



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: ES 2 047 403

② Número de solicitud: 9100583

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: G01N 33/58

G01N 33/12

C12N 5/06

⑫

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **07.03.91**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.94**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.02.94**

⑦ Solicitante/es: **Universidad de Oviedo**  
**C/ San Francisco, 3**  
**33003 Oviedo, ES**

⑦ Inventor/es:  
**Fernández Sánchez, María Teresa y**  
**Novelli Ciotti, Antonello**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Análisis de biotoxinas contaminantes de mejillones, almejas y ostras cultivados, utilizando cultivos primarios de neuronas de cerebelo de rata.**

⑤ Resumen:

Análisis de biotoxinas contaminantes de mejillones, almejas y ostras cultivados, utilizando cultivos primarios de neuronas de cerebelo de rata, tratándose éstos por duplicado con muestras de extracto de molusco. La toxicidad de cada extracto se evalúa a partir de los efectos neurotóxicos originados por cuatro diluciones del mismo: 0, 10, 50 y 100, correspondientes a concentraciones de las biotoxinas, ácido okadaico y ácido domoico, superiores, iguales e inferiores a su límite legal en tejido de molusco. El análisis se realiza en presencia de  $2 \times 10^{-6}$  M de MK801 para visualizar selectivamente la neurotoxicidad del ácido okadaico y del domoico. La toxicidad de cada extracto se evalúa observando los cultivos al microscopio de contraste de fases tras 30' de tratamiento para el ácido domoico y 24h para el ácido okadaico. La toxicidad se puede comprobar mediante la tinción combinada de las neuronas con un colorante vital fluorescente y con bromuro de etidio.

## DESCRIPCION

Se presenta un nuevo ensayo biológico, para la detección sistemática de la presencia de biotoxinas contaminantes habituales en productos alimenticios marinos, tales como mejillones cultivados, almejas y ostras.

5

El método se recomienda especialmente para la evaluación sistemática del ácido okadáico, toxina contaminante de estos moluscos con extraordinaria frecuencia, y cuya detección resulta en la actualidad particularmente lenta e imprecisa. Sin embargo, el procedimiento permite la detección simultánea de otras neurotoxinas contaminante de estos alimentos, como por ejemplo el ácido domoico.

10

El ácido okadáico (Fig. 1) forma parte del grupo de toxinas conocidas como toxinas diarreicas de moluscos marinos (DSP). Se trata como hemos dicho, del contaminante más habitual de estos alimentos en Europa, y en particular en España, y su mecanismo de acción no se conoce. Además del ácido okadáico, han sido identificadas hasta el momento doce toxinas DSP, de estructura química similar, clasificadas de acuerdo con su esqueleto hidrocarbonado y sus grupos funcionales en tres grupos: ácido okadáico y dinofisitoxinas, pectenotoxinas, y yessotoxinas. Se trata en todos los casos de compuestos polieter de naturaleza lipofílica, capaces de difundir con facilidad a través de la membrana plasmática de las células.

15

El ácido domoico sin embargo, (Fig. 2) es un aminoácido tricarbónico, contaminante menos frecuente de los moluscos marinos, e identificado como agente causante de una intoxicación masiva ocurrida en Canadá en 1987 tras la ingestión de mejillones cultivados. Se trata de una biotoxina perteneciente al grupo de las denominadas toxinas amnésicas de los moluscos marinos (ASP). Por su mecanismo de acción sobre las neuronas, el ácido domoico pertenece al grupo de compuestos denominados aminoácidos excitadores, que incluye neurotransmisores habituales tales como el ácido glutámico o el ácido aspártico.

20

25

Dada la elevada frecuencia de los episodios de crecimiento algal anómalo, denominados en algunos casos "mareas rojas", y caracterizados por un incremento más o menos agudo en la concentración de éstas y otras biotoxinas acumuladas en los moluscos marinos, resulta imprescindible controlar sistemáticamente los niveles de biotoxinas contenidas en estos alimentos, antes de autorizar su salida al mercado.

30

En la actualidad, este control es llevado a cabo principalmente mediante un bioensayo estandarizado descrito en Japón por Yasumoto y col. (1), que incluye las siguientes etapas:

35

1. Extracción del hepatopáncreas de los moluscos con acetona.

2. Extracción con una disolución de dietileter y agua.

3. Evaporación del dietileter.

40

4. Resuspensión del residuo en una solución de Tween 60 al 1%

5. Inyección intraperitoneal de distintas diluciones de la solución obtenida, a una serie de ratones de 17-20 g de peso.

45

6. Observación de los efectos producidos por el extracto de moluscos en los animales, y del tiempo transcurrido desde la inyección del extracto hasta la muerte de los mismos.

El tiempo requerido es de unos pocos minutos en el caso de las toxinas amnésicas (ASP), y para otro grupo de contaminantes pertenecientes a las denominadas "toxinas paralíticas de moluscos" (PSP). Sin embargo, en el caso de contaminación por ácido okadáico los tiempos requeridos son del orden de 24 horas, y una *unidad de toxicidad* (MU) se define como la cantidad mínima de toxina requerida para matar al menos dos ratones de un grupo de tres, en un plazo de 24 h.

50

Si bien este tipo de ensayo no-específico ha resultado de gran utilidad para determinar si el producto es apto o no para el consumo humano, el procedimiento cuenta sin embargo con grandes inconvenientes:

55

– económicos: se trata de un procedimiento costoso.

– operativos: requiere tiempos de análisis largos.

60

– falta de sensibilidad: los resultados obtenidos llevan implícito un gran margen de error.

– falta de especificidad: no permite obtener, en la mayoría de los casos, información precisa acerca de la naturaleza del agente tóxico.

– éticos: requiere el empleo masivo de animales de laboratorio.

Existe por tanto la necesidad de encontrar métodos alternativos para llevar a cabo los controles sistemáticos de toxicidad, en particular para las toxinas DSP (diarréicas), cuyos efectos son más imprecisos y se manifiestan en el ratón a más largo plazo. En este sentido, el análisis de las toxinas DSP mediante técnicas fisicoquímicas presenta dificultades debido a que las toxinas se encuentran en concentraciones muy bajas en las muestras a analizar, carecen de un grupo cromóforo característico y son moléculas de una gran complejidad estructural, de un elevado peso molecular y químicamente inestables. Hasta el momento, el resultado más prometedor ha sido la puesta a punto de un método de análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) capaz de detectar derivados fluorescentes de estas biotoxinas (2). Este procedimiento, que ha sido adoptado en varios laboratorios para la determinación de ácido okadáico y de dinofisitoxina 1, requiere las siguientes etapas:

1. Extracción del hepatopáncreas del molusco con una mezcla de etanol/agua (8:2)
2. Extracción con eter de petroleo
3. Extracción con cloroformo
4. Reacción con 9-antrildiazometano (ADAM) para obtener los derivados fluorescentes correspondientes
5. Pretratamiento de los esteres fluorescentes en columna de gel de sílice Sep-pak
6. Inyección de la muestra en un cromatógrafo HPLC equipado con una columna Develosil ODS y un fluoromonitor.

A pesar de su potencialidad, el método adolece de ciertos problemas, que han impedido su generalización. Así, los cromatogramas que se obtienen son con frecuencia demasiado complejos debido a la existencia de impurezas en los reactivos y sobre todo, a la formación de numerosos derivados fluorescentes de compuestos presentes en la muestra analizada. Por esta razón, como en todos los métodos que utilizan una derivación química, no es posible obtener resultados reproducibles a menos que la muestra sea sometida previamente a procesos efectivos de purificación. Por otra parte, el protocolo descrito resulta apropiado sólo para las toxinas DSP que contienen un grupo carboxílico (ácido okadáico y dinofisitoxinas 1 y 3).

Más recientemente, ha sido descrito un método inmunológico para el análisis de ácido okadáico y dinofisitoxina-1, mediante anticuerpos monoclonales específicos para estas biotoxinas (3). Presenta la ventaja de ser un procedimiento sencillo y relativamente económico y da resultados excelentes con preparación puras. Sin embargo, no ha podido ser aplicado con éxito al análisis de muestras complejas, como es el caso de los extractos de tejido de molusco, debido al gran número de interferencias que se producen.

Tanto este inmunoensayo como el análisis por cromatografía HPLC, requieren patrones puros previamente caracterizados por técnicas espectroscópicas, y hasta el momento, de todas las toxinas DSP, únicamente el ácido okadáico está comercialmente disponible, y en cantidades limitadas.

Los cultivos primarios de neuronas de cerebelo que aquí se describen constituyen un sistema sencillo, sensible y fiable, fácilmente utilizable para el análisis sistemático de diversos tipos de compuestos tóxicos, y en particular, de algunas de las biotoxinas contaminantes de productos alimenticios marinos (tales como mejillones cultivados, almejas y ostras).

La preparación de los cultivos se lleva a cabo mediante el procedimiento previamente establecido (4,5) que se describe a continuación.

### Preparación de los cultivos

Se extraen por disección 8-13 cerebelos procedentes de crías de rata de 8 días de edad.

El tejido cerebelar correspondiente se desmenuza en primer lugar mediante cortes ortogonales con una cuchilla, y los pequeños fragmentos de tejido se resuspenden en 30 ml de una solución que contiene 124 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14.5 mM D-glucosa, 25 mM HEPES, 27 μM Phenol red, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 mg/ml de albumina de suero bovino, ajustada a pH 7.4 con NaOH (solución 1). Trás una centrifugación a baja velocidad, el tejido se resuspende en 30 ml de la misma solución 1, suplementada con 0.25 mg/ml de tripsina (solución 2) y se incuba durante 12-15 minutos a 37°C con

agitación. La tripsinización se detiene añadiendo 15 ml de la solución 1 conteniendo 26.6  $\mu\text{g/ml}$  de DNase I, 166.4  $\mu\text{g/ml}$  de inhibidor de tripsina y  $\text{MgSO}_4$  1.7 mM (solución 4). La suspensión se agita gentilmente durante 1 min y después se recentrifuga. El precipitado obtenido se resuspende en 2 ml de solución 1 que contiene 80  $\mu\text{g/ml}$  de DNasa, 0.52 mg/ml de inhibidor de tripsina y  $\text{MgSO}_4$  2.8 mM (solución 3).

5

A continuación, el tejido se disocia por aspiración-expulsión con una pipeta Pasteur (30-60 veces), y se añaden 5 ml de la solución 1 conteniendo 2.5 mM  $\text{MgSO}_4$  y 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  (solución 5). La suspensión se agita gentilmente y se deja reposar verticalmente durante 5-10 min para permitir la precipitación de posibles grumos de células no-disociadas. El sobrenadante correspondiente se centrifuga a baja velocidad durante 5 minutos y el precipitado obtenido se resuspende en el medio de cultivo Basal Eagle Medium, suplementado con 10% Suero Fetal Bovino inactivo por calor a  $56^\circ\text{C}$  durante 30 min, 100  $\mu\text{g/ml}$  gentamicina, 2 mM 1-glutamina y 25 mM KCl.

10

Los grumos de células no-disociadas se someten a un nuevo tratamiento de trituración con pipeta Pasteur, y las células disociadas así obtenidas se añaden a las anteriores, para ser distribuidas a una densidad de  $1-1.5 \times 10^6$  cel/ml en placas Nunc de 35 mm de diámetro, pretratadas con poly-L-lysina (2 ml de una solución de poly-L-lysina 5  $\mu\text{g/ml}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  durante 15 minutos, aspirada inmediatamente antes de colocar las células en las placas). Los cultivos se incuban a  $37^\circ\text{C}$ , en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y 100% de humedad.

15

Se obtiene aproximadamente 10 placas de cultivo por cerebelo, y la preparación se puede llevar a cabo en aproximadamente 4 horas.

20

Con el fin de inhibir la duplicación de las células no neuronales, tras 20-24 horas de incubación se adiciona al cultivo el inhibidor mitótico arabinósido de citosina, a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ .

25

Transcurridos 8-10 días de incubación, los cultivos están listos para su utilización, y las células pueden mantenerse en cultivo durante al menos 1 mes.

30

Las preparaciones obtenidas están formadas por una población prácticamente homogénea de neuronas granulares, morfológicamente identificables, que suponen más del 95% del total de células. El 5% restante está constituido esencialmente por neuronas gabaérgicas, y el número de astrocitos no supera el 3% de las células del cultivo (6).

35

*Evaluación de la toxicidad en los extractos de molusco.*

A) *Acido okadaico*

### Preparación de las muestras.

40

El tejido fresco de molusco se homogeniza y posteriormente se centrifuga a 30000 x g a  $0^\circ\text{C}$  durante 1 hora. El precipitado se extrae dos o tres veces con etanol, y tras evaporar el solvente, se resuspende en un volumen igual al inicial de agua destilada. El ácido okadaico se solubilizará parcialmente en el sobrenadante, pero dada su naturaleza lipofílica, también podría asociarse en cierta extensión con estructura membranosas en el precipitado. Por tanto, y con el fin de evitar falsos negativos, se recomienda llevar a cabo la evaluación de la toxicidad tanto en el sobrenadante como en la muestra obtenida tras la extracción del precipitado con etanol.

45

### Procedimiento experimental.

50

El tejido de molusco es particularmente rico en ácido glutámico y ácido aspártico, suponiendo la suma de ambos una concentración media de 7.23  $\mu\text{mol/g}$  tejido fresco. Si bien la ingestión de cantidades tan elevadas de estos compuestos no ejerce aparentemente ningún efecto tóxico entre los consumidores, su presencia en los extractos resulta absolutamente letal para las neuronas en cultivo. Esto es debido a que las células granulares de cerebelo son fundamentalmente glutamatérgicas, y por tanto sensibles al glutamato y al aspartato. Estos aminoácidos desempeñan su función fisiológica, activando receptores específicos asociados a canales iónicos (de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  principalmente), de manera que concentraciones excesivas de estos neurotransmisores pueden originar un flujo iónico excesivo que puede ocasionar en último término la muerte neuronal.

55

60

Así pues, la cantidad de ácido aspártico y ácido glutámico presente en los extractos interferirá con la determinación de la toxicidad por ácido okadaico y biotoxinas en general. Es necesario por tanto añadir a

los cultivos antagonistas específicos que eliminen o reduzcan drásticamente el efecto tóxico del glutamato y el aspartato. El compuesto elegido es el (+)-10,11-dihidro-5 -metil-5H-dibenzo-[a,d]-ciclohepten-5,10-imin-maleato o MK801, que a una concentración de  $2 \times 10^6$  M inhibe totalmente la acción neurotóxica del ácido aspártico y del ácido glutámico endógenos presentes en los extractos no tóxicos.

5

El procedimiento experimental concreto que se propone es el siguiente:

A las placas que contienen las neuronas en cultivo se añade

10

– 20  $\mu$ l de una disolución de MK801  $2 \times 10^4$  M

– 200  $\mu$ l de extracto de molusco diluido 0, 10, 50 y 100 veces respectivamente en agua destilada.

Cada muestra se analizará por duplicado, y cada grupo de muestra incluirá dos placas control que contengan 20  $\mu$ l de MK801  $2 \times 10^4$  M, pero que no contengan extracto.

15

### Analisis de los resultados esperados.

El ácido okadáico da lugar en los cultivos a efectos específicos, claramente distinguibles de los ocasionados por el ácido demoico tanto por el tipo de efecto como por el tiempo requerido para que se produzcan. En una primera fase desaparece la integridad de la red neuronal, y los cuerpos celulares se muestran hinchados, con un volumen muy superior al habitual (se debe comparar siempre con el control), produciéndose posteriormente la muerte celular completa. El límite inferior de toxicidad por ácido okadáico en las neuronas en cultivo, observable a las 24 horas, es de aproximadamente 1 nM. Por otra parte, el límite legal máximo para esta toxina está establecido en 0.4  $\mu$ g/g tejido fresco, equivalente a una concentración de 500 nM (la densidad del extracto de molusco es 1.03 g/ml, y el peso molecular del ácido okadáico es de 803). Suponiendo que se han analizado extractos de molusco que contenían una cantidad de ácido okadáico igual a la concentración máxima permitida (500 nM), los resultados esperados al cabo de 24 h de la adición de las distintas diluciones del extracto a los cultivos serán los siguientes:

30

Cultivo	Dilución del extracto		[OKA]en cultivo (nM)	Toxicidad esperada
	inicial	en cultivo*		
1	0	10	50	+
2	20	100	5	+
3	50	500	1	+/-
4	100	1000	0.5	-

35

40

45

\* teniendo en cuenta que la adición del extracto al cultivo supone diluir el mismo en un factor de 10.

50

Así pues, mediante la simple observación de los cultivos al microscopio de contraste de fases tras 24 h de tratamiento con las distintas diluciones de extracto de molusco, será posible determinar si la concentración de ácido okadáico es igual, inferior o superior a los límites legales actualmente vigentes (500 nM = 0.4  $\mu$ g/g tejido fresco). Tal como se indica en la tabla, si la concentración es igual a la máxima permitida, los cultivos 1 y 2 deberán mostrar toxicidad, el cultivo 3 presentará una toxicidad incipiente, mientras que el cultivo 4 deberá ser comparable al control (sin extracto). Si la concentración de ácido okadáico en el extracto es superior al límite legal, los cultivos 3 y 4 podrán mostrar toxicidad, y la cantidad de okadáico presente podrá ser determinada realizando diluciones superiores del extracto.

55

El método permite detectar concentraciones de ácido okadáico en los extractos 50 veces superiores a los límites legales actuales, aspecto que le confiere gran versatilidad en el caso de que sea necesario establecer en el futuro límites más estrictos para esta toxina.

60

Alternativamente a la simple observación de los cultivos al microscopio, se propone el siguiente método para la visualización de las neuronas tras 24 h de tratamiento:

*Tinción de los cultivos con colorantes fluorescentes.*

El método se basa en la capacidad de las células *vivas* de acumular en su interior el colorante vital diacetato de fluoresceína en su forma fluorescente, y en la propiedad del bromuro de etidio de intercalarse entre las bases de los ácidos nucleicos. El tratamiento paralelo de los cultivos con diacetato de fluoresceína y con bromuro de etidio, y la posterior visualización con un microscopio de fluorescencia permitirá determinar claramente el porcentaje de células vivas y muertas en cada placa.

**Procedimiento experimental:**

- 10 – Aspirar el medio del cultivo
- Añadir 1 ml de la solución denominada “Locke’s Buffer” conteniendo:
  - 15 – NaCl 154 mM
  - Ca<sub>2</sub>Cl 2.3 mM
  - KCl 5.6 mM
  - 20 – Hepes 8.4 mM
  - Mg<sub>2</sub>Cl 1 mM
  - Glucosa 5.6 mM
  - 25 – Aspirar y añadir nuevamente 1 ml de la misma solución.
  - Aspirar y añadir 1 ml de Locke’s Buffer que contiene 150 µg/ml de diacetato de fluoresceína
  - Incubar 4’ a 37°C
  - 30 – Añadir 5 µl de una solución de bromuro de etidio 10 mg/ml
  - Incubar 1’ a 37°C
  - Visualizar en un microscopio de fluorescencia
  - 35 Mediante este procedimiento, las neuronas vivas y los circuitos neuronales funcionales aparecen perfectamente teñidos con el colorante fluorescente, mientras que los núcleos de las células muertas se visualizan como puntos rojos.

B) *Acido domoico*

- 40 Si bien el ácido okadáico es el contaminante más frecuente que sería detectado por el presente método, no se puede descartar la posibilidad de que los moluscos estén contaminados con ácido domoico, el cual resulta asimismo extremadamente tóxico para las neuronas en cultivo.
- 45 La toxicidad debida al ácido domoico puede distinguirse claramente de la ocasionada por el okadáico, tanto por el tipo de efecto como por el tiempo requerido para que los efectos tóxicos se produzcan. Así, la adición al cultivo de extracto que contienen concentraciones de ácido domoico superiores a 15 µg/g tejido fresco (o lo que es lo mismo 50 µM) originan un acusado incremento en el volumen del cuerpo celular de las neuronas, acompañado de un ennegrecimiento del mismo, efectos que pueden ser observados al cabo de 15-30’ de la adición. La red neuronal por el contrario a tiempos tan cortos se mantiene intacta. La concentración máxima de ácido domoico admitida actualmente en el tejido de moluscos es de 20 µg/g tejido fresco (64 µM), que coincide aproximadamente con el límite de sensibilidad de nuestro método. Cabe señalar sin embargo, que los cultivos neuronales son extremadamente sensibles a incrementos posteriores en la concentración de domoico, de manera que la adición de extractos que contengan concentraciones de domoico ligeramente superiores al límite legal (Vg. 8-10 µM) dará lugar a una toxicidad inequívoca, fácilmente observable al microscopio de contraste de fases, que afectará a la práctica totalidad de las células del cultivo.
- 55

- 60 Así pues, el examen del estado de los cultivos a distintos tiempos tras el tratamiento de los mismos con los extractos de molusco a analizar, permitirá evaluar la presencia tanto de ácido okadáico como el ácido domoico. Los resultados esperados en el caso de que los moluscos contengan una concentración de ambas toxinas igual a los límites legales establecidos serán los siguientes:

Dilución del extracto		[OKA]en cultivo	[DOM]en cultivo	TOXICIDAD	
		(nM)	( $\mu$ M)	30'	24h
inicial	final*				
0	10	50	6.5	+	+
10	100	5	0.65	-	+
50	500	1	0.065	-	+/-
100	1000	0.5	0.0065	-	-

\* teniendo en cuenta que el cultivo el extracto se encuentra diluido en un factor de diez.

Si la concentración de ácido domoico en los extractos es superior a  $65 \mu\text{M}$  ( $20 \mu\text{g/g}$  tejido fresco), se observará toxicidad a diluciones del extracto indicadas en la tabla como negativas, y la concentración concreta de la toxina podrá ser calculada a partir de la dilución de extracto que muestre toxicidad.

#### *Ventajas del procedimiento*

La aplicación del presente método en el análisis rutinario de biotoxinas en mejillones cultivados, almejas u ostras, requiere una inversión inicial mínima que permita la adquisición de:

- una campana de flujo laminar
- un incubador de  $\text{CO}_2$
- un microscopio de contraste de fases y/o fluorescencia

Permite detectar cualitativa y cuantitativamente la presencia de ácido okadáico y ácido domoico en los moluscos mediante un único ensayo, suponiendo por tanto un ahorro considerable tanto de tiempo como de animales necesarios, respecto al bioensayo en ratones actualmente utilizado. Dado que se necesitan 10 ratones para preparar aproximadamente 100 placas de neuronas en cultivo, y que el método permite el análisis simultáneo de dos toxinas, el procedimiento requeriría el uso de un 5% de los animales que actualmente se necesitan.

Dado que los cultivos de neuronas en las condiciones propuestas no se ven afectadas por la presencia de otros tipos de biotoxinas posible contaminantes de los moluscos, tales como las denominadas toxinas paralíticas de moluscos marinos (PSP), el método resulta específico para toxinas DSP (ácido okadáico), y para toxinas ASP (ácido domoico).

La elevada sensibilidad del método para la detección de ácido okadáico con respecto a los límites legales acualmente vigentes (500 veces superior), confiere al procedimiento una gran potencialidad. El mecanismo de acción de esta toxina es prácticamente desconocido, y el estudio del mismo está revelando al ácido okadáico como un compuesto que tal vez entraña riesgos para la salud pública que hasta el momento no habían sido considerados. Será importante por tanto en el futuro contar con métodos que permitan detectar con precisión en los alimentos cantidades menores de la toxina.

#### *Referencias*

1. T. Yasumoto, Y. Oshima and M. Sugawara, Y. Fukuyo, H. Oguri, T. Igarashi, N. Fujita. (1980) Bull. Japan. Soc. Sci. Fish 46, 1405-1411.
2. J.S. Lee, T. Yanagi, R. Kenma and T. Yasumoto. (1987) Agri. Biol. Chem. 51, 877-881.
3. T. Uda, Y. Itoh, M. Nishimura, T. Usagwa, M. Murata, Y. Yasumoto. (1988). In "Mycotoxins and Phicotoxins 88", pp335, ed. by S. Natori, K. Hashimoto and Y. Ueno, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
4. A. Novelli, J.A. Reilly, P.G. Lysko, R.C. Henneberry (1988) Brain Res. 451, 205-212.

5. A. Novelli, J. Kispert, A. Reilly, V. Zitko (1990) Canada Diseases Weekly Report 16S1, 83-89.
6. F. Nicoletti, J.T. Wroblewsky, A. Novelli, H. Alho, A. Guidotti, E. Costa (1986) J. Neuroscience 6, 1905-1911.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



## REIVINDICACIONES

1. La utilización de cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata para el análisis de biotoxinas contaminantes de moluscos marinos. El método aprovecha las propiedades neurotóxicas de algunas de las toxinas que pueden contaminar estos alimentos, en particular del ácido okadáico, perteneciente a las toxinas diarreicas (DSP), y del ácido domoico, perteneciente a las toxinas amnésicas (ASP), y consta de las etapas siguientes:
- a) tratamiento de cultivos primarios de neuronas procedentes de cerebelos de crías de rata con muestras de extractos correspondientes a los tejidos de molusco a analizar. El análisis se lleva a cabo por duplicado y en presencia del compuesto MK801 a una concentración final en cultivo de  $2 \times 10^{-6} \text{M}$ , el cual debe añadirse al cultivo previamente al extracto de molusco con el fin de eliminar la neurotoxicidad del ácido aspártico y del ácido glutámico endógenos presentes incluso en los extractos considerados aptos para el consumo.
  - b) evaluación de la toxicidad asociada a los extractos de molusco analizados, mediante la observación de los efectos producidos por los extractos en las neuronas al cabo de 30 minutos y de 24 horas de la adición de los mismos.
2. Un método según reivindicación 1 **caracterizado** porque de cada muestra de extracto objeto de análisis se prepara una serie de cuatro diluciones: dilución 0, 10, 50 y 100, en agua destilada, y de cada una de ellas se añaden  $200 \mu\text{l}$  (10% del volumen total del cultivo) a los cultivos correspondientes.
3. Un método según reivindicación 1 y 2 **caracterizado** porque cada grupo de series de extractos analizados deberá incluir los cultivos control pertinentes que contendrán todo excepto extracto de molusco, los cuales se utilizarán como referencia para evaluar el grado de toxicidad producido por los extractos objeto de análisis.
4. Un método según reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** porque la evaluación de los posibles efectos tóxicos de los extractos se lleva a cabo mediante la simple observación al microscopio de contraste de fases de los cultivos de neuronas tratados y/o alternativamente (sólo para la toxicidad a las 24 horas) mediante la tinción combinada de las neuronas con un colorante vital fluorescente y con bromuro de etidio, y posterior visualización de las mismas con un microscopio de fluorescencia.
5. Un método según reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado** porque los cultivos de neuronas en las condiciones que se proponen no se ven afectados por la posible presencia en los extractos de molusco de toxinas paráliticas PSP, y resulta por tanto específico para toxinas diarreicas (DSP) y toxinas amnésicas (ASP) de moluscos marinos.
6. Un método según reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** porque permite discernir entre dos tipos de contaminantes: ácido domoico (toxina ASP) y ácido okadáico (toxina DSP) mediante un único tratamiento, ya que permite evidenciar los efectos de ambas toxinas en intervalos de tiempo definidos de 30' y 24h respectivamente, y permite distinguir la naturaleza de los cambios en la morfología y funcionalidad de las neuronas originados por la presencia de las toxinas.
7. Un método según reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado** por la utilización de cultivos neuronales sensibles a concentraciones de ácido okadáico de 1-2 nM, permitiendo así detectar concentraciones de ácido okadáico en los extractos de molusco de 10-20 nM, concentración 25-50 veces inferior a los límites legales actualmente establecidos para esta toxina en tejido de molusco.

2 047 403

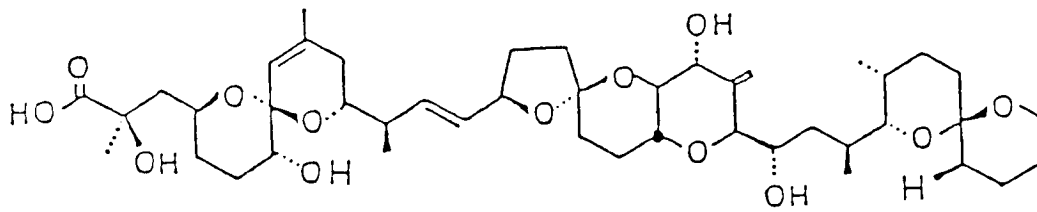


FIG. 1. ACIDO OKADAICO

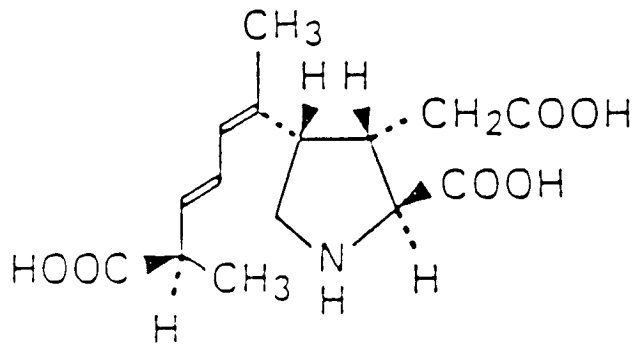


FIG. 2. ACIDO DOMOICO



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: G01N 33/58, 33/12, C12N 5/06

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
	NO SE HA ENCONTRADO NINGUN DOCUMENTO RELEVANTE	

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**

12.01.94

**Examinador**

M. Ybarra Fernández

**Página**

1/1