

Citotoxicidad de diferentes especies del género *Gambierdiscus* aisladas en las Islas Canarias

Araceli Rossignoli y Pilar Riobó

Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo. Subida Radio Faro,
50, 36390 Vigo, Pontevedra

Informe nº 4

Proyecto: “Tropicalización y ciguatera en Canarias”

Actividad: “Cuantificación de toxinas en los cultivos de *Gambierdiscus*
aislados de las muestras de Canarias” (A4)



INTRODUCCIÓN

El género de dinoflagelados *Gambierdiscus* incluye especies responsables del síndrome de la ciguatera, un tipo de envenenamiento alimentario endémico de algunas zonas tropicales y subtropicales del Océano Atlántico occidental (incluyendo el mar Caribe), el Océano Índico y el Pacífico (Lewis, 2001). La ciguatera es una de las causas más importantes de intoxicación alimentaria no bacteriana en todo el mundo y se produce por el consumo de peces contaminados con ciguatoxinas (Yasumoto, 2005), las cuales además, pueden acumularse a través de la cadena trófica (Parsons, et al. 2012). En los últimos años la tropicalización producida por el cambio climático está provocando una ampliación de este endemismo hacia zonas templadas y ya han sido detectados en la última década más de 100 casos de ciguatera en las Islas Canarias (Rodríguez et al., 2017; Bravo et al., 2015) -donde ya es un problema emergente- y algún caso también en Madeira (Gouveia et al., 2010; Otero et al., 2010).

Las ciguatoxinas (CTXs) son metabolitos secundarios producidos por diferentes especies de dinoflagelados epi-bentónicos del género *Gambierdiscus* (Adachi and Fukuy, 1979; Yasumoto et al., 1977) y unas de las toxinas marinas conocidas más potentes. Se han identificado numerosos congéneres de estas toxinas de acuerdo a diferencias en su estructura molecular. Además se han descrito CTXs de diferentes orígenes geográficos (Pacífico, Caribe e Índico).

La gran variedad de análogos que integran el grupo de las CTXs, la complejidad de estas moléculas, su toxicidad elevada y la falta de patrones son los principales motivos por los cuales todavía no se dispone de métodos de detección y/o cuantificación con un adecuado nivel de sensibilidad y precisión, y que todavía no exista una legislación que regule estas toxinas. Los métodos que actualmente se emplean abordan los análisis desde diversos enfoques, desde el bioensayo de ratón (MBA), pasando por los ensayos in vitro basados en células (CBA), el ensayo competitivo de unión a receptor (RBA), el análisis inmunológico o el físico-químico (HPLC).

Conocer el potencial tóxico de las distintas especies de *Gambierdiscus* es indispensable para poder valorar el riesgo que supone su presencia en una región concreta.

La determinación de la toxicidad en las muestras de *Gambierdiscus* analizadas en este proyecto se realizó mediante 2 tipos de ensayos biológicos: bioensayo de ratón (MBA) y ensayo de neuroblastoma (neuro2A). Por su parte, la identificación de las ciguatoxinas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LCHRMS).

CITOTOXICIDAD DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE *GAMBIERDISCUS*

1. Metodología

Como parte del proyecto “Tropicalización y ciguatera en Canarias”, en el presente estudio se cultivaron cepas de cinco especies del género *Gambierdiscus* obtenidas en las Islas Canarias (*G.australes*, *G.caribaeus*, *G.carolinianus*, *G.excentricus* y *G.silvae*) con el fin de estimar sus respectivas toxicidades. Los cultivos se realizaron en matraces de diferentes volúmenes empleando un medio de cultivo K sin silicatos preparado a partir de agua de mar de la Ría de Vigo (salinidad 35, Tª 25°C, fotoperíodo 12:12 L:D) hasta alcanzar densidades entre medio millón y dos millones de células.

Para extraer las toxinas y para la posterior purificación de los extractos nos basamos en el protocolo descrito por *Caillaud et al., 2010*. En primer lugar se realizaron 2 extracciones con MeOH 100% y a continuación 2 extracciones con MeOH 50%. Los 4 extractos se combinaron en uno solo.

Este extracto Metanol acuoso se analizó directamente mediante Neuro2A en algunas muestras de *Gambierdiscus* (ver resultados tabla 1) observando la presencia en la mayoría de las muestras de maitotoxinas (MTXs), otras toxinas potentes presentes en estas microalgas, que no se relacionan con el síndrome de la Ciguatera pues debido a su naturaleza hidrosoluble no se acumulan y son rápidamente expulsadas por los peces pero que interfieren en los análisis y por lo tanto debemos retirar de nuestras muestras. Para ello, evaporamos el extracto MeOH acuoso, pesamos el residuo, lo disolvemos en diclorometano y realizamos dos particiones líquido-líquido con MeOH 60%. Como resultado, la fracción diclorometano arrastrará las CTXs y la fracción metanólica las MTXs. La toxicidad de ambas fracciones se evaluó mediante MBA.

Para poder analizar estas muestras mediante LCHRMS es preciso purificarlas, para ello se emplearon 2 sistemas de extracción en fase sólida: columnas Florisil de 500 mg y columnas Oasis MAX 3cc.

2. Resultados

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos mediante el ensayo de CBA-Neuro2A de los extractos crudos previos a la partición líquido:líquido para separación de CTXs y MTXs.

Tabla 1. Concentración de ciguatoxinas obtenida en los extractos crudos (previo a la partición CTXs:MTXs) de 10 cepas de *Gambierdiscus* mediante CBA-Neuro2A

Strain	Specie	Origin	Ciguatoxin Concentration
VGO1355	<i>G. silvae</i>	La Gomera	12.19 ± 0.62 fg/cell eq.
VGO1363	<i>G. silvae</i>	La Gomera	20.55 ± 2.67 fg/cell eq.
VGO1358	<i>G. silvae</i>	La Gomera	32.15 ± 0.34 fg/cell eq.
VGO1367	<i>G. caribaeus</i>	La Gomera	100% mortality without ouabain/veratridine
VGO1365	<i>G. caribaeus</i>	La Gomera	Negative (LOD <1.76 fg/cell eq)
VGO1198	<i>G. australes</i>	Tenerife	100% mortality without ouabain/veratridine
VGO1360	<i>G. australes</i>	La Gomera	100% mortality without ouabain/veratridine
VGO1356	<i>G. excentricus</i>	La Gomera	100% mortality without ouabain/veratridine
VGO1361	<i>G. excentricus</i>	La Gomera	100% mortality without ouabain/veratridine
VGO1197	<i>G. carolinianus</i>	Tenerife	100% mortality without ouabain/veratridine

Se observaron claras variaciones entre las toxicidades de las diferentes especies de *Gambierdiscus*. En el caso de las cepas que contenían MTXs, debido a su elevado potencial tóxico, no fue posible cuantificar la concentración de CTXs presentes ya que los cultivos morían rápidamente antes de poder finalizar el ensayo celular. Para estas cepas concluimos que era necesario realizar un paso previo de partición líquido:líquido con el fin de eliminar dichas interferencias en los análisis. La única especie que pudo ser cuantificada, sin interferencias, respecto a la concentración de CTXs presentes, fue *G. silvae*, en la que aparentemente no teníamos presencia de MTXs.

Tabla 2. Resultados cualitativos de 5 especies de *Gambierdiscus* obtenidas en las dos fracciones mediante análisis MBA y CBA-Neuro2A.

Strain	Specie	Origin	CTXs:MTXs partition	Qualitative data CBA-Neuro2A	Death time MBA		
VGO791	<i>G. excentricus</i>	Tenerife	MTXs	MTX +	49min	1h09min	1h14min
VGO791			CTXs	MTX +	3h45min	3h45min	3h53min
VGO1198	<i>G. australes</i>	, Tenerife	MTXs	MTX +	46min	1h	1h25min
VGO1198			CTXs	MTX +	badly punctured	1h04min	1h11min
VGO1237	<i>G. caribaeus</i>	El Hierro	MTXs		Alive 48h	Alive 48h	Alive 48h
VGO1237			CTXs		Alive 48h	Alive 48h	Alive 48h
VGO1167	<i>G. silvae</i>	Tenerife	MTXs	CTX +	Alive 48h	Alive 48h	Alive 48h
VGO1167			CTXs	CTX +	Alive 48h	Alive 48h	Alive 48h
VGO1180	<i>G. silvae</i>	Tenerife	MTXs	CTX +	4h53min	5h34min	5h34min
VGO1180			CTXs	CTX +	44min	1h32min	1h19min

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos una vez separadas las CTXs de las MTXs mediante el proceso de partición líquido:líquido. En este caso las muestras se analizaron empleando las técnicas de MBA y de CBA-Neuro2A. Los resultados de las dos metodologías pusieron de manifiesto que el reparto no fue eficaz puesto que ambas toxinas estaban presentes en las dos fracciones. Si bien la muerte de los ratones se produjo de manera más

rápida y violenta en las fracciones en las que las MTXs estaban presentes, esto no supone ningún riesgo para el consumo humano ya que, como se explicó anteriormente, aunque estas toxinas son más potentes en los ensayos biológicos, no se acumulan en los peces y son rápidamente eliminadas por los organismos. Nuevamente los resultados muestran que, entre las especies analizadas, *G. silvae* es la única que contiene únicamente CTXs, pero la encontramos en ambas fracciones.

En la última parte del estudio analizamos las muestras purificadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) con el objetivo de identificar las CTXs. Los resultados se muestran en la figura 1. La toxicidad observada en los ensayos biológicos de las tres cepas de *G. silvae* puede ser atribuida a un compuesto con una relación m/z $[M+Na]^+ = 1163.6$, la misma que presentan las ya conocidas C-CTX-1 y C-CTX2, ambas ciguatoxinas del Caribe (Figura 2.A). Algún otro pico presente en otros cromatogramas con una m/z $[M+Na]^+ = 1117.6$, podría corresponderse con los congéneres 52-epi-54deoxyCTX1B, 54-deoxyCTX1B o PCTX2. Sin embargo resulta necesario mejorar los protocolos de purificación de las muestras así como disponer de material de referencia certificado para poder confirmar la presencia de estas CTXs.

Figura.1. Cromatogramas obtenidos por LC-MS/MS. A: standard de CTX1B: B: *G. silvae* VGO 1355, C: *G. silvae* VGO 1358, D: *G. silvae* VGO 1363

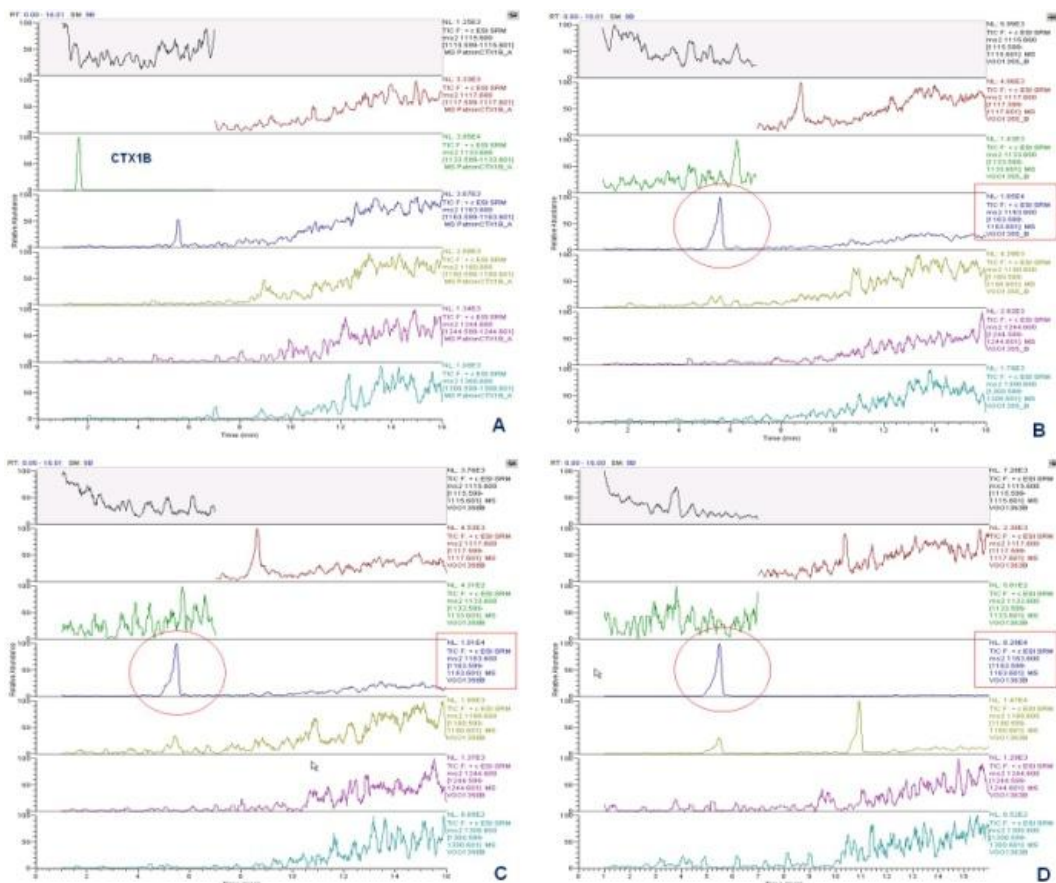


Figura.2A. Estructura de la ciguatoxina C-CTX. Masa exacta: $m/z=1140.6$; $[M+Na]^+$: $m/z=1163.6$

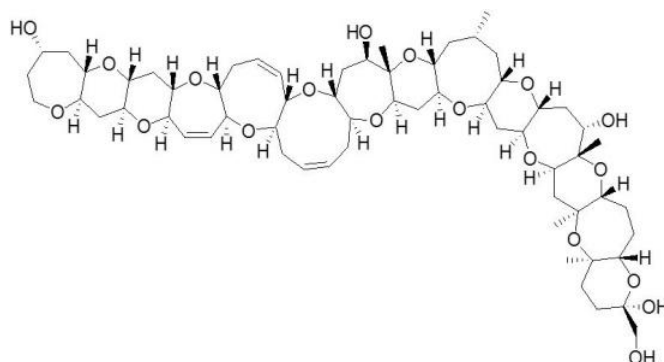
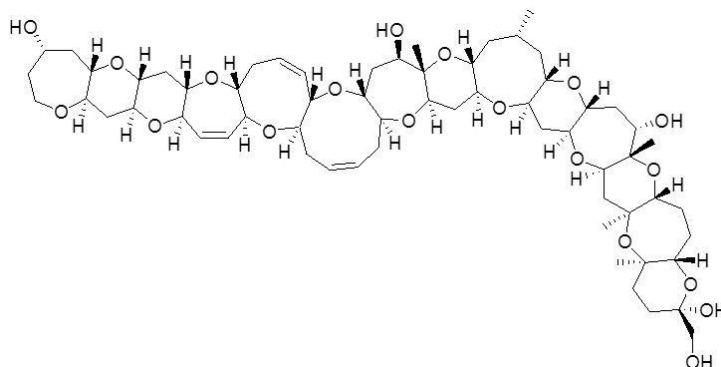


Figura. 2B. Estructura de la ciguatoxina C-CTX2 (Epimero de CTX1 en el carbono C-52). Masa exacta: $m/z=1140.6$; $[M+Na]^+$: $m/z=1163.6$



DISCUSIÓN

En estudios previos de nuestro laboratorio con cepas aisladas de Canarias encontramos especies dentro del género *Gambierdiscus* mucho más tóxicas que otras. Este hecho que de nuevo se constata en el presente estudio, también ha sido reportado por otros autores con cepas aisladas de la Polinesia Francesa (Chinain et al., 2010) y de las Islas Cook del Pacífico Sur (Rhodes et al., 2014). La presencia de maitotoxinas, toxinas químicamente distintas aunque farmacológicamente relacionadas con las CTXs, ya ha sido reportada en diferentes cepas de *G. toxicus*, *G. polynesiensis* (Murata et al., 1993; Holmes and Lewis, 1994), *G. pacificus* y *G. australes* (Rhodes et al. 2014). En este proyecto constatamos también su presencia en otras especies como *G. excentricus*, *G. caribaeus* y *G. carolinianus*. No obstante, a pesar de su actividad tóxica en los ensayos biológicos es poco probable que jueguen un papel significativo en causar algún tipo de enfermedad humana (Lewis, 2006).

Entre las diferentes especies de *Gambierdiscus* analizadas en este trabajo, *G.silvae* fue la única que presentó exclusivamente CTXs en sus células lo que la convierte en una herramienta de gran interés para trabajar en la optimización de la metodología de purificación de este grupo de toxinas, donde la separación de las CTXs y MTXs resulta básica para una correcta cuantificación de las mismas. Este hecho además señala a *G. silvae* como la especie con mayor potencial de riesgo de ciguatera en las Islas Canarias.

La variabilidad tóxica presente en el género *Gambierdiscus* implica que la identificación de las especies que puedan estar presentes resulte crucial para poder determinar el riesgo de ciguatera en cada zona geográfica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer la colaboración de Jorge Diogène del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (Generalitat de Cataluña) por su colaboración en la realización de los análisis de neuroblastoma.

También queremos agradecer su colaboración a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) a través del proyecto EUROCIGUA (GP / EFSA / AFSCO / 2015/03). Este trabajo se ha realizado en colaboración con la Unidad Asociada CSIC-IEO, el IRTA y el CIMA.

REFERENCIAS

Adachi, R., Fukuyo, Y. (1979). The thecal plate structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 45: 67–71.

Banner, A.H., Scheuer, P.J., Sasaji, S., Helfrich, P. and Alender C.B. (1960). Observations on ciguatera-type toxin in fish flesh. The Annals of the New York Academy of Science, 90:770-787.

Bravo, J., Cabrera, F., Ramírez, A. and Acosta, F. (2015). Ciguatera, an emerging human poisoning in Europe. Journal of Aquaculture and Marine Biology, 3(1):00053. DOI:10.15406/jam.2015.03.00053

Caillaud, A., De la Iglesia, P., Darius, H., Pauillac, S., Aligizaki, K., Fraga, S., Chinain, M. and Diogene, J. (2010). Update on methodologies available for ciguatoxin determination: Perspectives to confront the onset of ciguatera fish poisoning in Europe. Marine Drugs, 8: 1838-1907.

Caillaud, A., Eixarch, H., De la Iglesia P., Rodriguez, M., Dominguez, L., Andree, K.B. and Diogene, J. (2012). Towards the standardisation of the neuroblastoma (neuro-2a) cell-based assay for ciguatoxin-like toxicity detection in fish: application to fish caught in the Canary Islands. Food Additives & Contaminants: Part A, 29:6, 1000-1010.

- Chinain, M., Darius, H.T., Ung, A., Cruchet, P., Wang, Z.H., Ponton, D. et al. (2010). Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon*, 56(5): 739-789.
- Gouveia, N.N., Vale, P., Gouveia, N., Delgado, J. (2010). Primeiro Registo da Ocorrência de Episódios do Tipo Ciguatérico no Arquipélago da Madeira. In: Costa, P.R., Botelho, M.J., Rodrigues, S.M., Palma, A.S., Moita, M.T. (Eds.), *Algas tóxicas e biotoxinas nas águas da Península Ibérica 2009*. IPIMAR, Lisboa, Portugal, pp. 152–157.
- Holmes, M.J., Lewis, R.J. (1994). Purification and characterization of large and small maitotoxins from cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Natural Toxins*, 2: 64–72.
- Lewis, R.J. (2001). The changing face of ciguatera. *Toxicon*, 39: 97–106.
- Lewis, R.J. (2006). Ciguatera: Australian perspectives on a global problem. *Toxicon*, 48: 799–809.
- Murata, M., Naoki, H., Iwashita, T., Matsunaga, S., Sasaki, M., Yokayama, A., Yasumoto, T. (1993). Structure of maitotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 2060–2062.
- Otero, P., Pérez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodríguez, P., Gouveia, N.N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hirama, M., Ishihara, Y., Molgó, J., Botana, L.M. (2010). First toxin profile of Ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe). *Anal. Chem.* 82 (14): 6032–6039.
- Parsons, M., Aligizaki, K., Decharoui Bottein, M.-Y., Fraga, S., Morton, S., 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.
- Rhodes, L., Harwood, T., Smith, K., Argyle, P., Munday, R. (2014). Production of ciguatoxin and maitotoxin by strains of *Gambierdiscus australes*, *G. pacificus* and *G. polynesiensis* (Dinophyceae) isolated from Rarotonga, Cook Islands. *Harmful Algae*, 39: 185-275.
- Rodríguez, F., Fraga, S., Ramilo, I., Rial, P., Figueroa, R., Riobó, P. and Bravo, I. (2017). Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity ‘hotspot’ of *Gambierdiscus*: Implications for future trends of ciguatera in the area. *Harmful Algae*, 67: 131–143.
- Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R., Adachi, R. (1977). Finding a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 43: 1021–1026.
- Yasumoto, T., Raj, U. and Bagnis, R. (1984). Seafood poisoning in tropical regions. Laboratory of Food Hygiene, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Japan, 74 pp.
- Yasumoto, T. (2005). Chemistry, etiology, and food chain dynamics of marine toxins. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 81, 43-51.
- Yogi, K., Sakugawa, S., Oshiro, N., Ikehara, T., Sigiyama, K, and Yasumoto, T. (2014). Determination of toxins involved in Ciguatera fish poisoning in the Pacific by LC/MS. *Journal of AOAC International*, 97(2): 398-402.