



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 155 809**

②① Número de solicitud: 009902278

⑤① Int. Cl.⁷: C12Q 1/00

G01N 21/64

//(C12Q 1/00

C12R 1:91)

①②

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②② Fecha de presentación: **15.10.1999**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2001**

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.05.2001

⑦① Solicitante/s: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA**
Centro de Innovación e
Transferencia de Tecnoloxía
Avda das Ciencias s/n
15706 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑦② Inventor/es: **Louzao Ojeda, M. del Carmen;**
Rodríguez Vieytes, Mercedes;
Botana López, Luis Miguel;
Vieites Baptista de Sousa, Juan Manuel y
Leira Sanmartín, Francisco

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Cuantificación de toxinas paralizantes (PSP) por fluorimetría en células excitables.**

⑤⑦ Resumen:

Cuantificación de toxinas paralizantes (PSP) por fluorimetría en células excitables, para detectar y cuantificar las toxinas paralizantes (paralytic shellfish poison, PSP) presentes en un extracto de moluscos contaminado, basada en el mecanismo de acción farmacológico de las toxinas. Se desglosa en 3 etapas durante las cuales se registra la fluorescencia de forma continua. 1) Adición del indicador fluorescente de potencial bis-oxonol a una suspensión de células excitables 2) Despolarización de las células con la toxina veratridina 3) Inhibición dosis dependiente de la despolarización por las toxinas PSP. La inhibición se evalúa en función de las variaciones en el potencial de membrana que se manifiesta como cambios en la fluorescencia. La técnica rápida, específica y sensible es de especial interés económico-sanitario en muestras de extractos de moluscos bivalvos contaminados durante las mareas rojas.

ES 2 155 809 A1

DESCRIPCION

Cuantificación de toxinas paralizantes (PSP) por fluorimetría en células excitables.

Cuantificación de toxinas paralizantes (PSP) por fluorimetría en células excitables. La técnica fluorimétrica para la cuantificación de toxinas paralizantes presentes en extractos de moluscos contaminados durante las mareas rojas utiliza un indicador fluorescente de potencial de membrana de uso comercial. Dentro de los indicadores fluorescentes de potencial destacan las carbocianinas, merocianinas y oxonoles. En este caso se utiliza el bis-oxonol, una sonda fluorescente perteneciente a los oxonoles. Este indicador se distribuye a través de la membrana celular y permite medir cambios rápidos de potencial de membrana en las células excitables que se manifiestan como fluctuaciones en la fluorescencia de las células incubadas con el bis-oxonol y se registran en un fluorímetro. De esta forma los cambios lineales en la fluorescencia están asociados con cambios en el potencial de membrana de la célula excitable. La cuantificación de las toxinas paralizantes por fluorimetría está basada a su vez en la evaluación de la inhibición que producen las toxinas PSP sobre la despolarización de la célula, cuando esta despolarización ha sido inicialmente provocada por veratridina, toxina activadora de canales de sodio.

Los moluscos bivalvos, de gran importancia económica y muy abundantes en nuestras costas, retienen, concentran y acumulan las toxinas asociadas con las mareas rojas sin que se aprecien cambios importantes en su morfología externa ni en sus funciones vitales. Debido a la ausencia de alteraciones morfológicas el riesgo sanitario que supone la salida al mercado de estos moluscos es mayor. En todos los países existen programas para controlar la extracción y comercialización de bivalvos en las zonas contaminadas. Dentro de las toxinas marinas relacionadas con las mareas rojas destacan por su toxicidad las toxinas Paralizantes (paralytic shellfish poison, PSP) denominadas así porque la ingestión de los moluscos contaminados con estas toxinas puede causar la parálisis muscular y en los casos más graves la muerte del individuo.

Desde el punto de vista de su estructura química las toxinas PSP son derivados imidazol guanidínicos con un anillo fusionado en posición angular y con varios posibles radicales sustituyentes que definen hasta 18 toxinas. Estructuralmente en función de los radicales sustituyentes se pueden establecer 3 grupos: toxinas carbamato, toxinas N-sulfocarbamoil y toxinas decarbamoil. De acuerdo con el número de cargas de la molécula se dividen en toxinas del grupo de la saxitoxina (STX), toxinas del grupo de las gonyautoxinas (GTX) y toxinas del grupo de las C. La toxicidad absoluta de las toxinas PSP varía considerablemente siendo las carbamato las más tóxicas.

El mecanismo de acción farmacológico de las toxinas PSP consiste en el bloqueo competitivo de los canales de sodio de las células excitables, impidiendo, por tanto, la entrada del ión al interior celular. Además de las PSP hay otras toxinas de origen natural con el mismo mecanismo

de acción y causantes de graves intoxicaciones. Un claro ejemplo es la tetrodotoxina que se encuentra principalmente en el pez globo. También son importantes los análogos químicos de la saxitoxina producidos por cianobacterias o algas de agua dulce.

El método de detección de toxinas paralizantes universalmente aceptado es el bioensayo del ratón (Sommer & Meyer: Paralytic shellfish poisoning. Arch Path. 24, 560-598. 1937) Sin embargo, las limitaciones de este método, entre las que destacan la elevada variabilidad de los resultados obtenidos para el mismo tipo de extractos de marisco contaminado y la baja sensibilidad, además de la fuerte oposición al sacrificio de animales, ha favorecido la búsqueda de alternativas que a pesar de las múltiples ventajas que supone cada una de ellas, entre las que destacan una mayor sensibilidad a las concentraciones bajas de toxinas y menor variabilidad en los resultados obtenidos, también presentan inconvenientes. Así los inmunoensayos (Chu & Fan: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. J Assoc Off Anal Chem 68, 13-16, 1985) se concretan en la detección de un grupo reducido de toxinas para las que existe el anticuerpo adecuado, resultando difícil la detección de otras. Los métodos de radio receptores (Davio & Fontelo: A competitive displacement assay to detect saxitoxin and tetrodotoxin. Anal. Biochem. 141, 199-204 1984; Vieytes y col. Solid-phase radioreceptor assay for paralytic shellfish toxins. Anal. Biochem. 210, 87-93. 1993) a pesar de ser específicos tienden a ser desplazados por técnicas no radiactivas. Los bioensayos de citotoxicidad (Kogure y col. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. Toxicol. 26, 191-197. 1988) que consisten en incrementar la entrada de sodio en células de neuroblastoma, provocar un aumento del volumen celular y posteriormente la muerte de la célula, en su origen eran demasiado lentos y subjetivos. Posteriormente estos métodos han mejorado en rapidez y objetividad en la detección con la incorporación de técnicas colorimétricas favoreciendo la evaluación de los resultados (Jellett, J. F. y col. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: Automated endpoint determination and standardization of the in vitro tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay. Toxicol. 30, 1143-1156 1992), pero sigue habiendo demasiados pasos en el desarrollo del método haciendo que el sistema de detección de las toxinas requiera varias horas.

Explicación de la invención

La técnica fluorimétrica de detección y cuantificación de toxinas paralizantes PSP objeto de la presente invención es específica, puesto que se fundamenta en el mecanismo de acción farmacológico de las toxinas consistente en el bloqueo de los canales de sodio; sensible, ya que es capaz de detectar cantidades de toxina inferiores a 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; y selectiva, siendo válida para la detección de todas las toxinas PSP. Se cuantifican las toxinas activas teniendo un elevado valor predictivo de la toxicidad de los extractos de los moluscos.

La técnica se realiza utilizando el indicador

fluorescente de potencial bis-oxonol que permite el registro de cambios de potencial de membrana provocados por las toxinas PSP en células excitables. Las células excitables utilizadas pertenecen a la línea celular BE(2)-M17 de neuroblastoma humano. Estas células expresan canales de sodio sensibles al voltaje y se despolarizan cuando se incuban con toxinas como la veratridina que se unen al canal de sodio, lo activan y estimulan la entrada de sodio hacia el interior celular. Las toxinas PSP bloqueando los canales de sodio contrarrestan de una forma dosis dependiente a la despolarización provocada por la veratridina. Este efecto es el criterio utilizado como propuesta de invención, en la que se relaciona la inhibición de la despolarización (previamente provocada por la veratridina) registrada como caída de fluorescencia, con la concentración de toxinas PSP. Inicialmente se establece una relación patrón entre distintos porcentajes de inhibición de la despolarización y concentraciones conocidas de saxitoxina. A partir de esa relación se cuantifican las toxinas PSP de las muestras procedentes de moluscos contaminados. Los cambios en el potencial de membrana se producen en un período de tiempo inferior a segundos de forma que a diferencia de otras técnicas las muestras se analizan en unos 15 minutos.

Modo de realización de la invención

La técnica se puede desglosar en 3 etapas:

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

1) Una suspensión de células pertenecientes a la línea celular BE(2)-M17 de neuroblastoma humano se mantiene a 37 °C en una cubeta termostatazada de un fluorímetro en el que se registra de forma continua la fluorescencia a una λ de excitación de 540 nm y λ de emisión de 560 nm. Se añade el indicador fluorescente de potencial bis-oxonol a una concentración final 2 mM. Transcurridos unos 5 minutos de incubación se ejecutan las siguientes etapas.

2) Adición de la toxina veratridina, activadora del canal de sodio, y como consecuencia despolarización de las células registrada como aumento de fluorescencia.

3.1) Adición de cantidades conocidas de saxitoxina y como consecuencia inhibición dosis dependiente de la despolarización de las células registrada como disminución de la fluorescencia. Con estos datos se establece una relación patrón entre los distintos porcentajes de inhibición de la despolarización y las concentraciones conocidas de saxitoxina.

3.2) Adición de extractos de moluscos contaminado y registro de la disminución de la fluorescencia consecuencia de la inhibición de la despolarización de las células provocada por las toxinas PSP. En función del porcentaje de inhibición ocasionado y de la relación patrón anterior se cuantifican las toxinas PSP de las muestras procedentes de moluscos contaminados.

REIVINDICACIONES

1. Cuantificación de toxinas paralizantes (PSP) por fluorimetría en células excitables. La técnica de detección y cuantificación se **caracteriza** por la utilización del indicador fluorescente de potencial bis-oxonol sobre células excitables y basada en la inhibición (debida a las toxinas PSP) de la despolarización de las células provocada por la toxina veratridina y detectada en un fluorímetro, como cambios de fluorescencia que

se corresponden a variaciones en el potencial de membrana de las células excitables.

2. Técnica fluorimétrica, según la reivindicación 1, **caracterizada** por la utilización de cualquier tipo de indicador fluorescente de potencial.

3. Técnica fluorimétrica, según la reivindicación 1, para la detección y cuantificación de cualquier tipo de toxina que actúe bloqueando canales de sodio provocando el consiguiente cambio de potencial de membrana en células excitables.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/00, G01N 21/64 // (C12Q 1/00, C12R 1:91)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LAWRENCE, J.F. et al.: "Evaluation of a postcolumn electrochemical reactor for oxidation of paralytic shellfish poison toxins", J. AOAC Intern., 1995, Vol. 78, páginas 698-704, todo el documento.	1-3
A	ALFONSO, A. et al.: "Comparative study of the stability of saxitoxin and neosaxitoxin in acidic solutions and lyophilized samples", Toxicon, 1994, Vol. 32, páginas 1593-1598, todo el documento.	1-3
A	VIEYTES, M.R. et al.: "Solid-phase radioreceptor assay for paralytic shellfish toxins", Analytical Biochemistry, 1993, Vol. 211, páginas 87-93, todo el documento.	1-3
A	BURDASPAL, P.A. et al.: "Application of the fluorimetric method to the routine analysis of PSP in shellfish", Alimentaria, 1991, Vol. 28, páginas 23-27, todo el documento.	1-3

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

20.04.2001

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1