*, *G. pacificus* y *G. polynesiensis* [10]. No obstante, existe actualmente cierta confusión taxonómica que invita a la revisión del género [11, 12]. Ello podría explicar en parte la variación en la producción de CTXs descrita entre cepas. Igualmente, ha sido descrito que la producción de toxinas por una misma especie puede variar según varios factores como las condiciones del medio, la localización geográfica y las estaciones [13, 14, 15, 16].

Numerosos métodos han sido estudiados para garantizar la detección de la presencia de ciguatoxinas en los peces. Animales de laboratorio han sido utilizados tradicionalmente para la detección de peces tóxicos. El bioensayo ratón es el bioensayo mayoritariamente utilizado para la detección de las ciguatoxinas en carne de pescado o en extractos [17, 18]. Técnicas inmunológicas como el RIA (Radio Immunoassay) o ELISA (Enzyme Linked Immuno Absorbent) han sido desarrolladas para la detección de las CTXs [19], si bien con resultados poco probados para el caso del ELISA [20]. La utilización de técnicas de química analítica fue también aplicada a la detección de las ciguatoxinas utilizando técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE o HPLC) acoplada a una detección con fluorescencia [21, 22] o por espectrometría de masas (HPLC-MS).

La utilización de cultivos celulares de mamíferos como modelo toxicológico para la detección de toxinas marinas permite detectar una actividad tóxica del extracto. Manger et al. [23, 24] han descrito un método para la detección de toxinas con actividad neurotóxica en cultivos de neuroblastomas (Neuro-2a) basado en la utilización de la ouabaina y veratridina. La ouabaina inhibe la salida del sodio intracelular bloqueando el canal Na^+ de la bomba de ATP (Bomba Na^+/K^+). La veratridina actúa sobre el canal Na^+ voltaje-dependiente manteniéndolo en posición abierta. La utilización de ouabaina y veratridina conjuntamente con el extracto estudiado permite modificar la sensibilidad de la respuesta tóxica debida a la presencia de neurotoxinas. La presencia de CTX se caracteriza por una disminución de la viabilidad de las células en cultivo (potenciando el efecto de la ouabaina y veratridina).

En 2004 se describió por primera vez una intoxicación por ciguatera en aguas del atlántico oriental, concretamente en las Islas Canarias debido al

consumo de un “Medregal Negro” (*Seriola Rivoliana*) que contenía CTXs de tipo CTX-1 del Caribe y dos toxinas mas desconocidas [25]. Contemporáneamente, una dinoflagelada del genero *Gambierdiscus* fue aislada de las costas de las Islas Canarias [26]. El presente trabajo propone una evaluación de la toxicidad *in vitro* de una cepa de *Gambierdiscus* sp. procedente de las Islas Canarias sobre cultivos celulares de neuroblastomas Neuro-2a.

Material y métodos

Cultivos de Gambierdiscus sp. de Canarias. La cepa de *Gambierdiscus* sp. (VGO791) aislada de las Islas Canarias (proveniente de la colección de microalgas CCVIEO del IEO, Vigo) fue cultivada en medio ES [27], modificado y con salinidad de 32 P.S.U. en frascos erlenmeyer de 100 mL a 28°C bajo luz blanca a 60-80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un ciclo de luz y oscuridad 12:12. La máxima concentración de células alcanzada en el cultivo fue de 3.127 células mL⁻¹.

Preparación del extracto bruto de Gambierdiscus sp. El cultivo recuperado fue filtrado bajo vacío utilizando un filtro GF/F (Whatman) que se conservó congelado a -20°C con metanol hasta su utilización. La extracción se procesó por sonicación (30 minutos), centrifugación (1.400 rpm), recuperación del sobrenadante de metanol y posterior filtración del extracto metanólico por Acrodisc 0,45 μm . Se repitió la extracción con metanol una segunda vez. Las fracciones metanólicas filtradas se combinaron y se evaporaron bajo nitrógeno. El extracto seco se pesó y se resuspendió en 3 mL de metanol. El peso seco del extracto obtenido fue de 1,3 mg mL⁻¹ de MeOH con un equivalente de 1.042 células mL⁻¹ de MeOH.

Estudio preliminar de la toxicidad sobre cultivos celulares de neuroblastoma Neuro-2a- Evaluación de la viabilidad de las células expuestas al extracto bruto: Las células de neuroblastomas Neuro-2a se cultivaron según el protocolo utilizado por Cañete *et al*, 2007 [28]. La exposición de las células al extracto de *Gambierdiscus* sp. se realizó utilizando el método de Manger [23,24] y la evaluación de la viabilidad de las células también se realizó según Cañete *et al*, 2007 [28]. Por falta de patrones de CTXs, se utilizó un patrón de brevetoxina-3 (PbTx-3) fue utilizado como control positivo de la presencia de neurotoxinas activadoras del canal a sodio para validar la respuesta del modelo celular en cuanto a la presencia de neurotoxinas [28].

Resultados

Los resultados obtenidos tras la exposición al extracto de *Gambierdiscus* sp. y del estándar de PbTx quedan expresados en las curva de viabilidad de las células en función de las concentraciones de extracto y

de la toxina. La IC₅₀ (concentración inhibidora de 50% de la viabilidad celular) del extracto bruto de *Gambierdiscus* sp. obtenida fue de 4,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de medio RPMI o un equivalente de 3,84 células mL^{-1} RPMI para la toxicidad total del extracto de *Gambierdiscus* sp. En presencia de ouabaina/veratridina la IC₅₀ del extracto fue de 2,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RPMI para un equivalente de 1,7 células mL^{-1} RPMI. La diferencia entre las IC₅₀ con (+OV) o sin (-OV) ouabaina y veratridina no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$) pero la tendencia es a una disminución de la viabilidad de las células en presencia de los inhibidores del canal de sodio. Fig. 1.

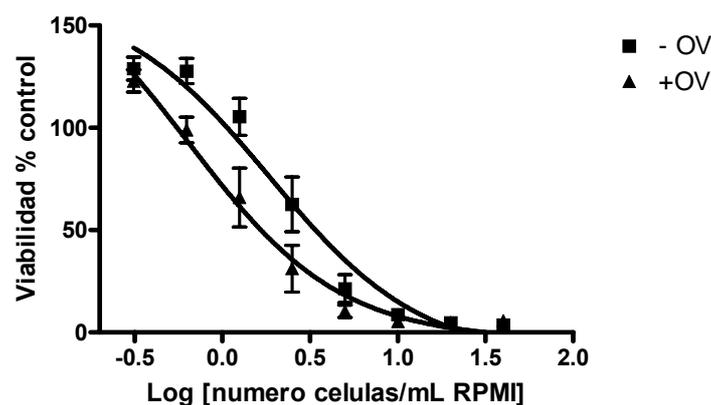


Figura 1. Curva dosis-respuesta de las células Neuro-2a expuestas a un extracto bruto de *Gambierdiscus* sp. en presencia (+OV) y ausencia (-OV) de ouabaina y veratridina.

La IC₅₀ obtenida en presencia de PbTx-3 con ouabaina y veratridina fue de 24 ng mL^{-1} RPMI. La PbTx-3 no tiene efecto sobre las células Neuro-2a en ausencia de ouabaina y veratridina. La disminución de la viabilidad celular ($p < 0,05$) obtenida es característica de las neurotoxinas activadoras del canal de sodio (Fig. 2).

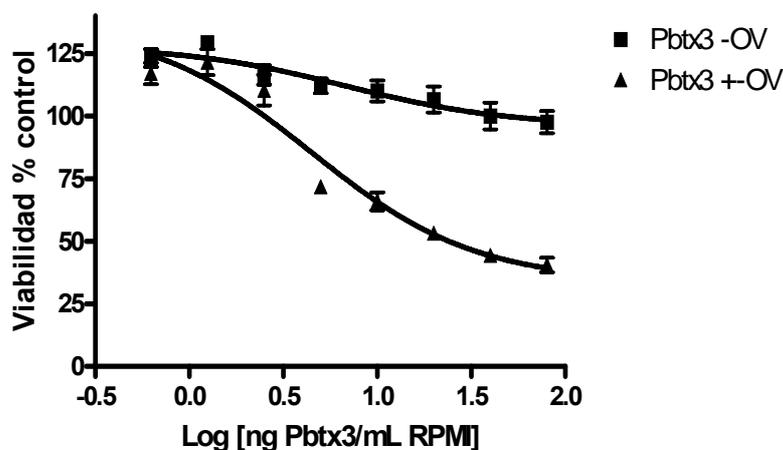


Figura 2. Curva dosis-respuesta de las células Neuro-2a expuestas a un estándar de PbTx-3 en presencia (+OV) y ausencia (-OV) de ouabaina y veratridina.

Discusión, conclusión y perspectivas

El extracto bruto de *Gambierdiscus* sp. de las Canarias produce una toxicidad muy elevada sobre las células Neuro-2a (equivalente de 3,84 células mL⁻¹). Una cepa de *Gambierdiscus* sp. aislada de Malasia produce en comparación una toxicidad sobre Neuro-2a equivalente a 16 células mL⁻¹ (datos de nuestro laboratorio). La alta toxicidad encontrada en ausencia de ouabaina y veratridina indica presencia de una potente toxina no asociada a canales de sodio. Posiblemente puede tratarse de una toxina del tipo maitotoxina (MTX) ya que ésta es mayoritaria en las cepas tóxicas de *Gambierdiscus* sp. descritas en la literatura [11,29].

Aunque los posibles indicios de presencia de CTXs no parecen ser significativos, todavía no se puede descartar la posible producción de CTXs o derivados. Se necesitan estudios complementarios como una separación de la fracción lipofílica (que retiene toxinas de tipo CTXs) de la fracción hidrofílica (MTXs) para evaluar la responsabilidad de cada fracción dentro de la toxicidad global medida tras la exposición con ouabaina y veratridina. Utilizando la P-CTX-1 como patrón, se podrá completar este estudio con análisis químico por LC-MS para detectar e identificar la posible síntesis de toxinas tipo CTX producidas por esta cepa. El cultivo estable de la cepa de *Gambierdiscus* sp. (VGO 791) podrá ser objeto de cultivos a gran escala para una producción de mayor biomasa para confirmar la posible producción de CTXs o derivados.

Agradecimientos

A Javier Fernández, de la Universidad de la Laguna, y a J. Franco del CSIC por su colaboración. Este trabajo ha sido financiado parcialmente con una beca predoctoral INIA (Ministerio Español de Educación y Ciencia).

Referencias

- [1] Lewis, R.J. 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicon*. 39:97-106.
- [2] Yasumoto, T., A. Inoue, R. Bagnis, M. Garcon. 1977. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 43:69-74.
- [3] Lewis, R.J., M. Sellin, M.A. Poli, R.S. Norton, J.K. MacLeod, M.M. Sheil. 1991. Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). *Toxicon*. 29:1115-1127.
- [4] Lehane, L., R.J. Lewis. 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International Journal of Food Microbiology*. 61:91-125.
- [5] Lewis, R.J., M.Y. Chaloupka, N.C. Gillespie, M.J. Holmes. 1988. An analysis of the human response to ciguatera in Australia. En: *Proceedings 6th International Coral Reef Symposium*, 1988, August 8-12. Townsville, Australia. 3:67-72.
- [6] Murata, M., A.-M. Legrand, Y. Ishibashi, M. Fukui, T. Yasumoto. 1990. Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* 112:4380-4386.
- [7] Yasumoto, T., M. Murata. 1993. Marine toxins. *Chem. Rev.* 93:1897-1909.
- [8] Lewis, R.J. 1994. Impact of a validated, cost-effective screen for ciguateric fish. *Mem. Queensl. Mus.* 34:549-553.

- [9] Legrand, A.-M., C.J. Lotte. 1994. Detection of ciguatoxic fish by using the binding property of ciguatoxins to voltage-dependent sodium channels. *Mem. Queensl. Mus.* 34: 576.
- [10] Chinain, M., M.A. Faust, S. Pauillac. 1999. Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. novel, *G. australes*, sp. novel, and *G. polynesiensis*, sp. novel. *J. Phycol.* 35:1282-1296.
- [11] Tester P.A., Faust M.A., Vandersea M.W., Kibler S.R., Chinain M., Holmes M.J., Holland W.C., Litaker R.W., 2006. Does *Gambierdiscus toxicus* type material exist? *XIle Internacional Conference on Harmful Algae*, Septiembre 2006.
- [12] Richlen, M.D., Morton S.L., Barber P.H., 2008. Phylogeography, morphological variation and taxonomy of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) *Harmful Algae (2008)*, doi:10.1016/j.hal.2007.12.020 (in press).
- [13] Bomber, J.W., R.R.L. Guillard, W.G. Nelson. 1988. Roles of temperatures, salinity, and light in seasonality, growth, and ciguatera-causing *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, Dinophyceae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 115: 53-65.
- [14] Tosteson, T.R., D.L. Ballantine, C.G. Tosteson, V. Hensley, A.T. Bardales. 1989. Associated bacterial flora, growth, and toxicity of cultured benthic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* and *Gambierdiscus toxicus*. *Appl. Environ. Health Perspect.* 108(Suppl.1):133-141.
- [15] Holmes, M.J., R.J. Lewis, M.A. Poli, N.C. Gillespie. 1991. Strain dependent production of ciguatoxin precursors (Gambiertoxins) by *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon.* 29:761-775.
- [16] Micouin, L., M. Chinain, P. Asin, A.-M. Legrand. 1992. Toxicity of French Polynesian strains of *Gambierdiscus toxicus* in cultures. *Bull. Soc. Path. Exot.* 85:474-477.
- [17] Barrer, A.H., P.J. Scheuer, S. Sasaki, P. Helfrich, C.M.B. Alender. 1960. Observations on ciguatera-type toxin in fish. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 90:770-787.
- [18] Lewis, R.J. 2003. Detection of ciguatoxins associated with ciguatera fish poisoning. En: Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cambella (Eds). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides. UNESCO. France. 267-277.
- [19] Hokama, Y., A.M. Osugi, S.A.A. Honda, M.K. Marsuo. 1985. Monoclonal antibodies in the detection of ciguatoxina and other toxic polyethers in fish tissues by a rapid poke stick test. En: *Proceedings 5th International Coral Reef Congress*. Antenne Museum-Ephe, Moorea, French Polynesia. 449-456.
- [20] Dickey, R.W., H.R. Granade, F.D. McClure. 1994. Evaluation of a solid-phase immunobed assay for detection of ciguatera-related biotoxins in caribbean finfish. *Memoirs of the Queensland Museum.* 34:481-488.
- [21] Lewis, R.J., M. Sellin. 1992. Multiple ciguatoxins in the flesh of fishes. *Toxicon.* 30:915-919.
- [22] Lewis, R.J., M. Sellin. 1993. Recovery of ciguatoxin from fish flesh. *Toxicon.* 31:1333-1336.
- [23] Manger, R.L., L.S. Leja, S.Y. Lee, J.M. Hungerford, Y. Hokama, R.W. Dickey, H.R. Granade, R.J. Lewis, T. Yasumoto, M. Wekell. 1995. Detection of sodium channel toxins : directly cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *J. AOAC Int.* 78:521-527.
- [24] Manger, R.L., L.S. Leja, S.Y. Lee, J.M. Hungerford, M. Wekell. 1997. Assessment of marine toxins by cell bioassay. En: Shahidi, F., Y. Jones, D.D. Kitts (Eds.) *Seafood Safety, Processing, and Biotechnology*. Technomic Publishing. Lancaster, Basel. 11-16.
- [25] Perez-Arellano, J.-L., P.O. Luzardo, A.P. Brito, M.H. Cabrera, M. Zumbado, C. Carranza, A. Angel-Moreno, R.W. Dickey, L.D. Boada. 2005. Ciguatera fish poisoning, Canary Islands. *Emerging Infectious Diseases.* 11-12:1981-1982.
- [26] Fraga, S., Riobó P., Diogène J., Paz B., Franco J.M.. 2004. Toxic and potentially toxic benthic dinoflagellates observed in Macaronesia (NE Atlantic Archipelagos) *XIle International Conference on Harmful Algae*, Cape Town 2004.
- [27] Provasoli, L. 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. En: Wanabe, A., A. Hattori (Eds.) *Culture and Collection of Algae*. US-Japanese Conference, Hakone.

- [28] Cañete, E., A. Caillaud, J. Diogène. 2008. Estudio de la sensibilidad de las células de neuroblastoma Neuro-2a a estándares de toxinas marinas. En: Gilabert, J. (Ed.) Avances y Tendencias Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas (Actas de la IX Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Cartagena 7-10 Mayo 2007). pp.: 271-275.
- [29] Holmes, M.J., R.J. Lewis, N.C. Gallespie. 1992. Toxicity of Australian and French Polynesian strains of *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) grown in culture: Characterization of a new type of maitotoxina. *Toxicon*. 28:1159-1172
- [28] Holmes, M.J., R.J. Lewis, N.C. Gallespie. 1992. Toxicity of Australian and French Polynesian strains of *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) grown in culture: Characterization of a new type of maitotoxina. *Toxicon*. 28:1159-1172.