

[industriaspesqueras.com](https://industriaspesqueras.com)

# Herramientas bioanalíticas para la detección de toxinas marinas

IP

17-22 minutos



Mònica Campàs y Jorge Diogène

Programa de Aguas Marinas y Continentales del IRTA

Síguenos en   

IP

Las ciguatoxinas son unas potentes neurotoxinas marinas producidas por microalgas tóxicas de los géneros *Gambierdiscus* y *Fukuyoa*. Estos dinoflagelados son bentónicos (es decir, viven en el fondo del mar) y, como tales, suelen crecer adheridos a macrófitos (plantas que viven en el agua). Los peces herbívoros, al alimentarse de estos macrófitos, ingieren al mismo tiempo las microalgas. De ese modo, las ciguatoxinas se transfieren por las redes tróficas, pudiéndose metabolizar y bioacumular en varios organismos marinos.

La ingestión de pescado contaminado con ciguatoxinas da lugar a un tipo de intoxicación llamada ciguatera. Hasta hace unos años, la ciguatera era una intoxicación típica de zonas tropicales y subtropicales. Sin embargo, la ciguatera se ha extendido geográficamente, posiblemente debido al comercio internacional de peces, al turismo que aumenta la exposición de consumidores y al cambio climático que puede favorecer la expansión de microalgas productoras de toxinas a latitudes más elevadas, entre otros motivos. Se han descrito muchos casos de intoxicación por ciguatera en países como Madagascar, La Reunión, Mauricio, Japón, Filipinas, Nueva Caledonia, las Islas Cook, la Polinesia Francesa, México y países del Caribe, como Cuba, Puerto Rico y Jamaica.

En España, el “Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la Intoxicación por Ciguatera en Canarias” ha registrado un total de 21 episodios desde 2018 hasta el momento. También se han detectado ciguatoxinas en pescado de otras áreas de la Macaronesia, como en las Azores y en Madeira (Portugal). De hecho, se han descrito casos de intoxicación de vigilantes del Parque Natural de Madeira y de marineros en las Islas Selvagens, que por la sintomatología se asociaron a ciguatera. Con respecto a los Gambierdiscus y Fukuyoa, se han observado en las Canarias y Madeira, y también en el Mediterráneo, concretamente en Grecia, Chipre y las Baleares, pero no hay confirmación de casos de ciguatera en el Mediterráneo.

## **Tetrodotoxinas o las toxinas del fugu**

La tetrodotoxina es una toxina marina que no es producida por microalgas tóxicas, sino por bacterias. Es muy conocida

por estar presente en algunas especies de peces globo. De hecho, el consumo de peces globos tóxicos está prohibido en la Unión Europea, pero es muy popular en algunos países como Japón, y requiere la experiencia de chefs altamente cualificados para diseccionar el pescado de manera que se consuman las partes no tóxicas (o, quizás, deberíamos decir las menos tóxicas).



IRTA

#### **Análisis de detección de ciguatoxinas en el IRTA.**

Los peces globo autóctonos del Mediterráneo pertenecen a especies con toxicidades muy bajas o inexistentes. Sin embargo, en 2005 se empezaron a observar peces globos de la especie *Lagocephalus sceleratus*, que son altamente tóxicos. Esta especie ha sido citada en Egipto, Israel, Turquía, Chipre... ¡y en 2014 en España! Se ve que entraron en el Mediterráneo a través del canal de Suez y ahora ya lo han cruzado. De hecho, se han descrito intoxicaciones por consumo de pez globo en el Mediterráneo, aunque son más habituales en Japón.

Y la historia no termina aquí. En 2008 se publicó por

primera vez la detección de tetrodotoxina en marisco europeo, concretamente en un molusco gasterópodo (caracol de mar) llamado *Charonia lampas lampas*. Esto ya fue un poco más sorprendente. Se sabía que la tetrodotoxina se encontraba en el pez globo. Incluso se había detectado en libélulas, salamandras y tritones. Pero en marisco era un poco inesperado. ¿Siempre ha estado ahí, pero nadie se había parado a buscar? ¿Los métodos analíticos son cada vez más potentes y podemos detectar concentraciones cada vez más bajas? ¿Es una consecuencia del cambio global? ¿O quizás es una suma o combinación de factores?

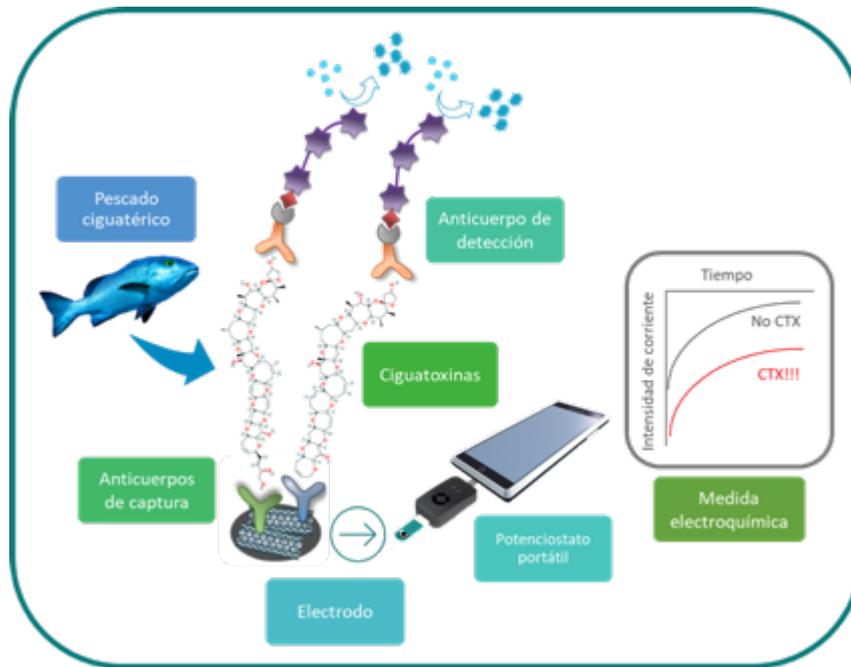
A todo esto, ¿qué dice la ley?

Las regulaciones europeas sobre seguridad alimentaria se establecen para proteger a los consumidores y proporcionar pautas claras a la industria alimentaria. La Comisión Europea necesita que se lleven a cabo investigaciones sobre el tema para poder decidir si hay riesgo y legislar de manera acorde. Respecto a las ciguatoxinas, la regulación dice que se deben realizar los tests oportunos para garantizar que los productos de la pesca que contengan este tipo de biotoxinas no se comercialicen. Respecto a la tetrodotoxina, la regulación mantiene que no se pueden comercializar productos de la pesca que deriven de la familia *Tetraodontidae*. Sin embargo, en Japón, sí se pueden comercializar y el nivel máximo permitido de tetrodotoxina en pescado es 2 mg/kg, un valor considerablemente elevado. Pero ello es debido a que, en Japón, a los consumidores que acuden a este tipo de restaurantes les gusta notar los síntomas del inicio de la

intoxicación, como el hormigueo en la lengua.

Por lo que se refiere a su presencia en marisco, tras haber recopilado información a través de las entidades responsables del control de las toxinas marinas de los distintos países europeos y haber evaluado el riesgo, no existe ninguna regulación. Y es que las cantidades de tetrodotoxina que se han encontrado en marisco europeo hasta ahora son realmente bajas. No obstante, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA) sí que ha recomendado no sobrepasar los  $44 \mu\text{g}/\text{kg}$  (valor mucho más bajo que el límite japonés en peces globo).

Pero la Comisión Europea no se para ahí. De la mano de EFSA y las correspondientes autoridades nacionales, financia la investigación en dichas toxinas marinas, que son emergentes en Europa. Un ejemplo es el proyecto EUROCIQUA, que se llevó a cabo entre los años 2016 y 2020, y que ahora tiene su continuidad gracias al proyecto EUROCIQUA II, cuya duración está prevista hasta 2025. Gracias al primero de estos dos proyectos se recopiló información de los casos de ciguatera en Europa, se determinó la presencia de microalgas productoras de ciguatoxinas, encontrándose especies de *Gambierdiscus* en las Baleares por primera vez, y se pusieron a punto y optimizaron metodologías para la detección de ciguatoxinas, basadas en técnicas de análisis instrumental o ensayos celulares. Ahora, los nuevos retos son evaluar cómo el cambio climático va a incidir en las poblaciones de las microalgas tóxicas y desarrollar sistemas para predecir la posible expansión de la ciguatera.



IRTA

**Ejemplo de inmunosensor para la detección de ciguatoxinas.**

Otro ejemplo es el proyecto RASCS, en el que se ha creado una red de intercambio de conocimiento formada por varias instituciones europeas expertas en contaminantes en productos del mar. Además, en el proyecto CIGUARISK, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España, se están desarrollando actividades orientadas a describir la dinámica espaciotemporal de los Gambierdiscus y Fukuyoa, y a elucidar los perfiles de ciguatoxinas en los distintos organismos de las redes tróficas, así como su bioacumulación y toxicidad.

## **Necesitamos nuevos dispositivos de análisis**

Existen técnicas de análisis instrumental muy robustas, sensibles y fiables que permiten detectar la presencia de toxinas en pescado y marisco y cuantificar los niveles que hay. Sin embargo, estas técnicas suelen requerir equipos sofisticados y caros. Por eso hay un interés creciente en desarrollar dispositivos de análisis de toxinas que continúen

siendo robustos, sensibles y fiables, pero que además sean rápidos, económicos y sencillos de usar. Por otro lado, también interesa desarrollar dispositivos de análisis de microalgas tóxicas porque los métodos rutinarios, basados en microscopía óptica, son largos y, en muchos casos, no pueden discriminar entre distintas especies de microalgas dentro de un género. Estos son y han sido los objetivos de los proyectos de investigación CIGUASENSING y CELLECTRA, también financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

## **¿Cómo detectamos las microalgas?**

En el proyecto CIGUASENSING, que se realizó entre los años 2018 y 2020, se desarrollaron sistemas de biología molecular, (es decir, basados en la detección del ADN), para la detección de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa*. Estos sistemas requieren la extracción de dicho ADN de las microalgas. Para ello se utilizó un homogeneizador portátil para romper las frústulas de las microalgas (“paredes”) en el campo, donde se tomaron las muestras de agua y macrófitos. A continuación, se analizó el ADN para ver si correspondía al de los géneros y especies de interés. La detección del ADN suele requerir un paso previo de amplificación, que normalmente se hace mediante la PCR (técnica que ahora ya todo el mundo conoce). No obstante, además de la PCR, en este proyecto se utilizaron técnicas de amplificación del ADN isotérmicas, que no requieren termocicladores ni gran instrumental de laboratorio. Este paso de amplificación del ADN combinado con un ensayo de hibridación tipo sándwich permitió la detección de los géneros *Gambierdiscus* y *Fukuyoa*, así como de las especies

G. australes y G. excentricus en varias muestras.

## ¿Cómo detectamos las toxinas?

Otras tareas del proyecto CIGUASENSING estaban orientadas hacia la detección de ciguatoxinas. En este caso, se optó por el uso de anticuerpos monoclonales e inmunoensayos tipo sándwich. Dos de los anticuerpos, dirigidos contra las ciguatoxinas de las series CTX1B y CTX3C (las más comunes), se inmovilizaron sobre partículas magnéticas para la captura de dichas toxinas. Un tercer anticuerpo reconocía las ciguatoxinas capturadas y, combinado con un marcaje enzimático, proporcionaba una señal directamente proporcional a la concentración de ciguatoxinas. Este dispositivo funcionó correctamente tanto en el análisis de pescado como de microalgas tóxicas, utilizándose también el homogeneizador portátil para extraer las ciguatoxinas de las microalgas. También se empezó la producción de aptámeros, que son oligonucleótidos capaces de reconocer los analitos (en nuestro caso, ciguatoxinas) para los cuales han sido seleccionados. Es decir, son secuencias de ADN, pero no reconocen las secuencias complementarias por hibridación, sino las moléculas de interés por afinidades estructurales.

## Cómo escoger la técnica de detección y el formato

Tanto para las microalgas tóxicas como para las toxinas, (es decir, tanto si se utiliza ADN como anticuerpos), las técnicas de detección utilizadas fueron varias: la colorimetría (se miden absorbancias) y la electroquímica (se miden corrientes eléctricas). Cada técnica de detección tiene ventajas e inconvenientes. Para las medidas colorimétricas

se suelen utilizar placas de microtitración y lectores de absorbancia, lo cual permite analizar muchas muestras e incluso disponer de calibrados y controles simultáneamente. Para las medidas electroquímicas, se requieren electrodos y potenciostatos. Para ambos tipos de medidas existe la posibilidad de disponer de equipos relativamente portátiles, pero sí que es cierto que los biosensores electroquímicos están más avanzados por lo que respecta a la miniaturización. En esta dirección, la inmovilización de anticuerpos monoclonales en un electrodo recubierto con nanotubos de carbono, conectado a un potenciostato portátil a su vez conectado a un teléfono inteligente, dio lugar a un dispositivo de análisis compacto y fácil de usar.

Y todavía más simples son los ensayos de flujo lateral, es decir, las tiras reactivas sobre papel (que también ahora conoce todo el mundo). En esta dirección, el proyecto CIGUASENSING ha desarrollado un test rápido para la detección simultánea de *G. australes* y *G. excentricus*.

## **Nuevos retos**

El proyecto Celectra empezó en 2021 y tiene una duración de 3 años. Este proyecto continúa con la detección de ciguatoxinas, pero también aborda la detección de tetrodotoxinas. Ya en los proyectos europeos ECsafeSEAFOOD y SeafoodTomorrow se desarrollaron biosensores para tetrodotoxinas. Para ello, se utilizó sólo un anticuerpo y un formato de ensayo competitivo. Los ensayos colorimétricos y biosensores electroquímicos sobre electrodos de oro permitieron analizar peces globo y cuantificar los contenidos de tetrodotoxinas. Respecto al marisco, fue necesario el uso de partículas magnéticas para

minimizar los efectos matriz y llegar a detectar los bajos niveles recomendados por la EFSA. En el marco del proyecto Celectra, ya se han producido aptámeros contra tetrodotoxinas y se ha desarrollado un ensayo colorimétrico basado en la combinación de anticuerpos y aptámeros. El próximo paso ahora es combinarlo con soportes de papel y electrodos para la producción de tiras reactivas y aptasensores electroquímicos, respectivamente.

En el proyecto Celectra, además de continuar con el uso de anticuerpos y aptámeros, se han empezado a utilizar receptores y células, con la idea de desarrollar biosensores basados en estos elementos de bioreconocimiento, menos habituales. Mientras que los ensayos y biosensores basados en anticuerpos y aptámeros se basan en un reconocimiento estructural de las toxinas, los basados en células se basan en un reconocimiento de la toxicidad. Y es que, a nivel celular, las ciguatoxinas y las tetrodotoxinas actúan sobre los canales de sodio dependientes de voltaje bloqueándolos, bien en posición abierta (las ciguatoxinas) o bien en posición cerrada (las tetrodotoxinas), afectando a la viabilidad celular. En el caso de los receptores, podríamos decir que el reconocimiento es “mixto”, puesto que las toxinas interaccionan con los canales de sodio dependientes de voltaje, pero en los ensayos no se miden toxicidades celulares. Los primeros experimentos en esta dirección han permitido inmovilizar células en electrodos y detectar su viabilidad. También se ha utilizado una técnica electrofisiológica de fijación en parche de membrana (patch-clamp) automatizada. En esta técnica se inmoviliza una única célula en un chip y se mide el potencial de la

membrana celular, que cambia cuando las toxinas actúan sobre los canales iónicos. Aunque el equipo utilizado hasta el momento es un poco sofisticado, también existe la versión portátil mucho más simplificada. Pero el desarrollo de biosensores celulares no es nada fácil... una célula es mucho más delicada que un anticuerpo o un aptámero y sus mecanismos son mucho más complejos. Aun así, obtener información toxicológica es de sumo interés. ¿Acaso no es la toxicidad de las muestras lo que realmente afecta al consumidor?

## **¿Y en el mar?**

La detección de toxinas disueltas en el mar (no en pescado o en el interior de las microalgas) supone otro abordaje tecnológico. El mar es inmenso... ¿cómo vamos a detectar algo que seguramente está a concentraciones muy bajas? La solución aquí fue la preconcentración. En el marco del proyecto CIGUASENSING y ahora del proyecto CELLECTRA, se sintetizaron ciclodextrinas, que son moléculas compuestas de azúcares con una estructura de cono truncado capaz de capturar analitos de interés, y se procedió a su inmersión tanto en cultivos de microalgas en el laboratorio como en puertos y otras zonas de la costa. Estos experimentos demostraron la capacidad de las ciclodextrinas para capturar toxinas marinas (ácido okadaico, dinofisistoxinas, pectenotoxinas, palitoxina y ovatoxinas). Y esta capacidad de captura también se utilizó con otro propósito: purificar muestras de pescado cuyo efecto matriz afectaba al funcionamiento del ensayo celular. Las ciclodextrinas son otro claro ejemplo de avance tecnológico para resolver determinados retos en la

detección de toxinas marinas.

## **Análisis para aprender y entender**

Aparte de los avances tecnológicos, todos estos proyectos han permitido realizar avances científicos, puesto que ambas cosas van de la mano. La validación de los dispositivos ha abordado el análisis de muestras y ha proporcionado información de gran utilidad e impacto como, por ejemplo:

Se han analizado peces globo del Mediterráneo y se ha podido describir la llegada de un pez globo tóxico a Dénia (Alicante).

Se ha podido evidenciar que las tetrodotoxinas fueron las responsables en un caso de intoxicación de un pescador y sus amigos que comieron pez globo en Nueva Caledonia.

Se han detectado ciguatoxinas en pescados de distintas especies y orígenes geográficos, tanto del Océano Índico (La Reunión y Mauricio) como del Océano Pacífico (Japón y Fiji).

Se han obtenido los perfiles de ciguatoxinas (CTX1B y CTX3C) de cultivos de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* de las Canarias y de las Baleares.

Se ha detectado la presencia de *G. excentricus* en las Baleares por primera vez, así como de ciguatoxinas directamente en agua de mar (sin aislar y cultivar cepas).

## **¿Y ahora, qué?**

Aparte de los problemas todavía no solucionados, nos esperan nuevos retos que nos toca afrontar, tanto científicos como tecnológicos. ¿Debemos analizar más muestras de

pescado y marisco del Mediterráneo en busca de ciguatoxinas y tetrodotoxinas para evaluar el riesgo en Europa y garantizar la seguridad alimentaria? ¿Necesitamos dispositivos de análisis más sensibles, más específicos, más rápidos, más robustos, más portátiles, etc.? ¿Podemos desarrollar dispositivos capaces de analizar muchas muestras e incluso detectar varios tipos de toxinas simultáneamente? ¿Serán los nuevos dispositivos aplicables a cualquier tipo de matriz (agua, pescado, marisco, etc.)? ¿Y podrán aplicarse a muestras de fluidos humanos para así contribuir a mejorar los diagnósticos clínicos? ¿Queremos utilizar los dispositivos para hacer un cribado o queremos que nos proporcionen cuantificaciones precisas de los contenidos de toxinas? ¿Los vamos a utilizar como métodos alternativos o combinados con otras técnicas de confirmación? ¿Quién los debería utilizar? ¿Laboratorios especializados? ¿Los ciudadanos? ¿Cómo se va a proceder para su armonización? ¿Tenemos todo lo necesario para llevarlos al mercado? ¿Nos los podremos permitir? Solo una aproximación multidisciplinar, colaborativa y desde puntos de vista de varios actores nos ayudará a dar respuesta a todas estas preguntas abiertas. Y a la vez, nos planteará otras nuevas. Tendremos nuevos retos a afrontar y es que la investigación y la adquisición de conocimientos, nunca termina.