



Facultad de Veterinaria

Trabajo de  
Fin de Grado

Desarrollo de métodos *in vitro*  
para la detección de biotoxinas  
emergentes en aguas europeas

Alejandro Cao Cancelas

**Grado en Veterinaria**

Año 2021

Modalidad del Trabajo: Experimental

## Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Alejandro Cao Cancelas y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



## Resumen

En los últimos años, el cambio climático y el exceso de gases de efecto invernadero en la atmósfera han hecho que la temperatura terrestre y oceánica haya aumentado, cambiando las características fisicoquímicas de las aguas marinas. Este hecho, combinado con la globalización del comercio, ha permitido que microorganismos como el fitoplancton invadan aguas donde antes no podían habitar y, en consecuencia, que aparezcan nuevos peligros para la salud pública, como son las biotoxinas marinas.

Se han descubierto muchas biotoxinas marinas, pero este estudio se ha centrado en las biotoxinas marinas emergentes en Europa y por ende en las costas gallegas, entre las que se incluyen la tetrodotoxina (TTX) y las ciguatoxinas (CTXs). Estas toxinas son muy peligrosas para las personas y todavía no existe ningún método de diagnóstico médico rápido, práctico y fiable ni ningún tratamiento efectivo para las intoxicaciones producidas por las mismas. Por ello, este Trabajo Fin de Grado se ha centrado en esta temática, evaluando la interacción de un anticuerpo experimental anti-TTX con esta toxina y con los canales de sodio dependientes de voltaje (CSDV) y perfeccionando un método de cuantificación biológica de la ciguatoxina P-CTX-3C.

Los estudios realizados han sido *in vitro*, empleando para ello distintas líneas celulares. Para evaluar la interacción del anticuerpo con la tetrodotoxina y los CSDV se ha utilizado la técnica del patch-clamp y la inmunocitoquímica, mientras que para perfeccionar un método de cuantificación para la P-CTX-3C se han utilizado los ensayos de citotoxicidad evaluando la actividad mitocondrial empleando sales de tetrazolio (MTT) o Alamar Blue, reevaluando métodos descritos por otros autores.

Los resultados obtenidos han sido que el anticuerpo anti-TTX se une a los CSDV de las células tratadas previamente con TTX 1  $\mu\text{M}$  durante 1 hora y que disminuyen las corrientes registradas en el patch-clamp de células vivas, además de impedir que la toxina se una a su lugar de acción. En cuanto a los estudios de citotoxicidad, no se ha podido determinar la concentración de ouabaína y veratridina no tóxica para las células debido a los resultados contradictorios registrados en los ensayos de citotoxicidad.

Se concluye que el anticuerpo experimental anti-TTX se podría utilizar para diseñar inmunoensayos de detección de intoxicaciones ocasionadas por TTX en personas y animales, mientras que se necesitan más estudios para establecer un método estándar de cuantificación biológica de las ciguatoxinas.

**Palabras clave:** Biotoxinas marinas emergentes, tetrodotoxina, ciguatoxina, P-CTX-3C, ouabaína, veratridina, anticuerpo anti-TTX, MTT y Alamar Blue.

## Resumo

Nos últimos anos, o cambio climático e o exceso de gases de efecto invernadoiro na atmosfera fixeron que a temperatura terrestre e oceánica aumentase, cambiando as características fisicoquímicas das augas mariñas. Este feito, combinado coa globalización do comercio, permitiu que microorganismos como o fitoplancton invadan augas onde antes non podían habitar e, en consecuencia, que aparezan novos perigos para a saúde pública, como son as biotoxinas mariñas.

Descubríronse moitas biotoxinas mariñas, pero este estudo centrouse nas biotoxinas mariñas emerxentes en Europa e nas costas galegas, entre as que se inclúen a tetrodotoxina (TTX) e as ciguatoxinas (CTXs). Estas toxinas son moi perigosas para as persoas e aínda non existe ningún método de diagnóstico médico rápido, práctico e fiable nin ningún tratamento efectivo para as intoxicacións producidas polas mesmas. Por iso, este Traballo Fin de Grao centrouse nesta temática, avaliando a interacción dun anticorpo experimental anti- TTX con esta toxina e coas canles de sodio dependentes de voltaxe (CSDV) e perfeccionando un método de cuantificación biolóxica da ciguatoxina P-CTX-3C.

Os estudos realizados foron *in vitro*, empregando distintas liñas celulares. Para avaliar a interacción do anticorpo coa TTX e os CSDV utilizouse a técnica do patch-clamp e a inmunocitoquímica, mentres que para perfeccionar un método de cuantificación para a P-CTX-3C utilizáronse os ensaios de citotoxicidade avaliando a actividade mitocondrial empregando sales de tetrazolio (MTT) ou Alamar Blue, reevaluando métodos descritos por outros autores.

Os resultados obtidos foron que o anticorpo anti-TTX únese aos CSDV das células tratadas previamente con TTX 1  $\mu\text{M}$  durante 1 hora e que diminúen as correntes rexistradas no patch-clamp de células vivas, ademais de impedir que a toxina se una ao seu lugar de acción. En canto aos estudos de citotoxicidade, non se puido determinar a concentración de ouabaína e veratridina non tóxica para as células debido aos resultados contraditorios rexistrados nos ensaios de citotoxicidade.

Conclúese que o anticorpo experimental anti-TTX poderíase utilizar para deseñar inmunoensayos de detección de intoxicacións ocasionadas por TTX en persoas e animais, mentres que se necesitan máis estudos para establecer un método estándar de cuantificación biolóxica das ciguatoxinas.

**Palabras chave:** Biotoxinas mariñas emerxentes, tetrodotoxina, ciguatoxina, P-CTX-3C, ouabaína, veratridina, anticorpo anti-TTX, MTT y Alamar Blue.

## Abstract

During the last few years, climate change and excess greenhouse gases in the atmosphere have caused an increase in land and ocean temperatures, changing the physicochemical characteristics of marine waters. This, combined with the globalization of trade, has allowed micro-organisms such as phytoplankton to invade waters where they were previously unusually found and, thereby, causing the appearance of new threats to public health, such as marine biotoxins.

Many marine biotoxins have been discovered, but this study has focused on emerging marine biotoxins in European coast and hence in the Galician coasts, which include tetrodotoxins (TTX) and ciguatoxins (CTXs). These toxins are very dangerous for people and there is still no fast, practical and reliable medical diagnosis or effective treatment for the poisoning caused by them. Therefore, this study has focused on this topic, evaluating the interaction of an experimental anti-TTX antibody with this toxin and with voltage-dependent sodium channels (VDSC) and perfecting a method for biological quantification of the ciguatoxin P-CTX-3C.

The studies have been carried out *in vitro*, using different cell lines. Patch-clamp and immunocytochemistry have been used to evaluate the interaction of the antibody with tetrodotoxin and VDSC, while to improve a quantification method for P-CTX-3C, cytotoxicity tests have been used evaluating mitochondrial activity using tetrazolium salts (MTT) or Alamar Blue, re-evaluating methods described by other authors.

The results obtained have been that the anti-TTX antibody binds to the VDSC of cells previously treated with 1  $\mu$ M TTX for 1 hour and the currents registered in the patch-clamp of living cells decrease, as well as that the preincubation of the cells with the antibody prevents the binding of the toxin to its cellular target. Regarding cytotoxicity assays, the concentration of ouabain and veratridine non-toxic to cells could not be determined due to the contradictory results recorded in different cytotoxicity tests.

In conclusion, the experimental anti-TTX antibody could be used to design immunoassays for the detection of intoxications caused by TTX in humans and animals. On the other hand, more studies are needed to establish a standard method for the biological quantification of ciguatoxins.

**Key words:** Emerging marine biotoxins, tetrodotoxin, ciguatoxin, P-CTX-3C, ouabain, veratridine, anti-TTX antibody, MTT and Alamar Blue.

# Índice

Licencia .....	1
<b>Resumen</b> .....	3
Resumo.....	4
Abstract .....	5
<b>Índice</b> .....	6
Índice de figuras .....	8
Índice de tablas.....	9
<b>Abreviaturas</b> .....	10
<b>1. Introducción</b> .....	12
1.1 Floraciones algales nocivas y cambio climático .....	12
1.2 Ficotoxinas marinas reguladas en Europa y toxinas emergentes .....	14
1.3 Ciguatoxinas, distribución e impacto sobre la salud humana.....	16
1.4 Tetrodotoxina, distribución e impacto sobre la salud humana .....	19
<b>2. Objetivos</b> .....	22
<b>3. Material y métodos</b> .....	23
3.1 Toxinas y reactivos empleados .....	23
3.2 Líneas celulares empleadas .....	23
3.2.1 Cultivo de células HEK Na <sub>v</sub> 1.6.....	23
3.2.2 Cultivo de células de neuroblastoma (SH-SY5Y).....	25
3.3 Ensayos de valoración de la citotoxicidad <i>in vitro</i> .....	25
3.3.1 MTT de ouabaína y veratridina .....	26
3.3.2 Ensayo de citotoxicidad con Alamar Blue de la combinación ouabaína/veratridina empleando células de neuroblastoma humano .....	27
3.3.3 Evaluación de la citotoxicidad de las ciguatoxinas en células de neuroblastoma humano.....	28
3.4 Determinación de la unión de un anticuerpo anti-TTX a la tetrodotoxina y a los canales de sodio dependientes de voltaje .....	28
3.4.1 Inmunocitoquímica.....	29
3.4.2 Registros electrofisiológicos <i>in vitro</i> .....	31

3.5	Análisis estadístico.....	33
4.	<b>Resultados</b> .....	34
4.1	Efecto del anticuerpo Anti-TTX sobre los canales de sodio dependientes de voltaje. 34	
4.1.1	Técnica de patch-clamp.....	34
4.1.2	Inmunotinción .....	36
4.2	Citotoxicidad de las ouabaína y veratridina empleando el ensayo MTT .....	37
4.3	Citotoxicidad de ouabaína y veratridina empleando el ensayo del Alamar Blue .....	38
4.4	Citotoxicidad de la ciguatoxina P-CTX 3C empleando el ensayo MTT .....	39
4.5	Citotoxicidad de la ciguatoxina P-CTX 3C empleando el ensayo Alamar Blue .....	39
5.	<b>Discusión</b> .....	41
6.	<b>Conclusiones</b> .....	43
7.	<b>Bibliografía</b> .....	44

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la tetrodotoxina y de la ciguatoxina pacífica P-CTX 3C.. .....	16
<b>Figura 2.</b> Imágenes de <i>Gambierdiscus toxicus</i> y <i>Fukuyoa paulensis</i> .....	17
<b>Figura 3.</b> Distribución de cada grupo de ciguatoxinas en el mundo. ....	17
<b>Figura 4.</b> Distribución mundial de tetrodotoxina. ....	19
<b>Figura 5.</b> Frascos de cultivo de células HEK Na <sub>v</sub> 1.6 vistos con un microscopio óptico.....	24
<b>Figura 6.</b> Esquema de realización de un ensayo de citotoxicidad utilizando MTT.....	27
<b>Figura 7.</b> Esquema de realización de un ensayo de citotoxicidad utilizando Alamar Blue.....	28
<b>Figura 8.</b> Proceso de inmunotinción con anticuerpo primario y anticuerpo secundario .....	30
<b>Figura 9.</b> Espectro de excitación de los anticuerpos secundarios utilizados (Alexa Fluor 488, R-ficoeritrina y DyLight 488) y del marcador del núcleo Hoechst 33342.....	30
<b>Figura 10.</b> Equipo de patch-clamp utilizado para realizar el ensayo.....	31
<b>Figura 11.</b> Esquema del procedimiento de patch-clamp empleado para medir las corrientes de los canales de sodio dependientes de voltaje (CSDV).....	32
<b>Figura 12.</b> Efecto de diferentes concentraciones de TTX sobre la intensidad de las corrientes de sodio, obtenidas en células HEK transfectadas con la subunidad Na <sub>v</sub> 1.6 humana de los canales de sodio dependientes de voltaje.....	34
<b>Figura 13.</b> Gráficas corriente-voltaje que muestran el efecto de diferentes concentraciones de TTX sobre la intensidad de las corrientes de sodio dependientes de voltaje en ausencia (A) y en presencia (B) del anticuerpo anti-TTX a una dilución 1:50.....	35
<b>Figura 14.</b> Imágenes de microscopia confocal que muestran la estructura de los microtúbulos (marcados con $\beta$ 1-tubulina) en células control y en células tratadas con TTX 1 $\mu$ M durante 24 horas, empleando como anticuerpo secundario Alexa Fluor 488.....	36
<b>Figura 15.</b> Resultados del procedimiento de inmunocitoquímica realizado con el anticuerpo primario experimental Anti-TTX y el anticuerpo secundario R-ficoeritrina. ....	37
<b>Figura 16.</b> Gráfica de barras de MTT con concentraciones de O/V desde 10/1 hasta 340/34 $\mu$ M. En ella se expresa el porcentaje de viabilidad celular en cada condición con respecto al control (n = 4 a 8 determinaciones independientes) .....	37
<b>Figura 17.</b> Gráficas de barras que muestran el efecto de distintas concentraciones de O/V empleando el ensayo de Alamar Blue .....	38
<b>Figura 18.</b> Gráfica de barras que muestra el efecto citotóxico de la combinación de distintas concentraciones de ciguatoxina P-CTX 3C en un medio con O/V a una concentración 100/10 en células de neuroblastoma humano empleando el ensayo del MTT.....	39
<b>Figura 19.</b> Gráficos de barras donde se evalúa la citotoxicidad de diferentes concentraciones de P-CTX3C en un medio con una concentración 100/10 $\mu$ M de ouabaína/veratridina empleando el ensayo del Alamar Blue.. .....	40

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las biotoxinas marinas encontradas en las costas europeas, incluyendo su mecanismo de acción y las concentraciones máximas legisladas.....	15
---	----

## Abreviaturas

AD	Ácido domoico (o toxina amnésica)
ANOVA	Análisis de la varianza (analysis of variance)
AO	Ácido ocadaico
ASP	Toxinas amnésicas
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín trifosfato
AZA	Azaspirácido
BSA	Albúmina de suero bovino (bovine serum albumin)
CI	Iminas cíclicas
CTX	Ciguatoxina
DMEM/F12	Medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagles medium)
DMEN-NEAA	Medio de cultivo DMEN suplementado con aminoácidos no esenciales (Non essential aminoacids).
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTX	Dinofisitoxina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
EGTA	Ácido etilenglicol-diamino tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
Eq	Equivalentes
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBS	Suero fetal bovino (fetal bovine serum)
GTP	Guanosína-5'-trifosfato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico

HEK Na <sub>v</sub> 1.6	Células de riñón humano transfectadas con la subunidad 1.6 del canal de sodio dependiente de voltaje.
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
LC-MS/MS	Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry)
LDH	Lactato deshidrogenasa
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
Na-K-ATPasa	Bomba de sodio-potasio
N2a	Neuroblastoma de ratón
O/V	Ouabaína/Veratridina
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PSP	Toxinas paralizantes
PLTX	Palitoxina
PTX	Pectenotoxina
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano
SPX	Espirólidos
STX	Saxitoxina (o toxina paralizante)
TTX	Tetrodotoxina
UI	Unidades internacionales
VGSC/CSDV	Canales de sodio dependientes de voltaje
YTX	Yesotoxina

# 1. Introducción

## 1.1 Floraciones algales nocivas y cambio climático

Los océanos cubren más del 70 % de la superficie del planeta, lo que representa el 97 % del agua total y permite que alberguen ecosistemas muy diversos, proporcionando una importante fuente de comida y fármacos (Landrigan et al., 2020) a las personas. No obstante, es de destacar también la importancia de las aguas marinas como un lugar de ocio con importante repercusión en la economía de diferentes países y de especial repercusión en la subsistencia económica de buena parte de la población española y gallega (Leao et al., 2018). Por este motivo, la salud de los océanos es muy importante para la salud humana, especialmente para las personas que viven en lugares costeros. Sin embargo, los océanos en estos momentos se encuentran amenazados y la principal razón de esta amenaza es el cambio climático, ocasionado en gran parte por la contaminación producida por las actividades humanas (Landrigan et al., 2020).

La principal causa del cambio climático es el efecto invernadero que existe de manera natural, y permite a los seres humanos habitar el planeta con una temperatura compatible con la vida (Cassia et al., 2018). Se ha descrito que el efecto invernadero se produce como consecuencia de la acumulación de gases en la atmósfera capaces de absorber la radiación infrarroja procedente del sol, calentando así la superficie terrestre (Kirk-Davidoff, 2018). A estos gases se le denominan gases de efecto invernadero y son el vapor de agua, el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), el metano ( $\text{CH}_4$ ), el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y el ozono ( $\text{O}_3$ ) troposférico (Kweku et al., 2017), siendo el más importante el vapor de agua (Cassia et al., 2018).

Es de destacar que en las últimas décadas ha aumentado considerablemente la concentración de gases de efecto invernadero debido a la contaminación humana, especialmente los niveles de  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ . Estos gases provienen en su mayor parte de la quema de combustibles orgánicos (en los vehículos de transporte, calefacciones e industrias) y del sector de la agricultura y de la ganadería, en especial de la quema de biomasa y de la ganadería intensiva, que favorece la utilización de maquinaria agrícola y fertilizantes basados en combustibles fósiles (Qiao et al., 2019).

Como consecuencia, se estima que el aumento de la concentración de estos gases tóxicos causa la muerte de más de 9 millones de personas cada año, además de producir graves pérdidas económicas. Asimismo, estos gases también son la causa de cambios climáticos, como el aumento considerable de la temperatura de aire y océanos, inundaciones, sequías, olas de calor extremo (Cassia et al., 2018) y de la acidificación de aguas oceánicas (Botana, 2016).

A causa del cambio climático, los océanos están experimentando un grave estrés ambiental. Las capas de agua más superficiales son las más afectadas, debido a que responden más rápida e intensamente que las capas profundas a las variaciones en las condiciones atmosféricas, como el

calentamiento global (Trainer et al., 2020). En estas capas oceánicas superficiales habitan muchos microorganismos, como el fitoplancton, y los cambios en la temperatura del agua afectan a su tasa de crecimiento, fotosíntesis y captación de nutrientes (Vilariño, 2018).

Las especies de fitoplancton capaces de provocar floraciones de algas nocivas son las primeras que pueden responder a estos cambios en las condiciones de los océanos, pudiendo distribuirse y multiplicarse en zonas de los océanos donde antes eran incapaces de habitar por las características fisicoquímicas de las aguas marinas (Trainer et al., 2020). Las especies que poseen esta capacidad pertenecen a la superclase de dinoflagelados y diatomeas (Farabegoli et al., 2018) y se caracterizan por poseer tiempos de generación muy rápidos y vidas cortas, pudiéndose multiplicar muy fácilmente en condiciones favorables (Irwin et al., 2015). Tanto es así, que las floraciones algales nocivas pueden alcanzar concentraciones de hasta mil millones de células por litro dando una coloración característica al agua que habitualmente se denomina marea roja, aunque estas floraciones de microalgas pueden proporcionar diferentes colores a la superficie marina, dependiendo de la especie de fitoplancton (Vilariño, 2018). Sin embargo, estas especies nocivas sólo suponen un 5 % del total de especies de fitoplancton conocidas (Tester et al., 2020).

Las floraciones de algas nocivas se producen de forma natural, cuando existen unas condiciones ambientales ideales para su proliferación. Sin embargo, en las últimas décadas estas floraciones han ido aumentando exponencialmente como consecuencia del cambio climático (Farabegoli et al., 2018), por el exceso de nutrientes, como el nitrógeno y fósforo, producido por la eutrofización y por las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> acumuladas como consecuencia de la contaminación atmosférica (Estevez et al., 2019; Tester et al., 2020). Otros autores también achacan este aumento y extensión de las floraciones algales al incremento del transporte marítimo que ocasionó por ejemplo la apertura del canal de Suez, hecho que ha permitido que las especies de fitoplancton de las aguas del Océano Índico y Mar Rojo invadan las aguas del Mar Mediterráneo (Botana, 2016). El gran problema de estas floraciones algales es que producen biotoxinas nocivas para la salud de las personas y animales (Farabegoli et al., 2018), siendo un grave problema para la salud pública y ocasionando graves pérdidas económicas en el sector pesquero y sanitario (Farabegoli et al., 2018; Landrigan et al., 2020; Solino and Costa, 2020), pudiendo llegar a ocasionar, en los casos más graves, muertes (Farabegoli et al., 2018).

Una de las características de las ficotoxinas es que son moléculas muy complejas, con gran cantidad de estereoisómeros y enlaces poliéter, por lo que las convierte en moléculas muy difíciles de sintetizar con la química actual (Vilariño, 2018). Hoy en día se desconoce la función de las biotoxinas marinas en el desarrollo de los organismos productores, aunque se cree que puede ser un mecanismo de defensa contra un crecimiento desmesurado de otros animales depredadores (Botana, 2016; Vilariño, 2018).

Algunas de las especies de algas de especial importancia para la salud pública son las que pertenecen a los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Dinophysis* y *Pseudo-nitzschia*. No obstante, las intoxicaciones humanas por toxinas marinas en su gran mayoría se producen por el consumo de peces o moluscos filtradores, como los mejillones, las ostras y las almejas (Farabegoli et al., 2018), aunque también se han detectado toxinas marinas en crustáceos y equinodermos (Vilariño, 2018) puesto que estos animales se alimentan por filtración, pudiendo acumular las biotoxinas que producen las algas de las que se alimentan (Farabegoli et al., 2018). Cabe destacar que también existen bacterias capaces de sintetizar compuestos análogos a las biotoxinas marinas, como son las cianobacterias, cuyo hábitat se encuentra en las aguas dulces (Botana and Alfonso, 2015). Además, se han descrito intoxicaciones producidas por el simple contacto de la toxina con la piel o inhalando aerosoles, como ocurre en el caso de las brevetoxinas y de las palitoxinas (Vilariño et al., 2018).

## **1.2 Ficotoxinas marinas reguladas en Europa y toxinas emergentes**

Las ficotoxinas normalmente encontradas en las costas europeas son toxinas lipofílicas y hidrofílicas. Por un lado, dentro de las toxinas lipofílicas destacan el ácido ocadáico (AO), las dinofisistoxinas (DTX), las pectenotoxinas (PTX), las yesotoxinas (YTX) y los azaspirácidos (AZAs). Por otro lado, entre las toxinas hidrofílicas se encuentran el ácido domoico (AD, o toxina amnésica) y la saxitoxina (STX, o toxina paralizante) (Gerssen et al., 2010). Todas estas toxinas se encuentran reguladas a nivel europeo en el Reglamento (CE) 853/2004, donde se establece la concentración máxima que puede contener una muestra del pescado o molusco para su comercialización.

Sin embargo, en los últimos años, debido al cambio climático, se ha descrito la aparición en latitudes europeas de biotoxinas propias de aguas más cálidas, como la tetrodotoxina, las ciguatoxinas, las palitoxinas o las iminas cíclicas, y algunas de ellas todavía no se encuentran reguladas en la legislación europea (Gerssen and Gago-Martinez, 2019). En la tabla 1 se resumen los principales grupos de biotoxinas marinas descubiertas hasta el momento en las costas europeas, así como su concentración máxima regulada en productos marinos.

	Grupo	Toxinas representantes	Mecanismo de acción	Producto marino afectado	Límites en la UE
Lipofílicas	Toxinas diarreas	Ácido ocadaico (OA)	Inhibición de fosfatasa en intestino	Moluscos	160 µg Eq/kg
		Dinofisistoxinas (DTX)			
		Pectenotoxinas (PTX)	Inhibe la polimerización de la actina en hígado		
	Azaspíricos	Azaspírico 1-3 (AZA 1-3)	Desconocido. Afecta a múltiples órganos.	Moluscos	160 µg-Eq/kg
	Yessotoxinas	Yesotoxina (YTX)	Activa la fosfodiesterasa 4A en corazón	Moluscos	3.75 mg-Eq/kg
	Iminas cíclicas	Gimnodimina, espirólidos (SPX)	Bloquean los receptores nicotínicos en el sistema nervioso	Moluscos	No reguladas
Toxinas ciguatera	Ciguatoxinas (CTX)	Activa los CSDV en las neuronas	Pescados	*	
Hidrofilicas	Toxinas amnésicas	Ácido domoico (AD)	Activa los receptores de kainato en el sistema nervioso	Moluscos y pescados	20 mg/kg
	Toxinas paralizantes	Saxitoxina (STX)	Bloqueo de los CSDV en las neuronas	Moluscos	800 µg/kg
	Tetrodotoxinas	Tetrodotoxina (TTX)	Bloqueo de los CSDV en las neuronas	Moluscos	*
H/L	Palitoxinas	Palitoxina (PLTX)	Bloqueo de Na/K-ATPasa	Equinodermos	No reguladas

Tabla 1. Clasificación de las biotoxinas marinas encontradas en las costas europeas, incluyendo su mecanismo de acción y las concentraciones máximas legisladas. CSDV: Canales de sodio dependientes de voltaje; Eq: equivalentes. H: Hidrofilicas; L: Lipofílicas \*Se prohíbe la comercialización de productos pesqueros que contengan ciguatoxinas y tetrodotoxinas. Adaptado de (Botana, 2016; Estevez et al., 2019).

En el presente estudio experimental se han estudiado dos de los grupos de toxinas consideradas en Europa como biotoxinas emergentes, que pertenecen a las familias de las ciguatoxinas y las tetrodotoxinas y cuya estructura química se muestra en las figuras 1A y 2B respectivamente.

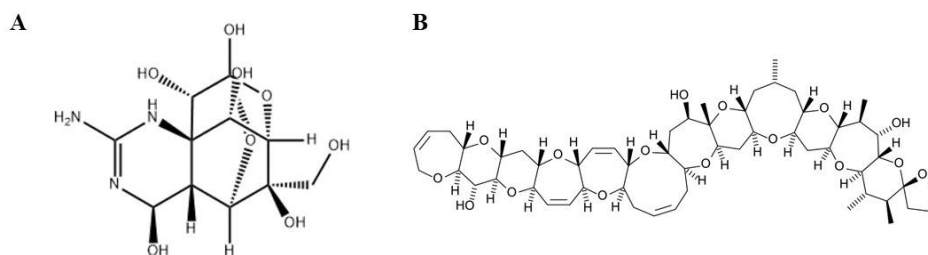


Figura 1. Estructura química de la tetrodotoxina (A) y de la ciguatoxina pacífica P-CTX 3C (B). Imágenes tomadas de National Center for Biotechnology Information (2021).

Puesto que este Trabajo Fin de Grado se ha centrado en el análisis de los efectos de estos compuestos en células humanas, a continuación se describen con más detalle las características principales de estos compuestos.

### 1.3 Ciguatoxinas, distribución e impacto sobre la salud humana

Las ciguatoxinas son toxinas lipofílicas con estructura química de poliéteres cíclicos (Yasumoto, 2001; Solino and Costa, 2020) y están producidas por dinoflagelados epibentónicos de los géneros *Gambierdiscus spp.* y *Fukuyoa spp.* (Parsons et al., 2012; Estevez et al., 2019), cuyas imágenes a microscopía óptica se observan en la figura 2. Estos microorganismos crecen adheridos a macroalgas que son ingeridas por los peces herbívoros, adquiriendo así las ciguatoxinas. Estos peces, a su vez, entran en la cadena trófica de los peces piscívoros, bioacumulando estas toxinas en mayores concentraciones (Vilariño et al., 2018). Las personas se intoxican consumiendo pescado que contiene dicha biotoxina, una enfermedad conocida como ciguatera (Friedman et al., 2017; Solino and Costa, 2020), aunque también se ha descrito recientemente la presencia de ciguatoxinas en moluscos (Gatti et al., 2018). Hoy en día, se han identificado más de 400 especies marinas implicadas en la intoxicación con ciguatoxinas en personas (Sanchez-Henao et al., 2019) y se estima que existen entre 10.000 y 500.000 casos al año de ciguatera en humanos, aunque este dato podría estar subestimado dado que no todos los casos de intoxicaciones se reconocen o se reportan, debido a que los síntomas propios de la intoxicación pueden confundirse con otras alteraciones y solamente se identifican adecuadamente cuando se asocian a la ingesta de pescados o moluscos (Traylor and Singhal, 2020).

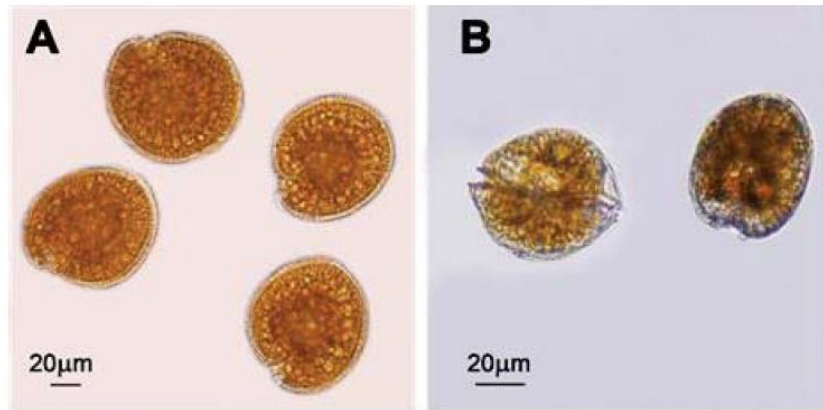


Figura 2. Imágenes de *Gambierdiscus toxicus* (A) y *Fukuyoa paulensis* (B) (Chinain et al., 2020).

Las ciguatoxinas se clasifican en tres grupos según su origen, las del océano Pacífico, las del océano Índico y las del mar Caribe. De acuerdo con esto, para distinguir el origen de estas toxinas se ha decidido añadir antes del nombre una letra para identificarlas siendo, P-CTX las ciguatoxinas pacíficas, I-CTX las índicas y C-CTX las caribeñas (Friedman et al., 2017). En la figura 3 se representa la distribución mundial actual de cada una de estas familias de ciguatoxinas. Las toxinas de las distintas zonas difieren en su estructura y potencia, de hecho, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) atribuye a las toxinas pacíficas una potencia tóxica 10 veces superior a la toxicidad de los análogos caribeños (EFSA, 2010). La contaminación de alimentos con ciguatoxinas no modifica su sabor, su color ni su olor, por lo que resulta complicado identificar a simple vista esta contaminación. Asimismo, las ciguatoxinas resisten el calor y la congelación, además de la acción de los ácidos (Friedman et al., 2017).

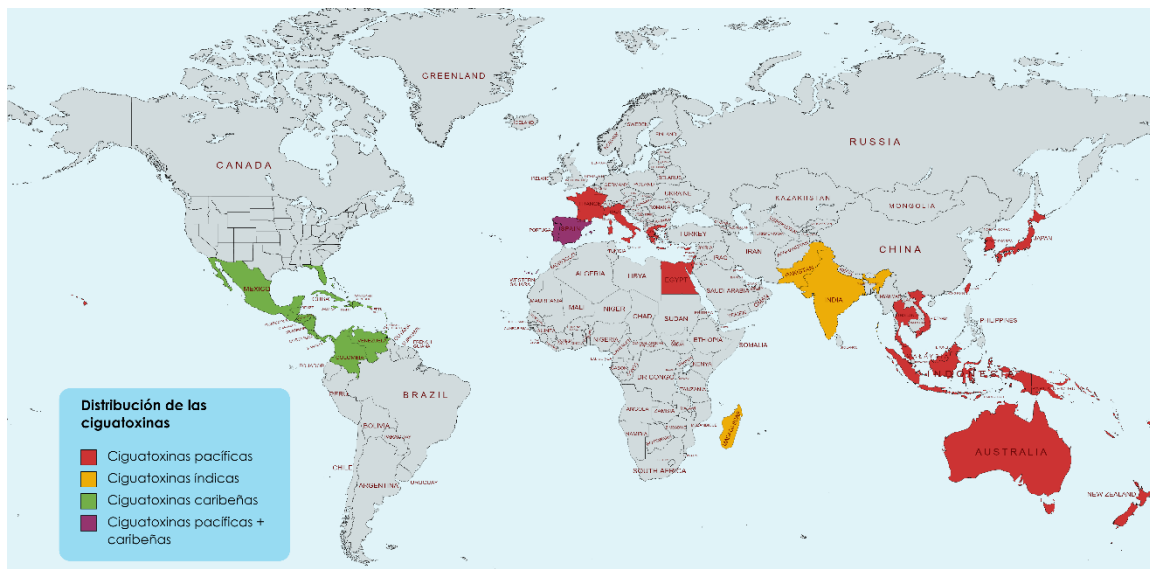


Figura 3. Distribución de cada grupo de ciguatoxinas en el mundo. En color rojo se marcan los países en los que se ha reportado la presencia de toxinas pacíficas en sus costas, en amarillo la distribución de las ciguatoxinas índicas, en verde la localización geográfica de las ciguatoxinas caribeñas y en morado los países en los que se han identificado ciguatoxinas pacíficas y caribeñas (EFSA, 2010; Chinain et al., 2021). Realizado con mapchart.net.

El mecanismo de acción de las ciguatoxinas consiste en activar los canales de sodio dependientes de voltaje uniéndose al sitio 5 de la subunidad  $\alpha$ , lo que da lugar a que los poros iónicos del canal de sodio estén abiertos a potenciales más negativos, incluso al potencial de reposo. Consecuentemente, la entrada de sodio en la célula provoca la despolarización de la membrana plasmática y desencadena potenciales de acción espontáneos (Traylor and Singhal, 2020).

La ciguatera en humanos puede causar síntomas muy variados que incluyen trastornos neurológicos, cardiovasculares o gastrointestinales que pueden durar días, semanas o meses, especialmente en el caso de las alteraciones neurológicas (Friedman et al., 2017; Chinain et al., 2019; Sanchez-Henao et al., 2019). En raras ocasiones, los síntomas pueden durar incluso años después de la intoxicación (Vilariño et al., 2018).

Los síntomas gastrointestinales suelen aparecer entre los 30 minutos y las 12 horas tras haber consumido el alimento contaminado con la toxina y entre los síntomas reportados destacan vómitos, diarrea y dolor abdominal (Traylor and Singhal, 2020). Por otro lado, los síntomas neurológicos aparecen predominantemente en la fase aguda en el caso de la ciguatera pacífica e índica, unas 48 horas después de la ingestión de alimentos contaminados con estas toxinas. Un síntoma muy característico y frecuente de esta enfermedad es la alodinia por frío, una percepción errónea en la que el contacto con superficies frías desencadena una sensación de ardor o dolor, aunque también están descritos otros síntomas como parestesias, mareos y alteraciones del sentido del gusto (Vilariño et al., 2018). Por último, entre los síntomas cardíacos destacan hipotensión y bradicardia en la fase aguda de la enfermedad (Traylor and Singhal, 2020).

En cuanto a la detección de la toxina, existen muchos métodos capaces de detectar las ciguatoxinas, entre ellos destacan los inmunoensayos, la cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS/MS, del inglés “Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry”) y los ensayos citotóxicos (Traylor and Singhal, 2020). Sin embargo, estos métodos no suelen estar disponibles en el momento de la emergencia sanitaria, por lo que no son prácticos para diagnosticar esta enfermedad en personas. Por lo tanto, el diagnóstico se suele basar en la historia clínica y en los síntomas que padece el paciente, así como en la presencia de peces o moluscos, susceptibles de estar contaminados con ciguatoxina, que hayan sido ingeridos por el enfermo en su dieta reciente (Chinain et al., 2019). También se ha descrito la transmisión de la intoxicación de persona a persona a través de la placenta, de la lactancia o de las relaciones sexuales (Vilariño et al., 2018).

No existe un tratamiento específico para esta intoxicación, ya que no se ha descubierto ningún antídoto (Armstrong et al., 2016). Por lo tanto, el tratamiento se basa en cuidados de apoyo, evitando la deshidratación y las alteraciones electrolíticas que puedan causar los síntomas gastrointestinales. También puede ser de ayuda tratar la bradicardia con fármacos como la



si bien recientemente se ha confirmado la ausencia de toxicidad en ratones después de la administración subcrónica, vía oral durante 28 días, de esta dosis de tetrodotoxina (Boente-Juncal et al., 2020). El único país europeo que hasta ahora ha empezado a regular los niveles de TTX en productos pesqueros es Holanda (Gerssen et al., 2018).

Con respecto a su mecanismo de acción, la tetrodotoxina es un potente inhibidor de los canales de sodio dependientes de voltaje. Esta toxina se une al sitio 1 de los canales de sodio dependientes de voltaje de los tejidos excitables de la víctima, como músculos y nervios, evitando que el sodio entre en la célula, lo que conlleva un bloqueo del impulso nervioso y consecuentemente, una parálisis en estos tejidos (Bane et al., 2014). Posee una elevada toxicidad en seres humanos, siendo 50 veces más potente que la estricnina y los curares (Madejska et al., 2019).

Se cree que el origen de esta toxina se encuentra en microorganismos marinos, como determinadas bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Shewanella*, *Alteromonas* (Leao et al., 2018), *Roseobacter*, *Raoultella*, *Actinomyces*, *Microbacterium* y *Serratia* (Kotipoyina et al., 2020). Sin embargo, otros autores también sugieren que el origen de esta toxina se encuentre en microalgas dinoflageladas, más concretamente las de la especie *Alexandrium tamarense* (Biessy et al., 2019). Recientemente, se ha identificado en las rías gallegas la producción de tetrodotoxina por la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*, muy común en moluscos bivalvos (Leao et al., 2018). No obstante, todavía no se conoce el mecanismo exacto de la biosíntesis de esta sustancia (Katikou, 2019; Makarova et al., 2019).

Los síntomas de una intoxicación aguda por tetrodotoxina en personas aparecen muy rápidamente, dependen de la cantidad de toxina consumida, e incluyen comúnmente alteraciones neurológicas y cardiovasculares. En cuanto a los síntomas neurológicos destacan parestesia de la lengua y los labios, parálisis motora, falta de coordinación, dificultad para hablar y afonía. Por otro lado, entre los síntomas cardiovasculares destacan hipotensión, bradicardia y arritmias cardíacas. En casos graves se produce la muerte por insuficiencia respiratoria y cardíaca (Madejska et al., 2019).

En cuanto al diagnóstico de la intoxicación por TTX, de la misma forma que ocurre con las ciguatoxinas, no existen pruebas laboratoriales específicas para diagnosticar esta intoxicación de forma rápida. Se pueden utilizar bioensayos con ratones o cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas, pero no son técnicas prácticas para una urgencia sanitaria (Kotipoyina et al., 2020). Para esta intoxicación tampoco existe un tratamiento específico. Se trata de una molécula de bajo peso molecular, soluble en agua y que no se une a proteínas plasmáticas, por lo que realizar una hemodiálisis es una de las mejores opciones para eliminar el tóxico del organismo (Alhatali et al., 2021). Mientras tanto, es recomendable proporcionarle al paciente apoyo respiratorio y realizar un lavado de estómago para evitar que se siga absorbiendo más la toxina (Madejska et al., 2019). Si el paciente presenta hipotensión y bradicardia se ha estudiado la

posibilidad de añadir un fármaco anticolinérgico como la atropina y catecolaminas como la adrenalina para restablecer el ritmo cardíaco (Alhatali et al., 2021). Algunos autores también recomiendan utilizar lidocaína para tratar las arritmias cardíacas (Hong et al., 2019) y neostigmina para evitar el fallo respiratorio (Liu et al., 2015).

## 2. Objetivos

Los objetivos principales del presente Trabajo de Fin de Grado experimental se han centrado en las biotoxinas emergentes, ya que existe una falta de estudios sobre su citotoxicidad y las diversas opiniones de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria han hecho especial hincapié, durante los últimos años, en la necesidad de mejorar los métodos de detección de estas toxinas y de profundizar en su toxicidad a largo plazo. Teniendo en cuenta esto, los objetivos son los siguientes:

- Establecer un método rápido y fiable de cuantificación biológica de las toxinas marinas del grupo de las ciguatoxinas.
- Determinar el método de interacción de anticuerpos anti-tetrodotoxina con esta toxina marina y con los canales de sodio dependientes de voltaje.

### 3. Material y métodos

#### 3.1 Toxinas y reactivos empleados

Para realizar los ensayos de este Trabajo Fin de Grado se han utilizado varias toxinas. Por un lado, la toxina TTX es una disolución formada por tetrodotoxina (CAS Number 4368-28-9) y 4,9-anhidro tetrodotoxina (CAS number 13072-89-4) diluidas en ácido acético 1mM (pH 3.91) a una concentración de tetrodotoxina de  $25.9 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$  y 4,9-anhidro tetrodotoxina  $2.99 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$  que proviene de Laboratorios CIFGA (Lugo, España). Por otro lado, la ciguatoxina P-CTX-3C se obtuvo de Wako (FUJIFILM Wako Chemicals Europa GmbH, Neuss, Alemania) y se disolvió a una concentración 10  $\mu\text{M}$  en dimetilsulfóxido (DMSO).

El resto de los reactivos utilizados son de grado analítico y se han obtenido de SIGMA (Merck Life Science S.L.U., Madrid).

#### 3.2 Líneas celulares empleadas

Para estudiar el método de interacción del anticuerpo anti-TTX con esta toxina y con los canales de sodio dependientes de voltaje se han utilizado células de riñón humano modificadas genéticamente para que expresen la subunidad 1.6 del canal de sodio dependiente de voltaje (HEK  $\text{Na}_v1.6$ ). El laboratorio GlaxoSmithKline (GSK, R&D, Stevenage, UK) ha proporcionado estas células mediante un acuerdo de transferencia de material.

Por otro lado, para establecer un método rápido y fiable de cuantificación biológica de ciguatoxinas se han utilizado células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) obtenidas del ATCC (del inglés “American Type Culture Collection”) número CRL-2266 (Virginia, Estados Unidos).

##### 3.2.1 Cultivo de células HEK $\text{Na}_v1.6$

Estas células se cultivan en frascos de cultivo de 250 ml o de 50 ml, a los que se le añade un medio preparado en el propio laboratorio. Este medio contiene un medio comercial DMEM/F12 (Dulbecco’s modified Eagles medium Gibco, 1:1) con L-glutamina y 2,438 g/L de bicarbonato sódico, el cual se suplementa en el laboratorio con un 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés “fetal bovine serum”, Gibco) y un 1% de un medio rico en aminoácidos no esenciales (DMEN-NEAA, del inglés “non essential aminoacids”, Gibco). Este medio se conserva refrigerado y, antes de utilizarse, se añade un antibiótico denominado geneticina a una concentración de 400  $\mu\text{g/ml}$  para evitar posibles contaminaciones y seleccionar únicamente a las células que expresan la subunidad 1.6 de los canales de sodio dependientes de voltaje.

Las células se mantienen en un incubador a 37 °C con una atmósfera de 5 %  $\text{CO}_2$ , 95 %  $\text{O}_2$  y 95-98 % de humedad hasta que se consigue un 80 % de confluencia, momento en el cual se realiza el pase de células. En la figura 5 se puede observar una comparación de la confluencia de varios

frascos de cultivo, uno con una confluencia baja y otro con una confluencia ideal para realizar un nuevo pase de células.

Es importante destacar que se debe cambiar el medio a las células cada dos días, ya que se acumulan los desechos y se agotan los nutrientes, tanto en las placas de siembra como en los frascos de cultivo.

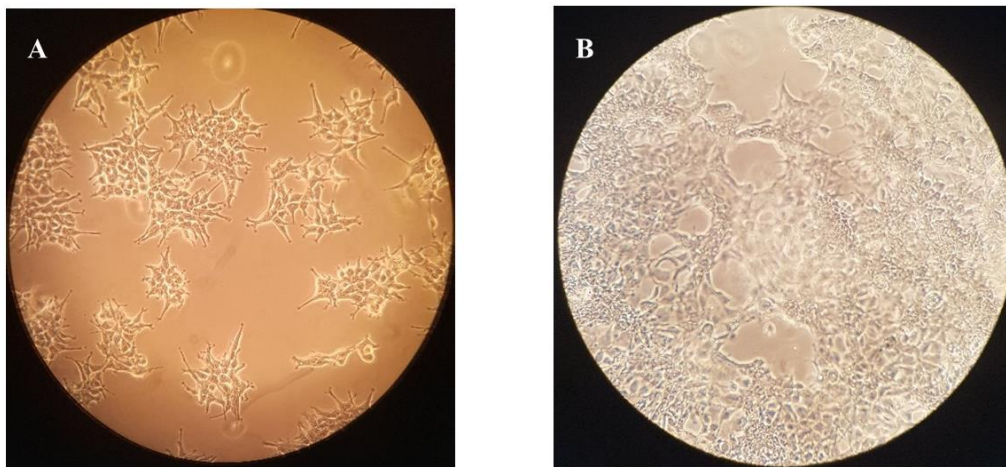


Figura 5. Frascos de cultivo de células HEK Nav1.6 vistos con un microscopio óptico invertido. En la imagen A las células poseen una confluencia del 20 %, mientras que en la imagen B las células poseen una confluencia del 80 % (ideal para realizar el pase o siembra de células).

La siembra de células se realiza en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad celular de 30.000 células/ml de medio. Puesto que estas células se van a emplear para estudios electrofisiológicos o para inmunocitoquímica, se siembran sobre una superficie que permita sacarlas de la placa para realizar los experimentos. En este caso se ha introducido en cada pocillo un cubreobjetos de vidrio mantenido en etanol al 70% hasta el momento de su uso.

Posteriormente, se obtiene el frasco de cultivo del incubador, se extrae el medio y se añaden 5 ml del medio HBSS (del inglés, “Hanks Balanced Salt Solution”) para limpiar los restos que hayan podido quedar del medio DMEM/F12 y se vuelve a extraer este medio. El siguiente paso consiste en añadir 3 ml de tripsina/EDTA (ácido etilendiaminetetracético) al frasco de cultivo para desprender las células y esperar 3 minutos a que la tripsina haga efecto, momento en el cual se añaden 7 ml de medio celular con FBS con el fin de inactivar la acción de la tripsina. Después, se pipetea todo el medio que contiene el frasco y se introduce en un tubo de centrifuga, extrayendo una pequeña cantidad a un tubo de microcentrifuga.

A continuación, se centrifuga el tubo con las células a una velocidad de 800 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, se coge el tubo de microcentrifuga y se cuentan las células en una cámara de Thoma, para calcular así la densidad celular de la suspensión. Por último, se retira el sobrenadante del tubo de centrifuga, se añaden

10 ml de medio resuspendiendo varias veces para homogenizar y se siembra la cantidad correspondiente en cada placa para obtener la densidad final de 30.000 células/ml. El volumen final de medio con suspensión celular en cada pocillo es de 1 ml.

Las células se mantienen en el incubador a 37 °C durante 2-3 días hasta obtener una confluencia del 80 %. Cuando se llega a este porcentaje de confluencia, las placas donde están cultivadas las células se cambian a otro incubador, el cual posee una temperatura de 30 °C, necesaria para que estas células expresen la subunidad 1.6 del canal de sodio dependiente de voltaje (Burbidge et al., 2002).

### 3.2.2 Cultivo de células de neuroblastoma (SH-SY5Y)

Estas células se han cultivado en los mismos frascos de cultivo que las células HEK Na<sub>v</sub>1.6 pero con un medio de cultivo distinto. El medio de cultivo utilizado es DMEM/F12 (1:1), al cual se le ha añadido en el laboratorio un 10% de FBS, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células se mantienen con este medio en el incubador a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de O<sub>2</sub> y 95-98 % de humedad.

En este caso las células se han sembrado en placas de 96 pocillos para realizar ensayos de citotoxicidad, empleando una densidad celular de 12.500 células/ml y un volumen final de 200 µl de suspensión celular por pocillo.

### 3.3 Ensayos de valoración de la citotoxicidad *in vitro*

Para establecer un método rápido de cuantificación biológica de las ciguatoxinas se han utilizado dos procedimientos con el fin de evaluar la citotoxicidad *in vitro* de estas toxinas, que se basan en el empleo de dos marcadores de actividad metabólica: el MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol) y el Alamar Blue. Las células utilizadas en este ensayo son de neuroblastoma en los pases 50-55, sembradas en placas de 96 pocillos.

No obstante, antes de explicar estos dos métodos es necesario aclarar que las ciguatoxinas, por sí solas, no causan citotoxicidad, por lo que es necesario añadir otros reactivos para establecer la toxicidad de estas toxinas en los ensayos realizados (Coccini et al., 2017). Estos reactivos son la ouabaína, que es un inhibidor de la bomba sodio-potasio-ATPasa y la veratridina, que es un activador de los canales de sodio dependientes de voltaje.

Por lo tanto, antes de comenzar a evaluar la citotoxicidad *in vitro* de las ciguatoxinas, es necesario establecer la concentración de ouabaína (O) y veratridina (V) que no cause citotoxicidad en las células.

### 3.3.1 MTT de ouabaína y veratridina

El método MTT fue descubierto y desarrollado por Mosmann en 1983 y se trata de un procedimiento colorimétrico rápido que permite determinar el crecimiento y supervivencia de un cultivo celular tras el tratamiento de estas con alguna sustancia (Mosmann, 1983), en este caso las ciguatoxinas. Las mitocondrias de las células viables metabolizan este compuesto formándose formazán en su interior, de color azul oscuro. Posteriormente, se lisan todas las células con un compuesto como el DMSO o el dodecilsulfato sódico (SDS) para extraer los cristales de formazán del interior de las células y poder medir así la absorbancia.

Para realizar este procedimiento, las células de neuroblastoma con una confluencia del 80% se trataron con distintas concentraciones de O/V, desde 340/34  $\mu\text{M}$  hasta 10/1  $\mu\text{M}$ , ya que es el método estándar para la cuantificación de ciguatoxinas en neuroblastoma de ratón (Viallon et al., 2020). Previamente a este tratamiento se preparó una disolución stock con cada compuesto, una de 200 mM de ouabaína y otra de 5 mM de veratridina, ambas diluidas en DMSO. Posteriormente, se prepararon disoluciones seriadas de medio SH-SY5Y con O/V a concentraciones de 10/1, 30/3, 60/6, 100/10, 140/14, 180/18, 220/22, 260/26, 300/30 y 340/34  $\mu\text{M}$  y se trataron las células añadiendo a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de la dilución correspondiente. Es importante realizar también varios pocillos con controles de vida (con disoluciones de medio SH-SY5Y con 1 % de DMSO) y controles de muerte (con disoluciones de medio con saponina a una concentración de 1 mg/ml). Las placas tratadas se mantuvieron durante 24 horas en el incubador a 37 °C con una atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ , 95 % de  $\text{O}_2$  y 95-98 % de humedad. Una vez pasado ese tiempo, se extraen las células del incubador y se añade a cada pocillo 10  $\mu\text{l}$  de una disolución de MTT en tampón Locke's a una concentración final de 500  $\mu\text{g/ml}$  de MTT. Este tampón es una disolución compuesta por agua miliQ que contiene 154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico) y 5 mM de glucosa. A continuación, las células se incuban en un incubador de placas a 37 °C, rotando a 150 rpm durante 50 minutos. Tras este tiempo, el medio de las células se aspira, se añaden 60  $\mu\text{l}$  de DMSO a cada pocillo para lisar las células y se mantienen en oscuridad durante 24 horas, momento en el cual se lee la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de placas. En la figura 6 se muestra un esquema del método explicado.

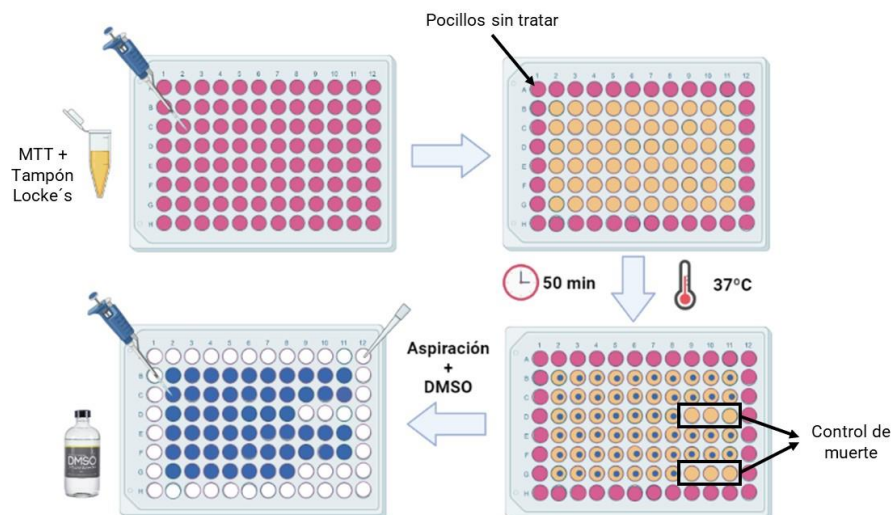


Figura 6. Esquema de realización de un ensayo de citotoxicidad utilizando MTT. Creado con BioRender.com

### 3.3.2 Ensayo de citotoxicidad con Alamar Blue de la combinación ouabaína/veratridina empleando células de neuroblastoma humano

Al igual que el MTT, el Alamar Blue es un ensayo que permite determinar la actividad metabólica de las células, que emplea un reactivo denominado resazurina (7-hidroxi-3H fenoxazina-3-ona 10-óxido), que es una molécula de color azul, inofensiva para las células, fácilmente soluble en el medio y que atraviesa la membrana de las células viables, donde se transforma a través de varias reacciones redox en un compuesto violeta brillante, denominado resorufina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona) (Rodríguez-Corrales and Josan, 2017). Por lo tanto, los pocillos con células viables se verán de color violeta mientras que los pocillos con células muertas se verán de color azul añil (O'brien et al., 2000), como se muestra en la figura 7. Por lo tanto, este método permite cuantificar la citotoxicidad de una sustancia midiendo la absorbancia colorimétrica o fluorimétrica sin necesidad de lisar las células, lo que permite la evaluación del efecto de los compuestos en el mismo cultivo a diferentes intervalos de tiempo (Kumar et al., 2018).

En este experimento se han utilizado las mismas concentraciones de ouabaína y veratridina que las utilizadas en el ensayo del MTT, excepto las concentraciones más altas (300/30  $\mu\text{M}$  y 340/34  $\mu\text{M}$ ), además de los controles con DMSO y saponina. En este caso, se han añadido 10  $\mu\text{l}$  de Alamar Blue a cada pocillo en oscuridad, ya que se trata de un compuesto fotosensible. Posteriormente, se ha medido la fluorescencia de la placa a las 4, 8, 24 y 48 horas después del tratamiento empleando longitudes de onda de excitación de 530 nm y midiendo la emisión a 590 nm.

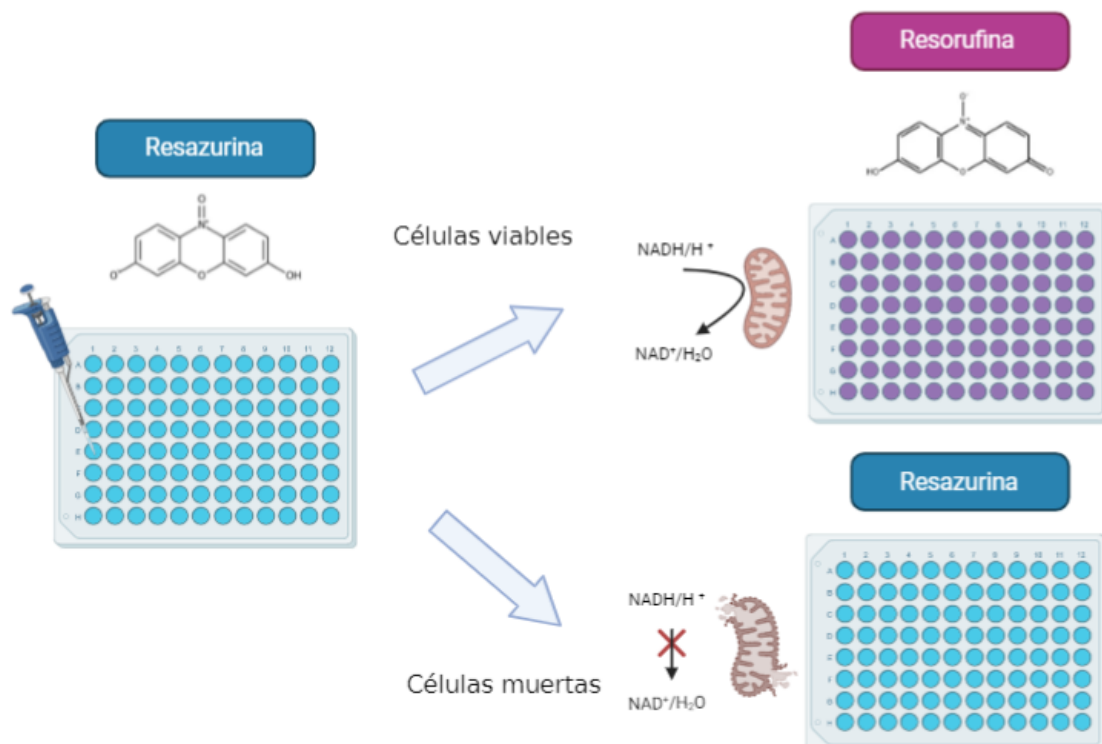


Figura 7. Esquema de realización de un ensayo de citotoxicidad utilizando Alamar Blue. Creado con BioRender.com

### 3.3.3 Evaluación de la citotoxicidad de las ciguatoxinas en células de neuroblastoma humano

Una vez conocida la concentración ideal de O/V, necesaria para incrementar la vulnerabilidad de las células a ciguatoxinas y teniendo en cuenta otros artículos de ensayos similares (Viallon et al., 2020; Loeffler et al., 2021) se decidió utilizar una concentración de O/V en el medio de 100/10  $\mu$ M. Con este medio se han hecho diluciones de la ciguatoxina pacífica CTX-3C a concentraciones finales de 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 y 10 nM en un volumen final de 100  $\mu$ l/pocillo. Una vez realizado el tratamiento se ha evaluado la citotoxicidad de estos compuestos empleando los ensayos del MTT y del Alamar Blue.

### 3.4 Determinación de la unión de un anticuerpo anti-TTX a la tetrodotoxina y a los canales de sodio dependientes de voltaje

Durante la realización del presente TFG se recibió en el laboratorio un anticuerpo creado por Sato et al. (2019) con la finalidad de crear nuevos métodos de detección y cuantificación de tetrodotoxina, por lo cual en este estudio se pretendió evaluar la interacción de este anticuerpo con la tetrodotoxina y con los canales de sodio dependientes de voltaje en células vivas. Para ello se han utilizado dos técnicas: la inmunocitoquímica y el patch-clamp.

### 3.4.1 Inmunocitoquímica

La técnica de inmunocitoquímica se ha llevado a cabo empleando células HEK Na<sub>v</sub>1.6 de los pases 20-22 sembradas en cubreobjetos en placas de 12 pocillos. En el primer experimento se ha utilizado como anticuerpo primario un anticuerpo anti-tubulina, que se une a los filamentos de tubulina del citoesqueleto, con el motivo de perfeccionar el método de inmunotinción. Posteriormente, se ha utilizado el anticuerpo anti-TTX siguiendo el mismo método. De estos 12 pocillos, se han tratado 8 de ellos con 300  $\mu$ l de una disolución de TTX 1  $\mu$ M en tampón fosfato salino (PBS, del inglés “phosphate buffered saline”) y los 4 restantes con 300  $\mu$ l de PBS, dejándolos como pocillos control. El PBS es una disolución formada por agua mili-Q a la que se añaden 137 mM de NaCl, 8,2 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 3,2 mM de KCl. La placa se mantuvo en un agitador de placas a 37 °C y 150 rpm durante 1 hora, momento en el cual se le aspiró el medio y se añadió una disolución fijadora formada por PBS y 4 % de paraformaldehído. Posteriormente, se lavaron todos los pocillos 3 veces para eliminar los restos del fijador y se le añadió una disolución de bloqueo, compuesta por PBS con un 5 % de albúmina sérica bovina (BSA, de sus siglas en inglés “Bovine Serum Albumin”) y 0,1 % de Triton X-100 (una sustancia tensoactiva).

El siguiente paso consistió en realizar la inmunotinción con el anticuerpo primario. Para ello, se utilizó en un primer momento un anticuerpo anti-tubulina de ratón y en los experimentos posteriores el anticuerpo experimental anti-TTX de conejo. En el caso del anticuerpo anti-tubulina se ha empleado a una dilución 1:250 en PBS, mientras que para el anticuerpo anti-TTX se diluyó la disolución stock de 120  $\mu$ g/ml en PBS a una proporción 1:50. Cada pocillo se mantuvo con 300  $\mu$ l de esta disolución durante toda la noche en agitación a 4 °C. Posteriormente, se lavó la placa con PBS 3 veces y se añadió el anticuerpo secundario. La función del anticuerpo secundario es unirse al anticuerpo primario marcando su posición, gracias a que el anticuerpo secundario está conjugado con una molécula de fluorocromo, la cual emite luz cuando se le excita a una determinada longitud de onda. En la figura 8 se puede observar un esquema del funcionamiento de una inmunotinción.

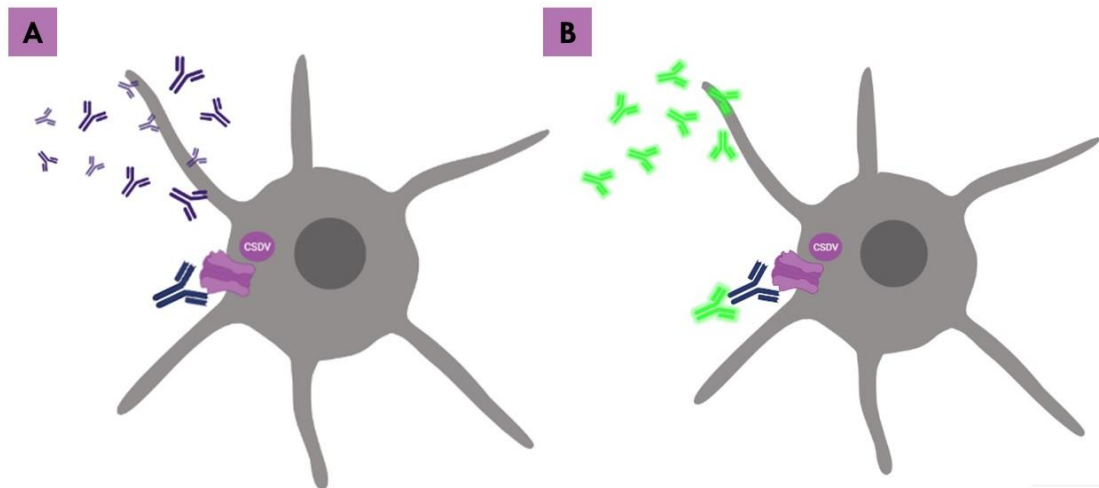


Figura 8. Proceso de inmunotinción con anticuerpo primario (imagen A) y anticuerpo secundario (imagen B). El anticuerpo primario experimental anti-TTX (azul) se une a los canales de sodio dependientes de voltaje (violeta, CSDV) de las células HEK Nav1.6, mientras que el anticuerpo secundario (verde, cargado con una molécula de fluorocromo) se une al anticuerpo primario marcando su posición.

En los experimentos realizados se probaron varios anticuerpos secundarios, teniendo en cuenta que se debe usar un anticuerpo secundario hecho en la misma especie que el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Alexa Fluor 488, R-ficoeritrina y DyLight 488 que se excitan a distintas longitudes de onda, como se aprecia en el espectro de emisión de la figura 9. El tratamiento se realizó añadiendo 300  $\mu$ l de una disolución de PBS con el anticuerpo elegido a una proporción 1:250 y las células se mantuvieron durante 1 hora en oscuridad y agitación.

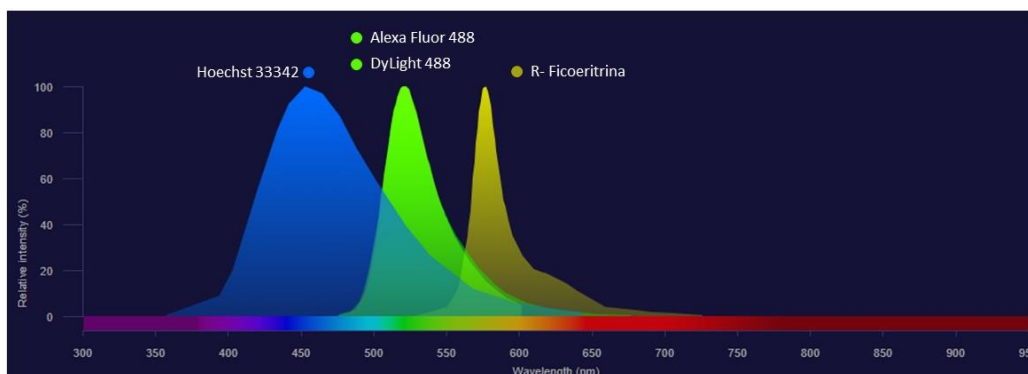


Figura 9. Espectro de excitación de los anticuerpos secundarios utilizados (Alexa Fluor 488, R- ficoeritrina y DyLight 488) y del marcador del núcleo Hoechst 33342. Creado con [www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/](http://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/)

Una vez transcurrido el tiempo establecido se lavaron los pocillos con PBS 2 veces y se les añadió a varios pocillos una gota de un marcador de núcleos celulares denominado bisbencimida o Hoechst 33342 que se excita a una longitud de onda de 450 nm, como se observa en la figura 8 junto con los anticuerpos secundarios utilizados. Posteriormente, tras 5 minutos, se lavaron las placas otras 2 veces con PBS, y los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos con líquido de montaje (PBS con 4 % de glicerina) y se sellaron con laca de uñas. Las preparaciones se

mantuvieron en oscuridad y en refrigeración hasta que se observaron en un microscopio confocal equipado con una fuente de luz láser de distintas longitudes de onda.

### 3.4.2 Registros electrofisiológicos *in vitro*

Los registros electrofisiológicos en células individuales (patch-clamp) representan la técnica experimental más empleada para estudiar la actividad de los canales iónicos de las células, por lo que desempeña un papel clave en el estudio de enfermedades cardiovasculares y neurológicas (Anecchino and Schultz, 2018). En este trabajo de fin de grado se ha utilizado esta técnica para evaluar la interacción del anticuerpo experimental anti-TTX con los canales de sodio dependientes de voltaje. Para ello se han utilizado células HEK  $Na_v1.6$  de los pases 25-28 sembradas en placas de 12 pocillos y mantenidas 48 horas en el incubador a 37 °C y 24 horas a 30 °C. El equipo necesario para la realización de esta técnica consta de una caja de Faraday (para amortiguar las interferencias eléctricas), dentro de la cual se encuentra un microscopio invertido, situado sobre una mesa antivibratoria. Además, se compone de un preamplificador, un micromanipulador, que permite controlar el movimiento de los electrodos de registro, un amplificador, un digitalizador y un ordenador. En la figura 10 se muestran los diferentes componentes del equipo utilizado durante este estudio.

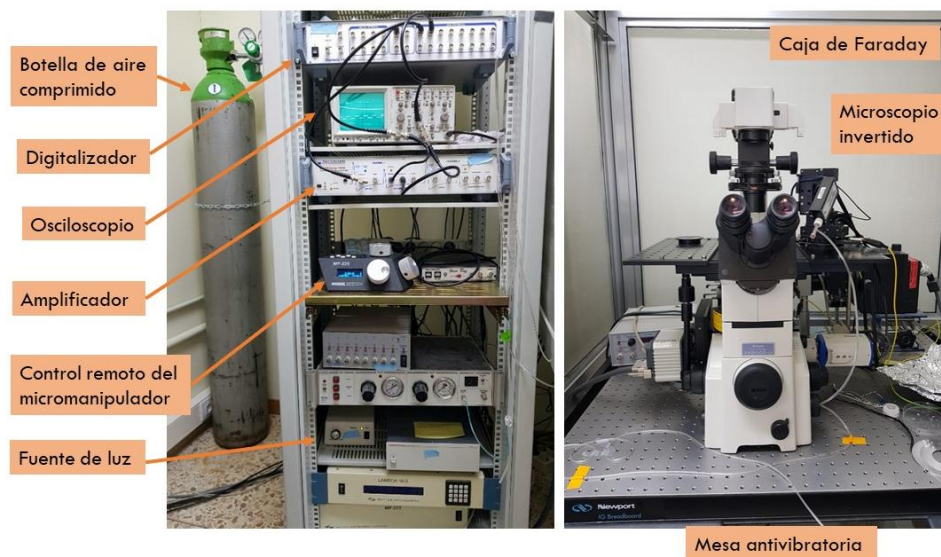


Figura 10. Equipo de patch-clamp utilizado para realizar el ensayo.

El procedimiento diseñado consiste en medir las corrientes de sodio de una célula, antes y 5 minutos después de añadirle al medio el anticuerpo experimental. Después, se añade una concentración de TTX capaz de inhibir todas las corrientes de sodio de una célula normal. Por lo tanto, antes de comenzar con el procedimiento, fue necesario realizar otro ensayo para conocer la concentración de tetrodotoxina capaz de inhibir las corrientes de sodio de la célula. Para ello, se prepararon 3 disoluciones de TTX, de concentraciones 10 nM, 100 nM y 750 nM, en tampón

Locke's a partir de una disolución stock de TTX de 240  $\mu\text{g/ml}$  realizada en ácido acético (751,7  $\mu\text{M}$ ). A continuación, los cubreobjetos con las células se introdujeron en una cámara de electrofisiología con 500  $\mu\text{l}$  de tampón Locke's. Después, se realiza una micropipeta de vidrio borosilicatado, o electrodo de registro, muy fina (resistencia entre 5 y 10  $\text{M}\Omega$ ) con un estirador de pipetas, se introduce en ella una pequeña cantidad de solución intracelular y se coloca en el preamplificador. La solución intracelular empleada estaba compuesta por agua milliQ con 110 mM de CsCl, 10 mM de NaCl, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 11 mM de EGTA (ácido etilenglicoldiaminotetraacético), 10 mM de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico), 2 mM de ATP (adenosina trifosfato) y 1 mM de GTP (guanosina trifosfato, pH 7.2). Posteriormente, se elige una célula y, con ayuda del micromanipulador, se dirige el electrodo de registro hacia ella hasta tocarla. En este momento, se procede a realizar el sello realizando vacío, tal y como se muestra en las ilustraciones 1 y 2 de la figura 11. El siguiente paso consiste en abrir el sello, para que el citoplasma de la célula conecte con el medio intracelular de la micropipeta (representado en la ilustración 3 de la figura 11). Una vez conseguido, se ajustan todos los parámetros en el software del ordenador y se observan las corrientes de la célula elegida (ilustración 4 de figura 11). En los experimentos realizados se han ajustado las capacitancias de los electrodos y se ha aplicado una compensación del 35-50 %.

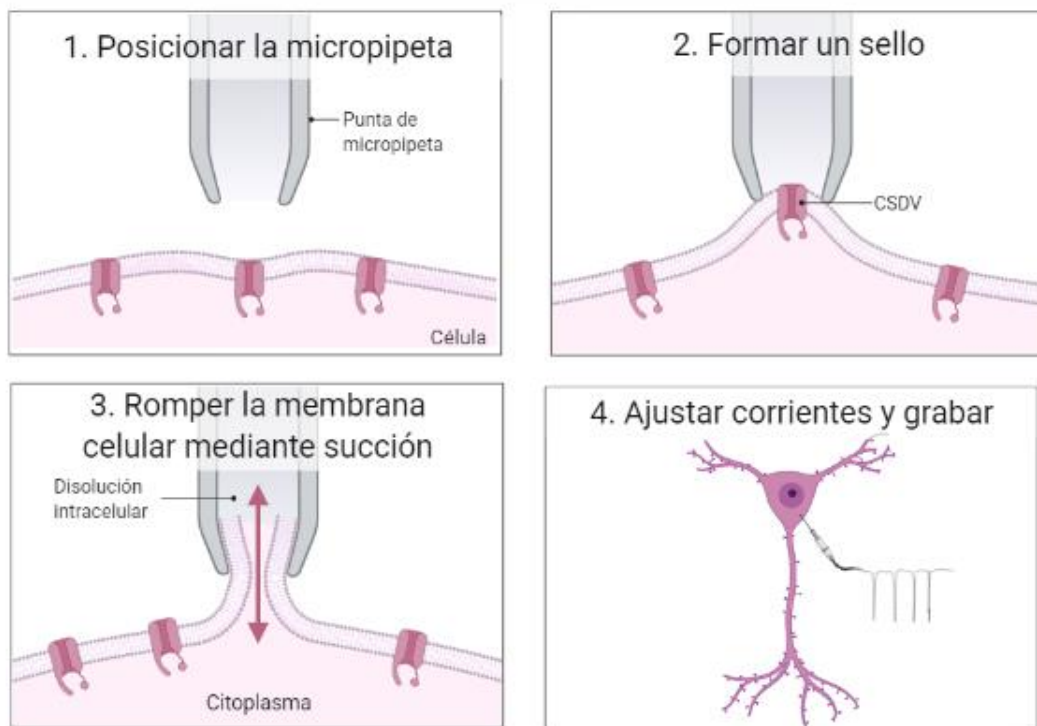


Figura 11. Esquema del procedimiento de patch-clamp empleado para medir las corrientes de los canales de sodio dependientes de voltaje (CSDV). Realizado con Biorender.com

Una vez grabadas las corrientes control de la célula, se le administraron al medio donde se encuentra la célula distintas cantidades de las diluciones realizadas de TTX hasta conseguir una

concentración final en el medio de 0,1; 0,5; 1; 5; 10 y 20 nM de TTX, registrando las corrientes de la célula 5 minutos después de añadir cada concentración de toxina. Una vez determinada la concentración de toxina necesaria para inhibir las corrientes de sodio dependientes de voltaje se evaluó el efecto del anticuerpo experimental de cara a determinar su capacidad para disminuir el efecto de la TTX. Para ello, se utilizó la misma técnica que la utilizada para medir los efectos de la TTX, pero en este caso se añadió primero el anticuerpo anti-TTX diluido a una proporción final de 1:50, grabando 5 minutos tras la adición, y posteriormente se añadió TTX a una concentración final de 20 nM, puesto que a esta concentración la toxina inhibe casi completamente las corrientes de sodio dependientes de voltaje, y el efecto producido se registró a los 5 minutos de añadir la toxina a la cámara de registro.

### **3.5 Análisis estadístico**

El análisis de todos los datos, tanto del efecto en el patch-clamp del anticuerpo experimental como de la citotoxicidad de la O/V y de la P-CTX 3C se ha realizado con el programa Microsoft Office Excel. Posteriormente, se han creado las gráficas, realizado el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y calculado los intervalos de confianza con el programa GraphPad Prism 8. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM de cómo mínimo 3 experimentos independientes.

## 4. Resultados

### 4.1 Efecto del anticuerpo Anti-TTX sobre los canales de sodio dependientes de voltaje

#### 4.1.1 Técnica de patch-clamp

Los primeros ensayos realizados consistieron en estudiar el efecto de la tetrodotoxina sobre las corrientes de sodio dependientes de voltaje de las células HEK Na<sub>v</sub>1.6. Tal como se muestra en la figura 12, la TTX inhibió las corrientes de sodio dependientes de voltaje de forma dependiente de la concentración. Los resultados obtenidos han sido que el pico de intensidad normalizada de la corriente de sodio control ha sido  $1,01 \pm 0,05$  pA ( $n = 7$ ),  $0,994 \pm 0,173$  pA ( $n = 5$ ) tras añadir al medio  $0,1$  nM TTX,  $0,96 \pm 0,099$  pA ( $n = 6$ ) en presencia de  $0,5$  nM TTX,  $0,856 \pm 0,098$  pA ( $n = 5$ ) cuando se añade al medio  $1$  nM TTX,  $0,794 \pm 0,285$  pA ( $n = 5$ ) en presencia de  $5$  nM TTX,  $0,469 \pm 0,035$  pA ( $n = 3$ ) tras añadir al medio  $10$  nM TTX y finalmente de  $0,291 \pm 0,018$  pA ( $n = 3$ ) tras añadir al medio extracelular la tetrodotoxina a una concentración final de  $20$  nM.

El ajuste de los datos obtenidos a una curva sigmoidea proporcionó la concentración de TTX necesaria para inhibir en un 50 % la intensidad de las corrientes de sodio dependientes de voltaje en esta línea celular ( $IC_{50}$ ) que fue de  $10,26$  nM (realizada con corrientes de 7 células independientes y el intervalo de confianza del 95% se situó entre  $7,108$  nM y  $14,9$  nM). También se puede apreciar en esta gráfica que, la concentración máxima de TTX utilizada ( $20$  nM) bloqueó casi completamente los canales de sodio dependientes de voltaje.

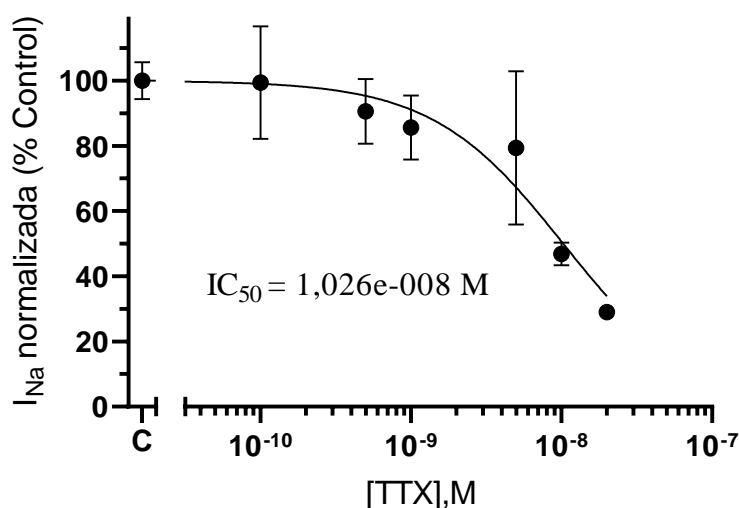


Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de TTX sobre la intensidad de las corrientes de sodio, obtenidas en células HEK transfectadas con la subunidad Na<sub>v</sub>1.6 humana de los canales de sodio dependientes de voltaje.

Conocido este dato, se ha procedido a realizar el segundo ensayo, que consistió en añadir a esta línea celular el anticuerpo experimental anti-TTX diluido en una proporción de 1:50,

observándose que, por sí solo, este anticuerpo era capaz de disminuir significativamente la intensidad de las corrientes de sodio dependientes de voltaje. Posteriormente, se añadió a las células con el anticuerpo una concentración 20 nM de TTX, ya que en la gráfica corriente-voltaje de la figura 13A se observa que la TTX sola a esta concentración inhibe un 80 % las corrientes de sodio dependientes de voltaje. Tal como se muestra en la figura 13B, el anticuerpo anti-TTX disminuyó de forma significativa el efecto de la toxina sobre los canales de sodio dependientes de voltaje.

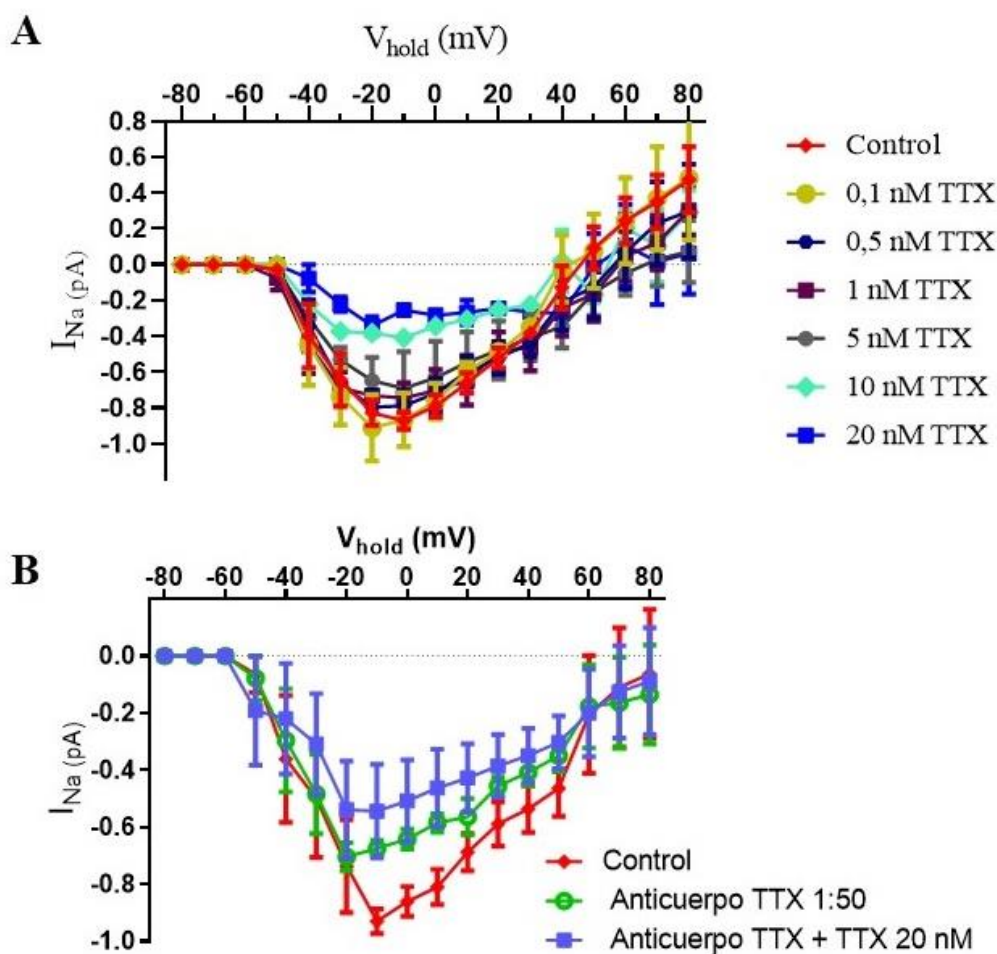


Figura 13. Gráficas corriente-voltaje que muestran el efecto de diferentes concentraciones de TTX sobre la intensidad de las corrientes de sodio dependientes de voltaje en ausencia (A) y en presencia (B) del anticuerpo anti-TTX a una dilución 1:50.

#### 4.1.2 Inmunotinción

Inicialmente, se evaluó el posible efecto de la TTX sobre la morfología celular, para ello las células HEK Na<sub>v</sub>1.6 se trataron con TTX 1  $\mu$ M durante 24 horas en cultivo y posteriormente se analizó la estructura celular empleando un anticuerpo primario que reconoce la tubulina, combinado con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Tal como se muestra en la figura 14, el tratamiento de las células con TTX no afectó la morfología celular. En esta figura se muestra a la izquierda la estructura de los microtúbulos (en verde) en células control (tratadas 24 horas con disolvente) y en células tratadas 24 horas con TTX 1  $\mu$ M. En las mismas imágenes de microscopia confocal se muestran los núcleos celulares, teñidos con bisbencimida en color azul. En este ensayo se pudo concluir que la exposición de las células HEK Na<sub>v</sub>1.6 a tetrodotoxina 1  $\mu$ M no modificaba la morfología celular, por lo cual estas condiciones se emplearon para evaluar posteriormente el efecto del anticuerpo anti-TTX.

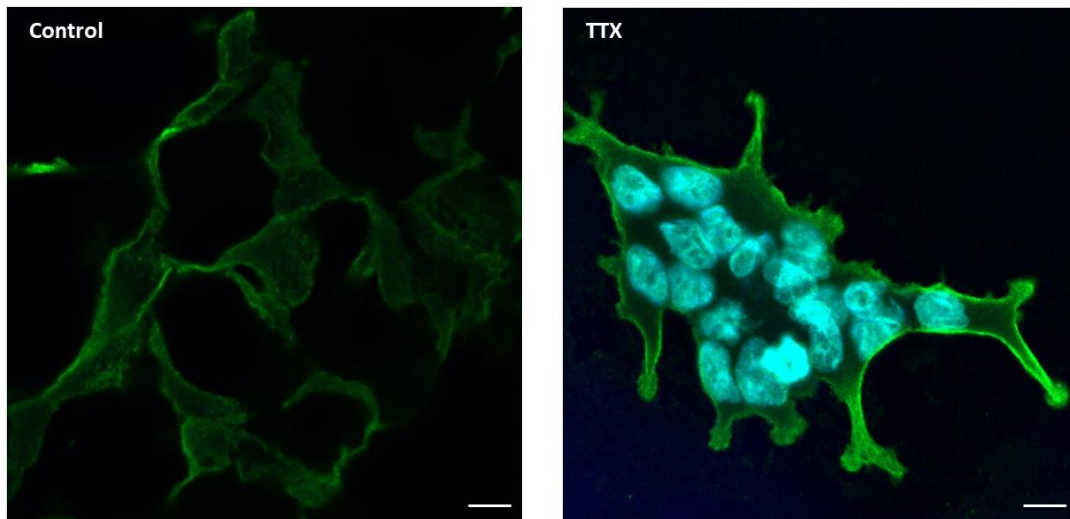


Figura 14. Imágenes de microscopia confocal que muestran la estructura de los microtúbulos (marcados con  $\beta$ -tubulina) en células control y en células tratadas con TTX 1  $\mu$ M durante 24 horas, empleando como anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. La potencia y ganancia de los láseres fue idéntica en ambas condiciones. A la izquierda se observa la imagen control (células sin TTX) y sin bisbencimida, mientras que a la derecha se muestra la imagen obtenida en células tratadas con TTX, en las cuales se identifican los núcleos celulares en azul. La barra de escala es de 20  $\mu$ m en ambas figuras.

Con la misma técnica se ha procedido a evaluar la unión del anticuerpo anti-TTX a la tetrodotoxina. Las imágenes de microscopia confocal obtenidas en células control (izquierda) y en células tratadas con TTX 1  $\mu$ M (derecha) que se muestran en la figura 15 indican que en las células incubadas con tetrodotoxina la intensidad de la fluorescencia obtenida en presencia del anticuerpo es mayor que en las células control, empleándose como anticuerpo secundario R-ficoeritrina. Tal como se aprecia en la figura 15 la mayor intensidad de la fluorescencia en la imagen de las células tratadas con TTX indica que el anticuerpo se une a la TTX que a su vez estaría unida a los canales de sodio dependientes de voltaje.

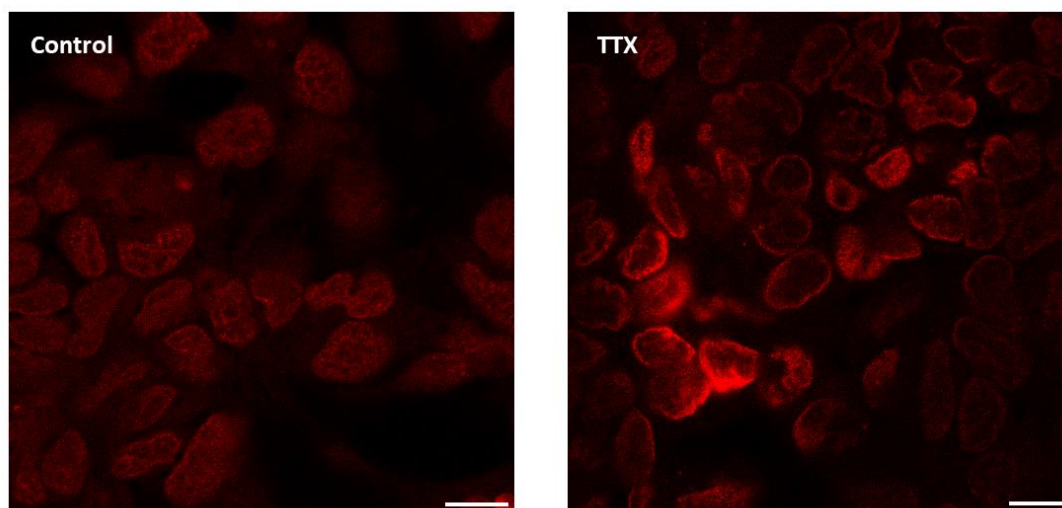


Figura 15. Resultados del procedimiento de inmunocitoquímica realizado con el anticuerpo primario experimental Anti-TTX y el anticuerpo secundario R-ficoeritrina. En la imagen derecha se puede visualizar la muestra control, mientras que en la imagen de la izquierda se encuentra la muestra tratada con TTX. Obsérvese que en la muestra tratada con TTX las membranas celulares aparecen más luminosas, debido a que es ahí donde el anticuerpo secundario se ha unido al anticuerpo primario experimental. La barra de escala es de 20  $\mu\text{m}$  en ambas figuras.

## 4.2 Citotoxicidad de las ouabaina y veratridina empleando el ensayo MTT

Para evaluar la validez del método de detección de ciguatoxinas las células de neuroblastoma se trataron durante 24 horas con distintas concentraciones de O/V y posteriormente se realizó el ensayo del MTT, no obstante, al realizar el ensayo se observó que las células se despegaban al aspirar el medio. En la figura 16 se observan los resultados obtenidos, en los que se aprecia un error estándar muy amplio.

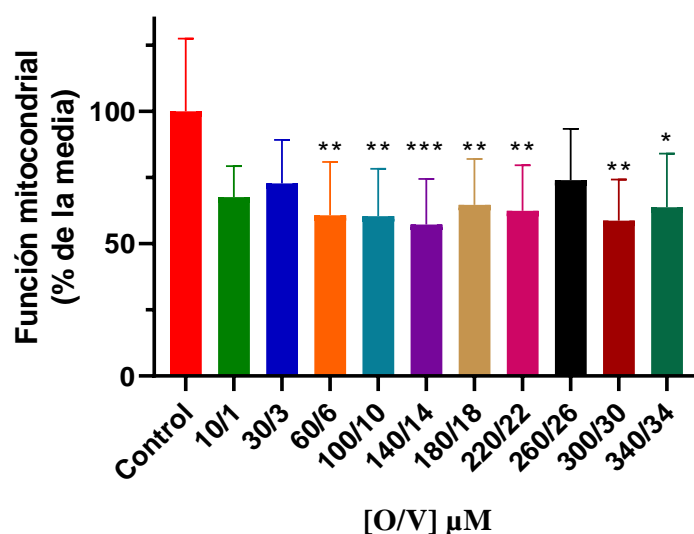


Figura 16. Gráfica de barras de MTT con concentraciones de O/V desde 10/1 hasta 340/34  $\mu\text{M}$ . En ella se expresa el porcentaje de viabilidad celular en cada condición con respecto al control ( $n = 4$  a 8 determinaciones independientes, cada una realizada por triplicado). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$  respecto al control.

### 4.3 Citotoxicidad de ouabaína y veratridina empleando el ensayo del Alamar Blue

En el ensayo realizado con el marcador de actividad metabólica Alamar Blue se ha comprobado que las concentraciones utilizadas de O/V no producen citotoxicidad en las células de neuroblastoma, aun cuando este ensayo y el del MTT se realizaron de forma simultánea, empleando los mismos reactivos e idénticos cultivos celulares. En la figura 17 se muestran varios gráficos de barras con la fluorescencia leída a las 4 horas (A), 8 horas (B), 24 horas (C) y 48 horas (D) tras el tratamiento, expresado en porcentaje respecto al control.

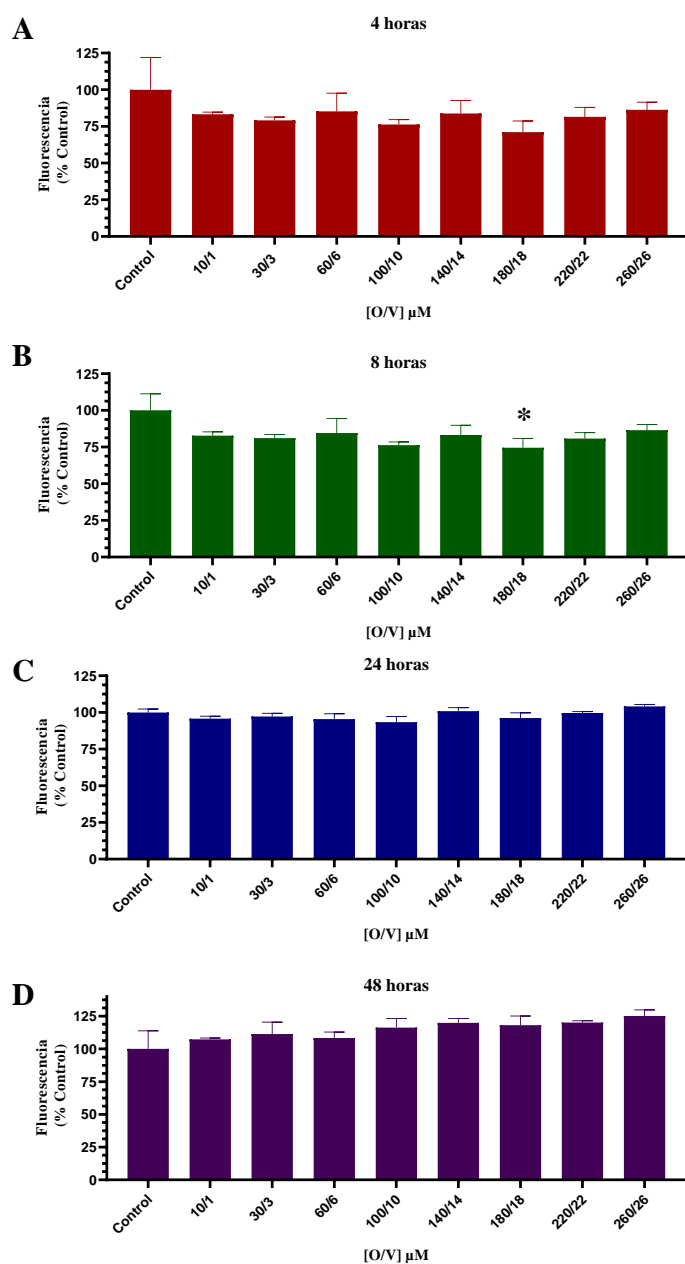


Figura 17. Gráficas de barras que muestran el efecto de distintas concentraciones de O/V empleando el ensayo de Alamar Blue. En ellas se detalla la fluorescencia medida a las 4 horas (A), 8 horas (B), 24 horas (C) y 48 horas (D) después del tratamiento de las células con cada condición. \* $p < 0,05$  respecto al control.

#### 4.4 Citotoxicidad de la ciguatoxina P-CTX 3C empleando el ensayo MTT

Existen diferentes métodos de detección de ciguatoxinas que se basan en el empleo de células de neuroblastoma para cuantificar el efecto citotóxico de las mismas (Viallon et al., 2020; Loeffler et al., 2021), por lo tanto, en este trabajo se compararon los ensayos de citotoxicidad con el objetivo de mejorar la capacidad de detección de ciguatoxinas empleando células de neuroblastoma. Para ello se empleó una combinación de 100  $\mu\text{M}$  en el caso de la ouabaína y 10  $\mu\text{M}$  de veratridina, para incrementar la sensibilidad de las células a estas toxinas.

El resultado, como se puede observar en la figura 18, es una reducción de la viabilidad de las células incluso a concentraciones de ciguatoxina muy bajas. Sin embargo, durante la realización del experimento, al igual que con el ensayo de O/V, las células se despegaban, por lo que los resultados no son concluyentes.

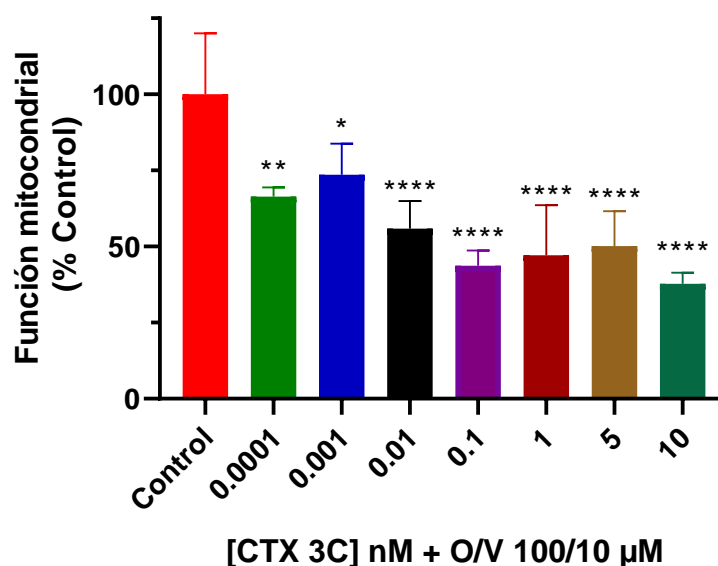


Figura 18. Gráfica de barras que muestra el efecto citotóxico de la combinación de distintas concentraciones de ciguatoxina P-CTX 3C en un medio con O/V a una concentración 100/10 en células de neuroblastoma humano empleando el ensayo del MTT. En la gráfica se expresa el porcentaje de viabilidad celular en cada condición con respecto al control que contiene ouabaína y veratridina. Todos los datos de la gráfica son significativos \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.5 Citotoxicidad de la ciguatoxina P-CTX 3C empleando el ensayo Alamar Blue

Tras realizar el mismo experimento con Alamar Blue, la fluorescencia medida a todas las concentraciones de P-CTX3C es muy similar, por lo que podemos concluir que esta ciguatoxina no produce citotoxicidad en esta línea celular. En la figura 19 se muestran los datos de

fluorescencia obtenidos tras incubar las células con diferentes concentraciones de P-CTX 3C y una combinación de ouabaína/veratridina de 100/10  $\mu\text{M}$  a las 24 y 48 horas tras el tratamiento.

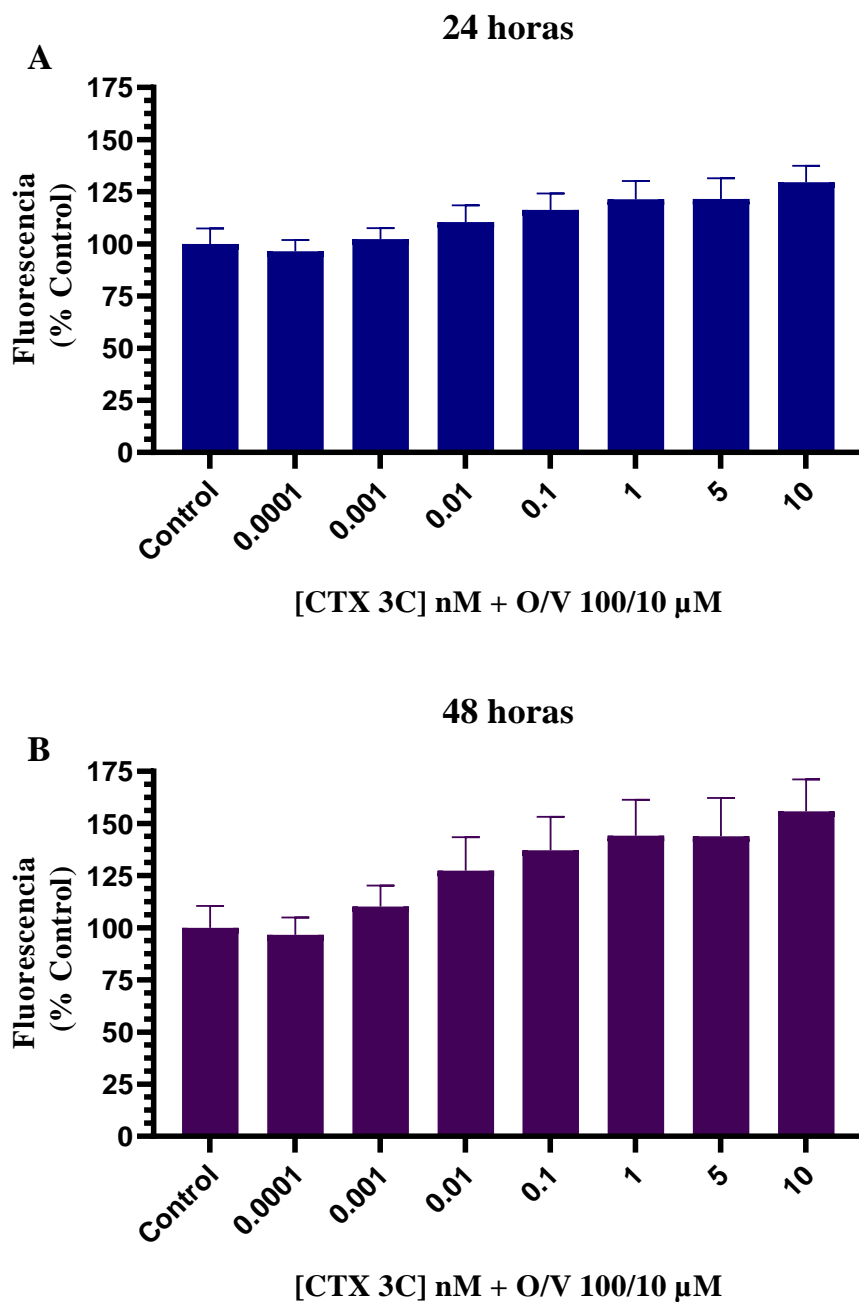


Figura 19. Gráficos de barras donde se evalúa la citotoxicidad de diferentes concentraciones de P-CTX3C en un medio con una concentración 100/10  $\mu\text{M}$  de ouabaína/veratridina empleando el ensayo del Alamar Blue. La fluorescencia se ha medido a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B), no observándose toxicidad a ninguna de las concentraciones de ciguatoxina empleadas.

## 5. Discusión

Para evaluar el efecto tóxico de compuestos químicos como las toxinas se pueden utilizar métodos *in vivo*, utilizando animales de experimentación y viendo los cambios que producen las toxinas en un grupo de animales, o métodos *in vitro*, que son los que más se están utilizando habitualmente debido a razones éticas (Bodero et al., 2018). Tanto es así que la Unión Europea ha prohibido en el 2015 el análisis y detección de ciertas biotoxinas marinas en ensayos con ratones (Reglamento (UE) No 15/2011). Por estas razones, todos los ensayos realizados en este estudio han sido *in vitro*, utilizando para ello distintas líneas celulares.

Se han utilizado dos ensayos de citotoxicidad, el MTT y el Alamar Blue, con el objetivo de establecer la concentración tóxica de ouabaína y la veratridina en células de neuroblastoma humano para poder evaluar después la toxicidad de la ciguatoxina P-CTX3C. Se han elegido estos ensayos de citotoxicidad debido a que son los más utilizados por la comunidad científica y algunos autores (Hamid et al., 2004; Rampersad, 2012) indican que ambos son ensayos citotóxicos de alta sensibilidad. En contra de lo esperado, ambos ensayos han dado resultados contradictorios, observando en el ensayo MTT que incluso la concentración más baja de O/V disminuye la viabilidad de las células un 25 %, mientras que en el ensayo de Alamar Blue no se observó ningún efecto citotóxico de esta combinación de compuestos. Cabe resaltar que estos dos ensayos de citotoxicidad se realizaron siempre de forma paralela, empleando los mismos cultivos celulares e idénticos compuestos químicos, variando únicamente el reactivo empleado para la detección de la actividad mitocondrial. Los resultados de citotoxicidad de las ciguatoxinas obtenidos con el Alamar Blue contrastan con los datos de toxicidad publicados en varios estudios similares empleando el ensayo del MTT (Coccini et al., 2017; Castro et al., 2020; Viallon et al., 2020), aunque estas diferencias podrían atribuirse a que los estudios publicados se han realizado empleando una línea celular distinta (neuroblastoma de ratón, N2a) a la utilizada en este estudio (neuroblastoma humano). Los datos presentados en este TFG ponen de manifiesto la necesidad de validar y contrastar diferentes métodos *in vitro* antes de establecer uno de ellos como más sensible para detectar la toxicidad de agentes ambientales.

Por lo tanto, los resultados obtenidos denotan la necesidad de seguir perfeccionando un método ideal para evaluar la citotoxicidad de la O/V, método de uso habitual para cuantificar ciguatoxinas con neuroblastoma humano y así conseguir establecer un método estándar para la detección y cuantificación de estos compuestos que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje (FAO, 2011; FAO, 2018). Otros métodos que se podrían evaluar incluyen la medida de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) o la producción de compuesto ATP en el sobrenadante de las células (Sumantran, 2011), añadir al cultivo un marcador fluorescente de potencial de membrana celular como el oxonol (Mustroph, 2021) o cultivar las células en una placa tratada previamente

con Poli-D-lisina, que adhiere las células al fondo del pocillo evitando que se despeguen (Kim et al., 2011). Este objetivo debe ser tenido en cuenta debido a la aparición de floraciones algales nocivas y de nuevas toxinas en las costas europeas (Botana, 2016; Estevez et al., 2019).

Otra de las toxinas marinas analizadas en este Trabajo Fin de Grado ha sido la tetrodotoxina, puesto que, al igual que las ciguatoxinas, pertenece a un grupo de toxinas en expansión en nuestras costas (Knutsen et al., 2017; Gerssen and Gago-Martinez, 2019). En cuanto al anticuerpo experimental anti-TTX utilizado en este estudio, se ha confirmado mediante inmunocitoquímica que este compuesto se une a la tetrodotoxina que, a su vez, está unida a los canales de sodio dependientes de voltaje. Por otro lado, cuando se utiliza el anticuerpo en células vivas, este se une al lugar de acción de la tetrodotoxina bloqueando parcialmente los canales de sodio dependientes de voltaje e impidiendo que la tetrodotoxina se una a las células realizando su efecto inhibitor, lo que indica la necesidad de estudios adicionales, incluso de cara a disminuir los efectos letales de la tetrodotoxina. Por todo ello, podemos concluir que el anticuerpo experimental funciona correctamente y se podría utilizar para realizar ensayos ELISA (del inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”) y así diagnosticar de forma rápida y práctica una intoxicación por tetrodotoxina en personas y animales.

En conjunto, los datos obtenidos en este Trabajo Fin de Grado indican que las técnicas *in vitro* presentan un gran potencial para el desarrollo de métodos útiles para la detección de contaminantes ambientales que actúen sobre canales iónicos, si bien, necesitan ser reevaluadas y comparadas entre sí para poder ser estandarizadas como método de cuantificación de compuestos químicos.

## 6. Conclusiones

Tras revisar los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Grado se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- El anticuerpo anti-TTX disminuye la intensidad de las corrientes de sodio dependientes de voltaje en las células HEK Nav1.6, lo que sugiere que se une al canal de sodio dependiente de voltaje.
- El anticuerpo anti-TTX bloquea el efecto de la tetrodotoxina sobre los canales de sodio dependientes de voltaje.
- La inmunocitoquímica empleando el anticuerpo anti-TTX permite visualizar la unión de la toxina a los canales de sodio en la membrana celular.
- No se hallaron cambios en la morfología celular de las células HEK Nav1.6 tras ser tratadas con TTX 1  $\mu$ M durante 24 horas.
- La diferencia de citotoxicidad producidas por la combinación de ouabaína y veratridina empleando el ensayo del MTT y el ensayo del Alamar Blue, indica la necesidad de optimizar ambos ensayos para emplearlos como métodos estándar de cuantificación y detección de ciguatoxinas.

## 7. Bibliografía

- Alhatali B, Al Lawatia S, Khamis F, Kantur S, Al-Abri S, Kapil V, Thomas J, Johnson R, Hamelin EI, Coleman RM (2021) A cluster of tetrodotoxin poisoning in Oman. *Clinical toxicology*:1-5.
- Annechino LA, Schultz SR (2018) Progress in automating patch clamp cellular physiology. *Brain and neuroscience advances* 2:2398212818776561.
- Armstrong P, Murray P, Nesdale A, Peckler B (2016) Ciguatera fish poisoning. *NZ Med J* 129:111-114.
- Bane V, Lehane M, Dikshit M, O'Riordan A, Furey A (2014) Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins (Basel)* 6:693-755.
- Biessy L, Boundy MJ, Smith KF, Harwood DT, Hawes I, Wood SA (2019) Tetrodotoxin in marine bivalves and edible gastropods: A mini-review. *Chemosphere* 236:124404.
- Bodero M, Bovee TFH, Wang S, Hoogenboom R, Klijnstra MD, Portier L, Hendriksen PJM, Gerssen A (2018) Screening for the presence of lipophilic marine biotoxins in shellfish samples using the neuro-2a bioassay. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 35:351-365.
- Boente-Juncal A, Otero P, Rodríguez I, Camiña M, Rodríguez-Vieytes M, Vale C, Botana LM (2020) Oral Chronic Toxicity of the Safe Tetrodotoxin Dose Proposed by the European Food Safety Authority and Its Additive Effect with Saxitoxin. *Toxins* 12:312.
- Botana LM (2016) Toxicological Perspective on Climate Change: Aquatic Toxins. *Chem Res Toxicol* 29:619-625.
- Botana LM, Alfonso A (2015) *Phycotoxins: chemistry and biochemistry*: John Wiley & Sons.
- Burbidge SA, Dale TJ, Powell AJ, Whitaker WR, Xie XM, Romanos MA, Clare JJ (2002) Molecular cloning, distribution and functional analysis of the NAV1. 6. Voltage-gated sodium channel from human brain. *Molecular Brain Research* 103:80-90.
- Cassia R, Nocioni M, Correa-Aragunde N, Lamattina L (2018) Climate change and the impact of greenhouse gasses: CO<sub>2</sub> and NO, friends and foes of plant oxidative stress. *Frontiers in plant science* 9:273.
- Castro D, Manger R, Vilariño O, Gago-Martínez A (2020) Evaluation of Matrix Issues in the Applicability of the Neuro-2a Cell Based Assay on the Detection of CTX in Fish Samples. *Toxins* 12:308.
- Chinain M, Gatti C, Roué M, Darius H (2019) Ciguatera poisoning in French Polynesia: Insights into the novel trends of an ancient disease. *New microbes and new infections* 31:100565.
- Chinain M, Gatti CM, Roué M, Darius HT, Subba Rao D (2020) Ciguatera-causing dinoflagellates in the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*: Distribution, ecophysiology and toxicology. *Dinoflagellates: Morphology, Life History and Ecological Significance*; Subba Rao, DV, Ed:405-457.
- Chinain M, Gatti CMI, Darius HT, Quod JP, Tester PA (2021) Ciguatera poisonings: A global review of occurrences and trends. *Harmful Algae* 102:101873.
- Coccini T, Caloni F, De Simone U (2017) Human neuronal cell based assay: A new in vitro model for toxicity evaluation of ciguatoxin. *Environmental toxicology and pharmacology* 52:200-213.
- EFSA (2010) Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish—Emerging toxins: Ciguatoxin group. *EFSA journal* 8:1627.

- Estevez P, Castro D, Pequeno-Valtierra A, Giraldez J, Gago-Martinez A (2019) Emerging Marine Biotoxins in Seafood from European Coasts: Incidence and Analytical Challenges. *Foods* 8.
- FAO USFaDA (2011) Guidance for the Industry: Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance.
- FAO W (2018) Report of the expert meeting on ciguatera poisoning: Rome, 19-23 November 2018: Food & Agriculture Org.
- Farabegoli F, Blanco L, Rodríguez LP, Vieites JM, Cabado AG (2018) Phycotoxins in marine shellfish: Origin, occurrence and effects on humans. *Marine drugs* 16:188.
- Friedman MA et al. (2017) An Updated Review of Ciguatera Fish Poisoning: Clinical, Epidemiological, Environmental, and Public Health Management. *Mar Drugs* 15.
- Gatti CMI, Lonati D, Darius HT, Zancan A, Roué M, Schicchi A, Locatelli CA, Chinain M (2018) *Tectus niloticus* (Tegulidae, Gastropod) as a Novel Vector of Ciguatera Poisoning: Clinical Characterization and Follow-Up of a Mass Poisoning Event in Nuku Hiva Island (French Polynesia). *Toxins* 10.
- Gerssen A, Gago-Martinez A (2019) Emerging Marine Biotoxins. *Toxins (Basel)* 11.
- Gerssen A, Pol-Hofstad IE, Poelman M, Mulder PP, van den Top HJ, de Boer J (2010) Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins (Basel)* 2:878-904.
- Gerssen A, Bovee THF, Klijnstra MD, Poelman M, Portier L, Hoogenboom RLAP (2018) First Report on the Occurrence of Tetrodotoxins in Bivalve Mollusks in The Netherlands. *Toxins* 10:450.
- Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P (2004) Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro* 18:703-710.
- Hong B, He J, Le Q, Bai K, Chen Y, Huang W (2019) Combination Formulation of Tetrodotoxin and Lidocaine as a Potential Therapy for Severe Arrhythmias. *Marine drugs* 17:685.
- Irwin AJ, Finkel ZV, Müller-Karger FE, Troccoli Ghinaglia L (2015) Phytoplankton adapt to changing ocean environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:5762-5766.
- Itoi S, Sato T, Takei M, Yamada R, Ogata R, Oyama H, Teranishi S, Kishiki A, Wada T, Noguchi K (2020) The planoceric flatworm is a main supplier of toxin to tetrodotoxin-bearing fish juveniles. *Chemosphere* 249:126217.
- Katikou P (2019) Public health risks associated with tetrodotoxin and its analogues in European waters: Recent advances after the EFSA scientific opinion. *Toxins* 11:240.
- Kim YH, Baek NS, Han YH, Chung M-A, Jung S-D (2011) Enhancement of neuronal cell adhesion by covalent binding of poly-D-lysine. *Journal of neuroscience methods* 202:38-44.
- Kirk-Davidoff D (2018) The greenhouse effect, aerosols, and climate change. In: *Green chemistry*, pp 211-234: Elsevier.
- Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B, Dinovi M, Edler L, EFSA (2017) Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA Journal* 15:e04752.
- Kotipoyina HR, Kong EL, Warrington SJ (2020) Tetrodotoxin Toxicity. *StatPearls [Internet]*.

- Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD (2018) Analysis of Cell Viability by the alamarBlue Assay. Cold Spring Harb Protoc 2018.
- Kweku DW, Bismark O, Maxwell A, Desmond KA, Danso KB, Oti-Mensah EA, Quachie AT, Adormaa BB (2017) Greenhouse effect: greenhouse gases and their impact on global warming. Journal of Scientific research and reports:1-9.
- Lago J, Rodriguez LP, Blanco L, Vieites JM, Cabado AG (2015) Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses. Mar Drugs 13:6384-6406.
- Landrigan PJ et al. (2020) Human Health and Ocean Pollution. Ann Glob Health 86:151.
- Leao JM, Lozano-Leon A, Giraldez J, Vilarino O, Gago-Martinez A (2018) Preliminary Results on the Evaluation of the Occurrence of Tetrodotoxin Associated to Marine *Vibrio spp.* in Bivalves from the Galician Rias (Northwest of Spain). Mar Drugs 16.
- Liu S-H, Tseng C-Y, Lin C-C (2015) Is neostigmine effective in severe pufferfish-associated tetrodotoxin poisoning? Clinical toxicology 53:13-21.
- Loeffler CR, Bodi D, Tartaglione L, Dell'Aversano C, Preiss-Weigert A (2021) Improving in vitro ciguatoxin and brevetoxin detection: selecting neuroblastoma (Neuro-2a) cells with lower sensitivity to ouabain and veratridine (OV-LS). Harmful Algae 103:101994.
- Madejska A, Michalski M, Osek J (2019) Marine tetrodotoxin as a risk for human health. Journal of veterinary research 63:579.
- Makarova M, Rycek L, Hajicek J, Baidilov D, Hudlicky T (2019) Tetrodotoxin: history, biology, and synthesis. Angewandte Chemie International Edition 58:18338-18387.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods 65:55-63.
- Mullins ME, Hoffman RS (2017) Is mannitol the treatment of choice for patients with ciguatera fish poisoning? Clinical Toxicology 55:947-955.
- Mustroph H (2021) Oxonol dyes. Physical Sciences Reviews.
- National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 11174599, Tetrodotoxin. Retrieved July 1, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetrodotoxin>.
- National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 6442245, Ciguatoxin 3C. Retrieved July 1, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciguatoxin-3C>.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. European journal of biochemistry 267:5421-5426.
- Parsons ML, Aligizaki K, Bottein M-YD, Fraga S, Morton SL, Penna A, Rhodes L (2012) Gambierdiscus and Ostreopsis: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. Harmful Algae 14:107-129.
- Qiao H, Zheng F, Jiang H, Dong K (2019) The greenhouse effect of the agriculture-economic growth-renewable energy nexus: evidence from G20 countries. Science of the Total Environment 671:722-731.
- Rampersad SN (2012) Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors 12:12347-12360.

- Rodriguez-Corrales JA, Josan JS (2017) Resazurin Live Cell Assay: Setup and Fine-Tuning for Reliable Cytotoxicity Results. *Methods Mol Biol* 1647:207-219.
- Sanchez-Henao JA, Garcia-Alvarez N, Fernandez A, Saavedra P, Silva Sergent F, Padilla D, Acosta-Hernandez B, Martel Suarez M, Diogene J, Real F (2019) Predictive score and probability of CTX-like toxicity in fish samples from the official control of ciguatera in the Canary Islands. *Sci Total Environ* 673:576-584.
- Solino L, Costa PR (2020) Global impact of ciguatoxins and ciguatera fish poisoning on fish, fisheries and consumers. *Environ Res* 182:109111.
- Sumantran VN (2011) Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Cancer Cell Culture*:219-236.
- Tamele IJ, Silva M, Vasconcelos V (2019) The Incidence of Tetrodotoxin and Its Analogs in the Indian Ocean and the Red Sea. *Mar Drugs* 17.
- Tester PA, Litaker RW, Berdalet E (2020) Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful Algae* 91:101655.
- Trainer VL, Moore SK, Hallegraef G, Kudela RM, Clement A, Mardones JI, Cochlan WP (2020) Pelagic harmful algal blooms and climate change: Lessons from nature's experiments with extremes. *Harmful Algae* 91:101591.
- Traylor J, Singhal M (2020) Ciguatera toxicity. *StatPearls* [Internet].
- Viallon J, Chinain M, Darius HT (2020) Revisiting the Neuroblastoma Cell-Based Assay (CBA-N2a) for the Improved Detection of Marine Toxins Active on Voltage Gated Sodium Channels (VGSCs). *Toxins (Basel)* 12.
- Vilariño N, Louzao MC, Abal P, Cagide E, Carrera C, Vieytes MR, Botana LM (2018) Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins* 10:324.
- Vilariño NB, Luis (2018) Una visión de las toxinas marinas en el horizonte del año 2050 desde la perspectiva del cambio climático, bioseguridad y la seguridad alimentaria. *bie3: Boletín IEEE*:732-749.
- Yasumoto T (2001) The chemistry and biological function of natural marine toxins. *The Chemical Record* 1:228-242.