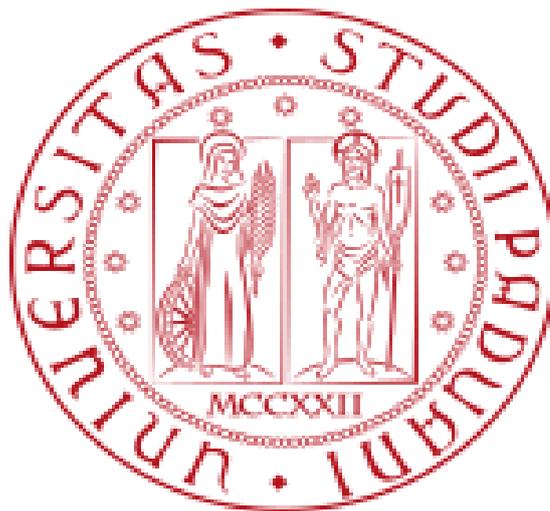


Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea in Biotecnologie



Elaborato di Laurea

LE BIOTOSSINE MARINE CIGUATOSSINE:
METODI PER LA RILEVAZIONE E
PER LO STUDIO DEL MECCANISMO DI TOSSICITA'

Tutor: Prof.ssa Mery Giantin

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Laureando: Marta Alberti

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Le Ciguatossine	4
1.2 Struttura chimica	4
1.3 Distribuzione e tossicità delle CTX	5
1.4 Meccanismo d'azione delle CTX	6
1.5 Metodi di rilevazione delle CTX	7
1.5.1 Metodi di tipo biologico	7
1.5.2 Metodi di tipo chimico	8
2.1 Studio 1 (Sibat et al., 2018)	10
2.1.1 Preparazione dei campioni	10
2.1.2 Strumentazione	10
2.1.3 Condizioni HPLC	11
2.2 Studio 2 (Yokozeky et al., 2024)	12
2.2.1 Preparazione della linea cellulare	12
2.2.2 Vitalità cellulare	12
3. RISULTATI	13
3.1 Studio 1	13
3.1.1 Sistema A (LRMS)	13
3.1.2 Sistema B (HRMS)	13
3.1.3 Studio di frammentazione	14
3.2 Studio 2	15
3.2.1 Ottimizzazione delle concentrazioni degli inibitori	15
3.2.2 Citotossicità delle P-CTX-3C in presenza degli inibitori dei canali Kv	15
3.2.3 Citotossicità dei congeneri CTX in presenza degli inibitori O, V e Kv	16
4. DISCUSSIONE	18
5. BIBLIOGRAFIA	20

ABSTRACT

L'avvelenamento da ciguatera è causato dal consumo di pesci marini, crostacei e molluschi contaminati da una classe di biotossine marine: le ciguatossine (CTX).

Trattasi di molecole termostabili e liposolubili che vengono prodotte da alcune specie di dinoflagellati in particolare dal genere *Gambierdicus* e *Fukuyoa*. Queste tossine entrano nella catena alimentare marina e vengono poi bioattivate nelle specie di pesci commestibili in metaboliti più tossici.

Ciguatera causa sintomi gastrointestinali, neurologici e cardiovascolari nei casi più gravi, tuttavia quelli più tipici sono inversione della percezione della temperatura e prurito generalizzato, che possono persistere anche per lunghi periodi.

Le CTX possono essere raggruppate in 3 gruppi in base all'area di provenienza: quelle del Pacifico (P-CTXs), quelle dei Caraibi (C-CTXs) e quelle dell'Oceano Indiano (I-CTXs).

FDA (Food Drug Administration) e EFSA (European Food Safety Authority) raccomandano come soglie di sicurezza 0,01 ppb di P-CTXs per kg di carne di pesce e 0,1 ppb di C-CTXs per kg di carne di pesce.

Poiché attualmente non esiste un metodo standardizzato per la rilevazione delle CTX, sono stati messi a punto diversi metodi. In questo elaborato di tesi ci siamo focalizzati su due diversi approcci volti rispettivamente a quantificare le biotossine e a comprenderne il meccanismo d'azione: cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS) e l'incubazione cellule di neuroblastoma con le biotossine in presenza/assenza di inibitori dei canali del potassio voltaggio-dipendente.

1. INTRODUZIONE

1.1 Le Ciguatossine

Le ciguatossine (CTX) sono dei composti policiclici, altamente lipofili, che generalmente non vengono degradati in cottura, sono incolori e inodori quindi difficili da rilevare a occhio nudo o tramite l'olfatto.

Le CTX vengono prodotte da due generi di dinoflagellati, il *Gambierdiscus* e il *Fukuyoa*, delle microalghe unicellulari e flagellate, che crescono in acque tropicali e subtropicali, facenti parte del fitoplancton marino. Queste microalghe vengono poi bioattivate da pesci onnivori, erbivori e carnivori in forme più tossiche.

L'avvelenamento da ciguatossine è chiamato ciguatera, una malattia alimentare umana causata dal consumo di pesci contaminati.

I sintomi più comuni conseguenti all'intossicazione sono disturbi gastrointestinali, neurologici e cardiovascolari nei casi più gravi, con una durata che può variare da poche settimane a mesi o addirittura anni (*Tibor Pasinszki et al. 2020*).

Le ciguatossine sono divise in tre gruppi in base alla loro origine: P-CTXs quelle del Pacifico, C-CTXs quelle dei Caraibi e I-CTXs quelle dell'Oceano Indiano. Tuttavia, conseguentemente al riscaldamento globale e all'aumento della temperatura delle acque marine, il *Gambierdiscus* si è esteso anche ad alte latitudini ed è stato rilevato anche in nuove aree come l'Atlantico orientale, le Isole del Mediterraneo, il Mar Arabico e il Golfo del Bengala.

Questa diffusione rappresenta una minaccia per la sicurezza alimentare e la gestione della pesca nelle nuove aree (*Lucía Soliño et al. 2020*).

1.2 Struttura chimica

Le CTX hanno numerosi congeneri a causa della loro modificazione metabolica ad opera dei pesci.

Attualmente sono state identificate 47 CTX utilizzando NMR e spettrometria di massa (*Ivannah Pottier et al. 2023*).

Le ciguatossine sono costituite da 50 a 62 atomi di carbonio, che si organizzano in 13-14 anelli, uniti da legami eteri e allineati in modo simile a una scala mentre i due terminali della scala rigida sono variati; inoltre la maggior parte dei congeneri possiede un gruppo ossidrilico primario. Dato che le CTX hanno molti congeneri, la loro tossicità è diversa (*Paz Otero et*

al. 2022).

Ad oggi sono state individuate 22 CTX provenienti da campioni di pesci del Pacifico e sono stati suddivisi in 2 gruppi: il tipo P-CTX-1 (o P-CTX-1B) e il tipo P-CTX-3C.

Nel Mar dei Caraibi sono state identificate 12 tossine ma ne sono state determinate strutturalmente solo 2: C-CTX-1 e C-CTX-2 (Figura 1).

Infine nell'Oceano Indiano sono state determinate 2 coppie di isomeri: I-CTX-1 e -2 e I-CTX-3 e -4.

C-CTX e P-CTX differiscono all'estremità della molecola in quanto le P-CTX presentano uno spirochetale stabile (anello chiuso) mentre le C-CTX hanno un anello emichetale (*Ivannah Pottier et al. 2023*).

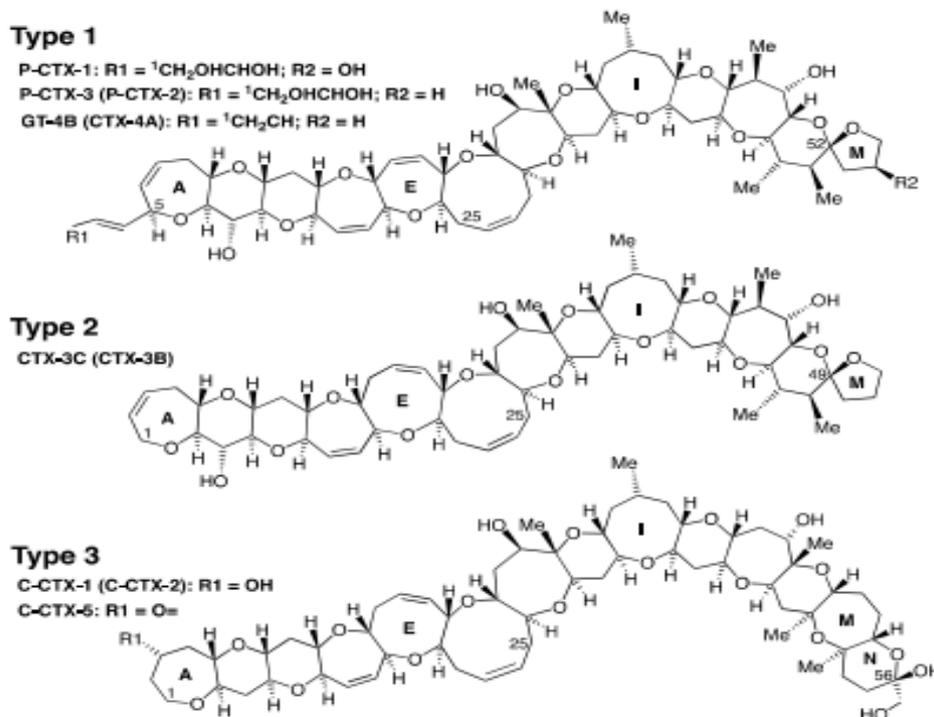


Figura 1. Struttura delle ciguatossine dell'Oceano Pacifico e del Mar dei Caraibi.

1.3 Distribuzione e tossicità delle CTX

I pesci esposti alle ciguatossine hanno sviluppato dei meccanismi in grado di tollerare e accumulare questi composti.

Studi precedenti hanno dimostrato che le C-CTX si distribuiscono in maniera non uniforme tra i vari tessuti, la più alta concentrazione di CTX è stata rilevata nei visceri, in particolare nel fegato; tuttavia la concentrazione di queste tossine nei vari tessuti varia tra le specie ittiche, poiché esse vengono immagazzinate in modo diverso (*Chan, 2017*).

Inoltre è stato ipotizzato che i pesci più grandi fossero in grado di

accumulare quantità maggiori di CTX, ciononostante la relazione tra tossicità e dimensioni dei pesci è stata dimostrata solo per poche specie ittiche (*Gaboriau et al. 2014*), dunque non valida a supportare l'ipotesi. Ad oggi, invece, è stato dimostrato che i pesci che crescono più velocemente siano in grado di accumulare maggiori quantità di ciguatossine rispetto a quelli che crescono più lentamente. (*Sanchez-Henao et al. 2019; Lucía Soliño et al. 2020*)

Nell'uomo, l'avvelenamento da ciguatossine può comportare fino a 175 sintomi riportati dall'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). In un primo momento, dopo 24h dal consumo di pesce contaminato, i sintomi più comuni sono quelli gastrointestinali tra cui diarrea, vomito, dolore addominale; seguiti poi da effetti generali e neurologici come allodinia fredda, parestesia alle estremità e sapore metallico. Nei casi più gravi si possono verificare anche sintomi cardiovascolari come bradicardia e/o ipotensione (*Ivannah Pottier et al. 2023*).

La P-CTX-1 rappresenta la tossina più tossica, infatti EFSA e FDA hanno fissato il limite a 0,01 ppb; per C-CTX e I-CTX invece sono stati rispettivamente fissati i limiti pari a 0,10 e 0,17 ppb.

I fattori di tossicità equivalente (TEF) descrivono la tossicità delle CTX e sono i seguenti: P-CTX-1 =1, P-CTX-2= 0,3, P-CTX-3C=0,2, C-CTX-1=0,1 C-CTX-2=0,3. Per quanto riguarda I-CTX, la tossicità è del 60% per I-CTX-1 e -2 e del 40% per I-CTX-3 e -4 rispetto alla potenza di P-CTX-1 (*Tibor Pasinszki et al. 2020*).

Non è ancora stato chiarito se le CTX abbiano degli effetti sulla salute e sul comportamento dei pesci; tuttavia si è ipotizzato che alti livelli di ciguatossine potrebbero essere letali anche per i pesci stessi (*Lewis e Holmes, 1993*).

Alcune specie ittiche sono a rischio estremo di ciguatera, altre, invece, hanno livelli più contenuti di tossine; questa diversa variabilità all'interno anche della stessa specie è data da vari ceppi tossici di *Gambierdiscus* (*Lucía Soliño et al. 2020*).

1.4 Meccanismo d'azione delle CTX

Le ciguatossine subiscono diverse modifiche tra le varie specie ittiche, portando così a una serie di composti con tossicità e lipofilia diversa.

Il citocromo P450 rappresenta il principale complesso multi enzimatico, che catalizza la biotrasformazione delle tossine nei pesci (*Lucía Soliño et al. 2020*).

La vasta sintomatologia che le CTX causano nell'uomo è dovuta all'interazione delle tossine con il sito 5 dei canali del sodio voltaggio-dipendenti (Na_v). Questi canali nei mammiferi sono costituiti da una subunità α , che comprende 4 domini omologhi, ciascun contenente 6 segmenti di transmembrana, che vanno a formare il poro, permettendo la rilevazione della tensione e il legame con il ligando.

La subunità α può essere associata a una delle 4 subunità β ausiliarie, che modificano il gating e il profilo cinetico della subunità α .

Si è visto che la P-CTX-1, la tossina più potente, agisce a livello dei canali Na_v modificandone le proprietà elettrofisiologiche e di conseguenza vi è un aumento dell'eccitabilità neuronale.

In particolare, a livello dei neuroni del ganglio della matrice dorsale (DRG), P-CTX-1 è in grado di spostare la tensione dell'attivazione del Na , che è sensibile alla tetrodotossina ($TTX-s$)_v, dunque il potenziale diventa più iperpolarizzante e diminuisce il flusso di Na resistente alla tetrodotossina di picco ($TTX-r$).

Nei neuroni parasimpatici, invece, P-CTX-1 fa aumentare la probabilità di apertura di ogni Na TTX -sensibile v senza alterare la conduttanza e il potenziale d'inversione.

In conclusione, P-CTX-1 agisce a livello delle terminazioni nervose periferiche, portando a potenziali più iperpolarizzanti per tutti i sottotipi Na_v , depolarizzando la membrana e influenzando la propagazione del potenziale d'azione (*Marco C. Inerra et al. 2017*).

1.5 Metodi di rilevazione delle CTX

Al momento non esiste un metodo ufficiale per il monitoraggio, la rilevazione e l'identificazione delle ciguatossine.

Sono stati sviluppati numerosi metodi per rilevare la presenza delle CTX, tra cui metodi biologici e chimici.

Tuttavia molte di queste metodologie non sono specifiche per le CTX e di conseguenza risultano inadeguate per la loro quantificazione.

Attualmente per il monitoraggio, il metodo più innovativo prevede l'accoppiamento di metodi biologici e metodi chimici in 2 fasi: screening mediante uso di saggi biologici e analisi di conferma mediante metodi chimici (e.g., LC-MS/MS).

Vengono riportati i principali metodi di tipo biologico e chimico che sono utilizzati per la rilevazione delle ciguatossine (*Ivannah Pottier et al. 2023*).

1.5.1 Metodi di tipo biologico

- Saggi di citotossicità: le ciguatossine agiscono a livello dei canali del sodio voltaggio-dipendenti, legandosi in modo irreversibile, fanno aumentare così l'afflusso di sodio, provocando l'apertura dei canali durante il normale potenziale di membrana; inoltre agiscono andando a inibire i canali del potassio, aumentano l'eccitabilità neuronale. Il saggio CBA-N2a è quello più utilizzato ed è basato sulla rilevazione colorimetrica di cellule N2a trattate con estratto di CTX e ouabaina/veratridina, in quanto la presenza di O/V provoca un aumento degli ioni sodio intracellulari a livelli tossici con conseguente perdita della vitalità cellulare (*Tibor Pasinszki et al. 2020*).
- Saggi di legame del recettore (RBA): CTX e brevetossina competono per lo stesso sito di legame del recettore nei canali del sodio. Il saggio RBA si basa sulla competizione tra CTX e brevetossina marcata radioattivamente per il legame con specifici recettori di membrana per la neurotossina. Lo svantaggio di questo metodo è dato dall'utilizzo di composti radioattivi, per cui è stato sviluppato un saggio RBA basato su fluorescenza (*Tibor Pasinszki et al. 2020*).
- Saggi immunologici: prevede l'utilizzo di un anticorpo specifico e selettivo per le CTX; la rilevazione, in questo caso, si basa sulla loro struttura e non sulla tossicità. L'anticorpo ha legato un'etichetta, che può essere un radioisotopo, un enzima o una sonda fluorescente, che permette la rilevazione del legame anticorpo-bersaglio (*Tibor Pasinszki et al. 2020*).

1.5.2 Metodi di tipo chimico

- HPLC con rilevamento a fluorescenza: si tratta di una cromatografia liquida ad alte prestazioni in grado di separare uno o più composti sfruttando l'equilibrio tra fase stazionaria e mobile. È utile per separare i congeneri, che vengono marcati a fluorescenza nel gruppo ossidrilico primario. Questo metodo risulta essere più sensibile per rilevare CTX (*Tibor Pasinszki et al. 2020*).
- LC-MS/MS: permette di separare e identificare le tossine; questo metodo si basa su una prima separazione tramite LC con gradienti lineari acetonitrile-acqua o metanolo-acqua e poi sull'utilizzo della spettrometria di massa con rilevatori a triplo quadrupolo (*Tibor Pasinszki et al. 2020*).

In questo elaborato di tesi si descrive e pone in evidenza il problema riguardante la diffusione delle ciguatossine in nuove aree geografiche e la conseguente malattia da esse causata. L'obiettivo è presentare due metodi analitici validi per indagare la presenza e studiare la tossicità di CTX.

Lo studio rinominato "Studio 1" è basato sull'utilizzo di cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa per l'identificazione e lo studio della struttura delle CTX.

Lo studio rinominato "Studio 2", invece, è stato condotto in vitro su cellule di neuroblastoma di topo in presenza di CTX e di inibitori dei canali del potassio per valutare la tossicità delle ciguatossine ed è considerato il metodo di screening più valido al momento.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Studio 1 (*Sibat et al., 2018*)

Questo metodo permette di rilevare e quantificare i congeneri di CTX facendo uso della spettrometria di massa, che è in grado di rilevare gli ioni frammentati $[M + H]^+$ o $[M + NH_4]^+$ con perdita al massimo di 5 molecole d'acqua.

In questo studio sono stati confrontati 2 approcci basati sull'uso della spettrometria di massa a bassa risoluzione (LRMS) e ad alta risoluzione (HRMS) per valutare quale dei due protocolli fosse migliore in termini di sensibilità, selettività e rilevazione delle CTX. Inoltre le 2 metodologie si sono basate su 2 sistemi analitici differenti: un triplo quadrupolo e un quadrupolo a tempo di volo.

2.1.1 Preparazione dei campioni

I campioni utilizzati provenivano da diversi campionamenti svolti in Polinesia Francese tra il 2014 e il 2016 da due istituti ILM e IRD.

Il tessuto di pesce liofilizzato è stato estratto 2 volte con 150 ml di acetone, centrifugato, sono stati eliminati i surnatanti tramite evaporazione e il residuo è stato messo in 30 ml di metanolo (MeOH) al 90% e sgrassato con 60 ml di esano. Infine l'estratto è stato disciolto in 5 ml di acetato nitrile/metanolo.

Si è proceduto poi con la purificazione, in cui gli estratti del campione sono stati inseriti su cartucce *Florisil*, disciolto in metanolo acquoso al 60% per la prima purificazione (E1). Per la seconda purificazione (E2) sono state utilizzate cartucce *Extract Clean TM C18* lavate con metanolo al 75%. Entrambe le due eluizioni (E1 e E2) sono state combinate ed evaporate sotto corrente di azoto a 40°C; infine l'estratto E2 è stato ricostituito in 500 μ L di metanolo.

Sono state inoltre preparate le soluzioni di calibrazione a matrice di P-CTX-3C e P-CTX-1B con metanolo, mentre le soluzioni standard sono state ottenute da estratto di cernia bianco.

2.1.2 Strumentazione

Sono stati impiegati due strumenti diversi per effettuare le analisi.

Il sistema A è composto da UHPLC accoppiato a spettrometro di massa a triplo quadrupolo con sorgente di ionizzazione ESI.

Per la rilevazione è stato sfruttato il monitoraggio reazione multipla (MRM), per l'acquisizione dei dati è stato impiegato l'algoritmo MRM programmato

con 2 possibilità: il metodo M1 con 7 coppie m/z corrispondenti a $[M + Na]^+$ / $[M + Na]^+$ e il metodo M2 con 24 coppie m/z corrispondenti a $[M + H]^+$ / $[M + NH_4]^+$. Per ciascun metodo il tempo di rilevamento è di 90 s e il tempo di scansione di 2 s. Per l'elaborazione dei dati e l'analisi è stato utilizzato il software *Analyst 1.6.2* (Sciex, CA, USA).

Il sistema B è composto da UHPLC accoppiato a un quadrupolo con tempo di volo, dotato di sorgente ESI. Questo sistema è stato utilizzato in modalità MS/MS a scansione completa e mirata, nell'intervallo m/z 50-1700 con velocità di scansione MS di 10 spettri s⁻¹ e MS/MS di 3 spettri s⁻¹. Per l'elaborazione dei dati gli autori si sono serviti del software *Mass Hunter v.7.0* (Agilent Technologies, CA, USA).

2.1.3 Condizioni HPLC

Per la cromatografia liquida sono stati utilizzati 3 metodi.

Nel metodo 1 per il sistema A si è sfruttato un gradiente lineare utilizzando acqua come eluente A e acetonitrile al 95% come eluente B; la corsa cromatografica è stata eseguita su una colonna *C18 Kinetex 50*2,1 mm*, 2,6 m, 100Å (Phenomenex, CA, USA). La portata era di 0,1 ml/min, il volume di iniezione di 5 µL e la temperatura di 40°C.

Nel metodo 2 per il sistema A, gli eluenti contenevano 2 mM di formiato di ammonio e 50 mM di acido formico, la corsa è stata eseguita su colonna *Zorbax Eclipse Plus C18, 50*2,1 mm*, 1,8 m, 95Å (Agilent Technologies, CA, USA). La portata era di 0,4 ml/min, il volume di iniezione di 5 µL e la temperatura di 40°C.

Nel metodo 3 per il sistema B, come eluente A si è utilizzata acqua e come eluente B acetonitrile 95%-acqua, la corsa è stata fatta su colonna *C18 Kinetex 50*2,1 mm*, 1,7 m, 100Å (Phenomenex, CA, USA). La portata era 0,4 ml/min, il volume di iniezione di 5 µL e la temperatura di 40°.

2.2 Studio 2 (Yokozeki et al., 2024)

In questo studio è stato dimostrato che le CTX agiscono a livello dei canali del sodio voltaggio dipendenti (canali NaV) e che conseguentemente determinano un effetto di depolarizzazione delle cellule.

Si è visto, infatti, che l'aggiunta di CTX a cellule di neuroblastoma di topo, trattate con ouabaina (inibitore dell'ATP-asi) e veratridina (attivatore canale NaV) determina un notevole aumento dei livelli di Na⁺ intracellulare e conseguentemente la morte cellulare.

Dunque il test su cellule N2a può essere utile come metodo di screening per rilevare la presenza di CTX, tuttavia il problema principale risulta essere la contaminazione da parte di componenti di matrice tissutale che potrebbero interferire nella rilevazione delle tossine.

2.2.1 Preparazione della linea cellulare

La linea cellulare N2a è stata fornita dalla European Collection of Cell Cultures. La densità di semina è di 1x10⁵ cellule/ml (dopo 2 giorni) o 5x10⁴ cellule/ml (dopo 3 giorni). Quando la vitalità cellulare era ≥ 85% si è proceduto a eseguire i saggi.

4-AP (4-amminopiridina) e TEA-Cl (cloruro di tetraetilammonio) sono stati disciolti nel terreno N2a con un rapporto di 1:5, poi sono state effettuate una serie di diluizioni doppie. 100 μL di sospensione cellulare sono stati seminati in piastre di 96 pozzetti a 5x10⁴ cellule/pozzetto. Dopodiché sono stati inseriti 100 μL di soluzione di prova nelle piastre e incubate per 22 ore a 37°C e 5% di CO₂. Infine sono stati aggiunti 10 μL di Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Giappone) a ciascun pozzetto e le piastre sono state ulteriormente incubate per 3-4 ore a 37°C e 5% di CO₂.

Dopodiché è stata inserita una soluzione stock di P-CTX-3C diluita 1:2, per ottenere soluzioni di test P-CTX-3C comprese tra 0,994 e 63,6 pg/mL, sia in presenza di solo inibitori dei canali Kv, sia in presenza di inibitori Kv e O/V. Lo stesso è stato effettuato con i congeneri CTX, dove ogni soluzione è stata diluita 100 volte.

2.2.2 Vitalità cellulare

La vitalità cellulare nei pozzetti di controllo (cellule N2a + inibitori, senza CTX) è stata definita pari al 100% e per ciascuna concentrazione di inibitore è stata calcolata la vitalità cellulare.

Nel terreno di coltura N2a sono stati aggiunti soluzioni diluite contenenti inibitori dei canali Kv; a concentrazioni basse di inibitori è stata testata la presenza di P-CTX-3C, mentre a concentrazioni elevate tutti i congeneri CTX. Le analisi statistiche sono state effettuate con il test ANOVA, considerando significativi i dati con p-value < 0,05.

3. RISULTATI

3.1 Studio 1

3.1.1 Sistema A (LRMS)

Nel sistema A sono stati sfruttati 2 metodi di cromatografia liquida (LC) (Kinetex C18/acetonitrile e Zorbax C18/MeOH) utilizzando come velocità di flusso rispettivamente 0,1 ml/min e 0,4 ml/min.

Nel metodo LC-1 con colonna Kinetex C18 e acetonitrile quale solvente, la separazione è risultata migliore utilizzando un gradiente più rapido.

Nel metodo LC-2 (colonna Zorbax C18 e MeOH quale solvente organico), la separazione è risultata migliore per P-CTX.

Dunque il metodo LC-2 è risultato meno performante nella separazione, data la bassa velocità di flusso, al contrario il metodo LC-1 è risultato più selettivo per diversi composti.

In seguito alla corsa cromatografica si è passati alla spettrometria di massa a triplo quadrupolo (Figura 2): per P-CTX-1B il segnale $[M + NH_4]^+$ era più intenso, mentre per P-CTX-3C gli ioni $[M + NH_4]^+$ e $[M + H]^+$ avevano un'intensità simile.

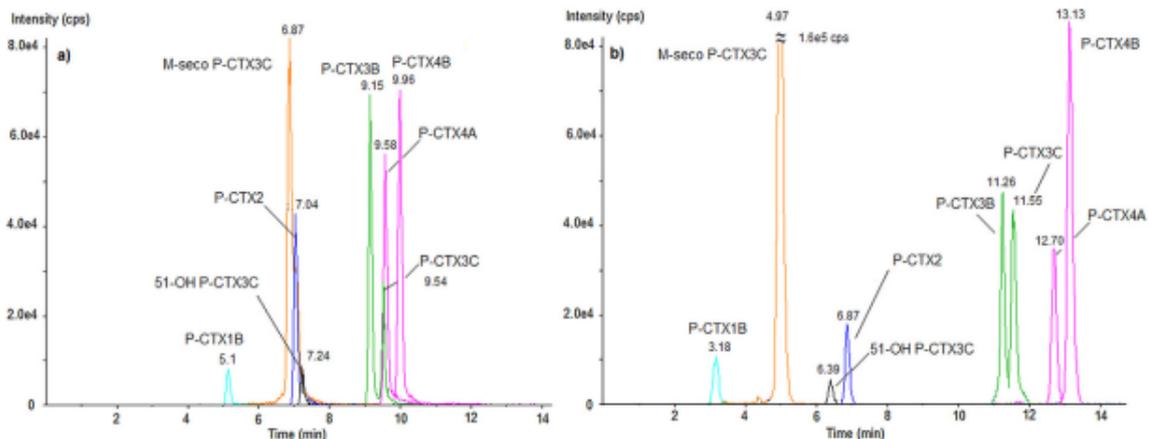


Figura 2. Cromatogrammi ottenuti dalle analisi in LC-MS/MS. Si riporta il tempo di ritenzione della soluzione standard di P-CTX. a) Kinetex C18/acetonitrile (metodo LC-1); b) Zorbax C18/MeOH (metodo LC-2)

3.1.2 Sistema B (HRMS)

Nel sistema B è stato sviluppato il metodo LC-3, basato sull'utilizzo di una colonna Kinetex C18, acetonitrile quale solvente ed una velocità di flusso pari a 0,4 ml/min. L'accoppiamento alla spettrometria ad alta risoluzione tuttavia non ha permesso una buona identificazione delle CTX in campioni contaminati, di conseguenza le intensità dei picchi rimanevano basse (Figura 3). Inoltre sono state evidenziate delle differenze a livello ionico:

$[M+H]^+$ è il pattern ionico per P-CTX-3C, mentre $[M+Na]^+$ e $[M+NH_4]^+$ sono entrambi presenti in P-CTX-1B.

Dunque grazie all'uso della LRMS sono stati rilevati P-CTX a basse concentrazioni, mentre l'HRMS, essendo più selettiva, ha permesso di confermare l'identità delle P-CTX.

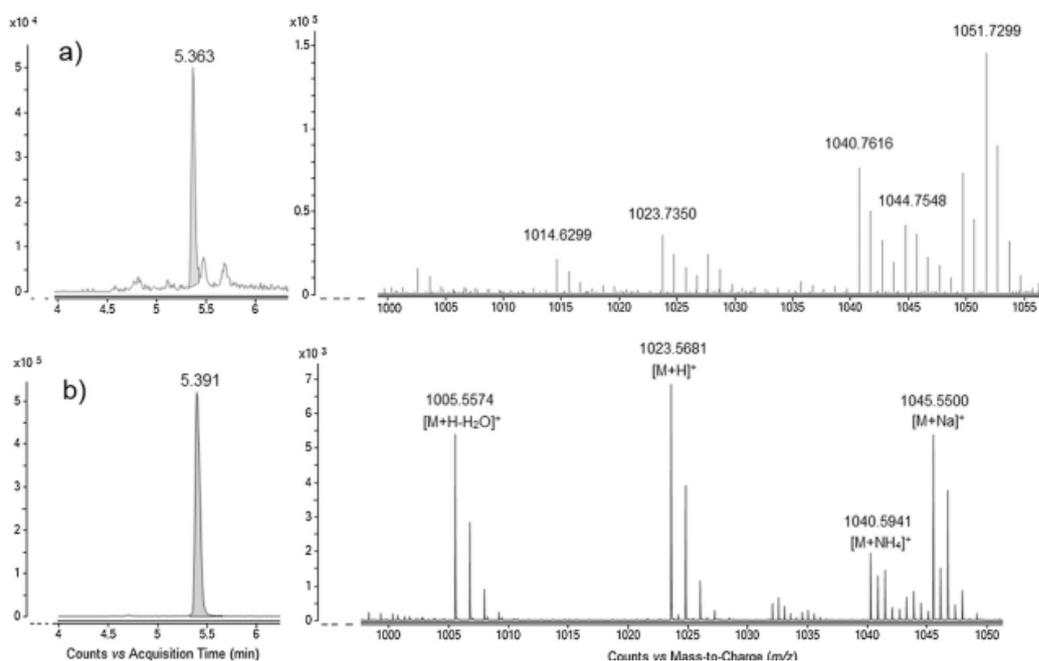


Figura 3. Cromatogramma e spettri LC-MS ad alta risoluzione con metodo LC-3. a) *Gambierdiscus*; b) P-CTX-3C standard.

3.1.3 Studio di frammentazione

Per lo studio delle ciguatossine è stata sfruttata la transizione MRM, che non comporta alcuna frammentazione, quindi la rilevazione si basa sul tempo di ritenzione e la massa, tuttavia è necessario avere dei materiali di riferimento per l'identificazione delle tossine.

Il metodo MRM M2 è molto specifico e permette lo studio delle CTX attraverso 3 transizioni: 2 ioni prodotto dominanti e uno ione precursore specifico.

Come ione precursore sono stati selezionati addotti di ammonio con transizione verso m/z 125,1 o 95,1, invece, come ione prodotto si sono presi in considerazione ioni derivanti da perdite consecutive di acqua dello ione $[M+NH_4]^+$ o $[M+H]^+$.

3.2 Studio 2

3.2.1 Ottimizzazione delle concentrazioni degli inibitori

Per dimostrare l'inibizione delle CTX su $i_{k(A)}$ correnti transitorie di potassio e $i_{k(DR)}$ correnti di potassio a raddrizzatore ritardato sono stati utilizzati rispettivamente la 4-amminopiridina (4-AP) e il cloruro di tetraetilammonio (TEA-Cl); si è visto che il 20-30% della morte cellulare è stato causato da 2,5 mM di 4-AP e 11,5 mM di TEA-Cl (rapporto 1:5) (Figura 4).

Per determinare la concentrazione degli inibitori da utilizzare nei saggi successivi, va studiata preliminarmente la sensibilità del modello ai composti. Per questo è stata studiata la citotossicità degli inibitori dei canali del potassio (Kv) in presenza di ouabaina (O) e veratridina (V) a diverse concentrazioni e valutando la percentuale di morte cellulare, in particolare la concentrazione ottimale è risultata essere 31,3/3,13 μM O/V.

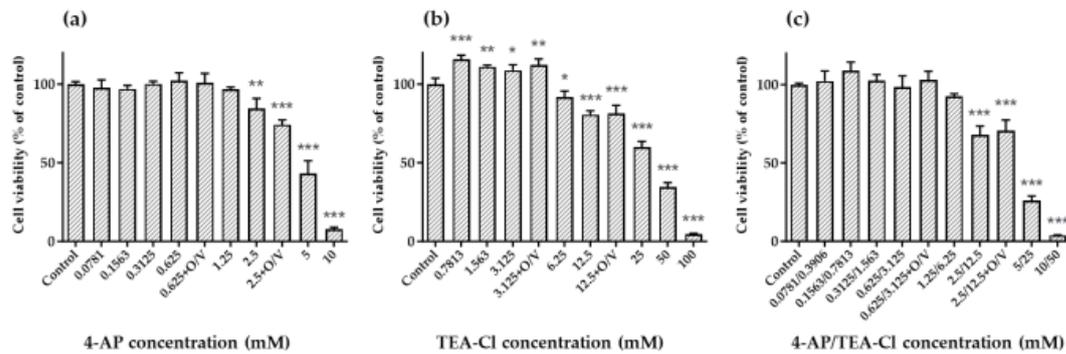


Figura 4. Citotossicità degli inibitori dei canali Kv nelle cellule N2a: a) 4-AP, b) TEA-Cl, c) miscela 4-AP/TEA-Cl. I dati rappresentano la media \pm deviazione standard dei pozzetti triplicati.

3.2.2 Citotossicità delle P-CTX-3C in presenza degli inibitori dei canali Kv

È necessario aggiungere O e V alle cellule N2a affinché le CTX possano indurre morte cellulare, poiché non è noto se gli inibitori dei canali Kv possano da soli causare morte cellulare indotta da CTX. Per P-CTX-3C non è stato possibile tracciare una curva dose-risposta a nessuna concentrazione di inibitore, ma solo in presenza di 31,3/3,13 O/V (Figura 5).

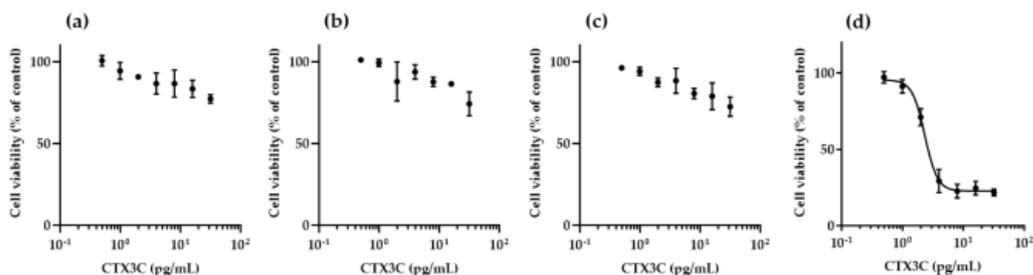


Figura 5. Citotossicità di P-CTX-3C in presenza degli inibitori dei canali Kv in cellule N2a: a) 4-AP, b) TEA-Cl, c) miscela 4-AP/TEA-Cl, d) 31,3/3,13 μ M di O/V. I dati sono la media \pm deviazione standard dei pozzetti triplicati.

3.2.3 Citotossicità dei congeneri CTX in presenza degli inibitori O, V e Kv

Si è visto che la sola presenza degli inibitori dei canali Kv non ha aumentato la sensibilità di P-CTX-3C alle cellule N2a, rispetto all'utilizzo di O/V, quindi gli effetti degli inibitori si sono valutati in presenza di 31,3/3,13 μ M O/V. Si sono confrontate le curve dose-risposta di P-CTX-3C quando le concentrazioni di inibitori non causano morte cellulare e si è visto che le curve si sovrappongono con la curva con solo O/V (Figura 6). Al contrario quando le concentrazioni di inibitori causano il 20-30% di morte cellulare, si è osservato uno spostamento della curva dei congeneri CTX rispetto alla condizione di solo O/V. Il grado è aumentato nell'ordine TEA-Cl, 4-AP e 4-AP/TEA-Cl, ad eccezione di CTX-1B e 51-idrossiCTX-3C, che non hanno mostrato quasi nessuna differenza tra 4-AP e 4-AP/TEA-Cl (Figura 7).

Dunque attraverso questo studio si è dimostrato che l'utilizzo degli inibitori dei canali Kv fa aumentare la concentrazione intracellulare di potassio e le cellule N2a sono maggiormente sensibili ai CTX.

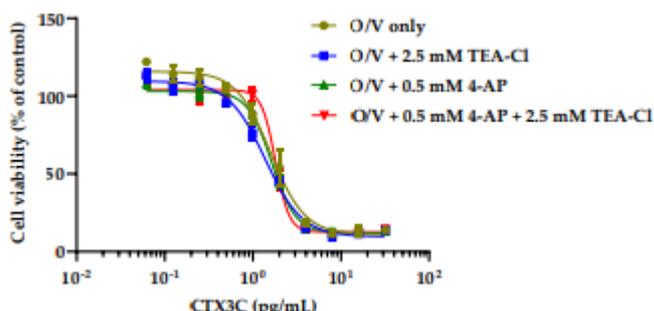


Figura 6. Curve di citotossicità di P-CTX-3C in presenza di inibitori dei canali O, V e Kv a basse concentrazioni. I dati riportati sono la media \pm deviazione standard dei pozzetti triplicati.

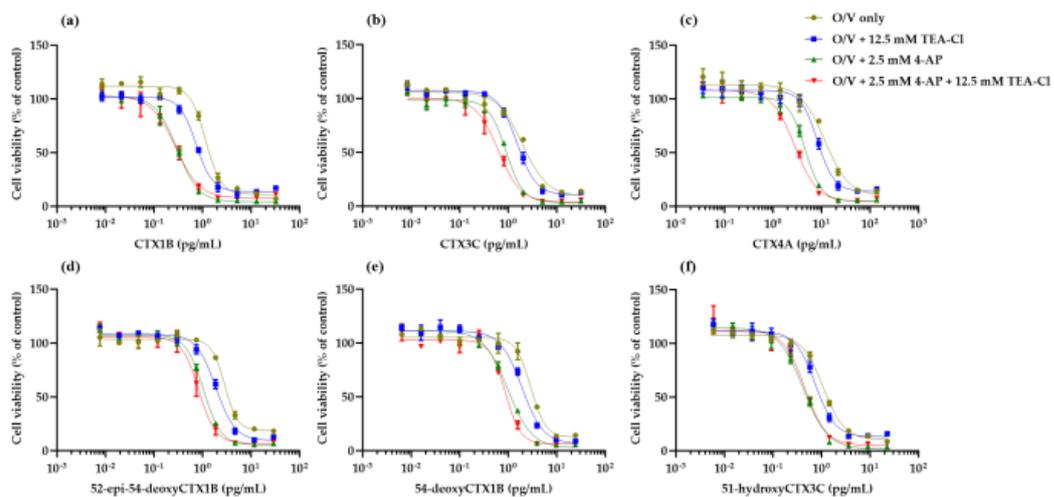


Figura 7. Curve di citotossicità dei congeneri CTX in presenza di solo O/V e di O/V + inibitori dei canali Kv ad alte concentrazioni: a) CTX-1B, b) CTX-3C, c) CTX-4C, d) 52-epi54-deossiCTX-1B, e) 54-deossi-CTX-1B, f) 51-idrossiCTX-3C. I dati sono la media \pm deviazione standard dei pozzetti triplicati.

4. DISCUSSIONE

Ciguatera (CFP) è un'intossicazione alimentare umana che riguarda per lo più le popolazioni delle regioni tropicali, la cui dieta dipende fortemente da prodotti ittici, tuttavia attualmente a causa del commercio globale di pesce, dei viaggi intercontinentali e dell'espansione dei pesci contaminati in nuove aree geografiche, la CFP sta diventando un problema globale. Data la necessità di testare la presenza delle CTX nei pesci prima del consumo umano, di attenuare i rischi per la salute e di identificare le tossine nel caso di intossicazione sono stati messi a punto una serie di test diagnostici e metodi di screening e identificazione delle ciguatossine. In questo elaborato sono stati analizzati 2 metodi per il rilevamento e lo studio delle CTX, il primo, un metodo chimico, usato strettamente per l'identificazione delle tossine, il secondo, un metodo biologico di screening, basato su cellule di neuroblastoma di topo.

Nel primo studio si sono confrontati diversi approcci cromatografici e di spettrometria di massa al fine di permettere la migliore separazione, identificazione e quantificazione delle CTX.

In particolare il metodo LC-2 è risultato migliore per selettività e sensibilità rispetto al metodo LC-1.

La spettrometria è stata usata sia ad alta risoluzione (HRMS), sia a bassa risoluzione (LRMS); una migliore analisi è stata fornita da LRMS, in quanto ha permesso la rilevazione delle P-CTX anche a basse concentrazioni, invece, il sistema HRMS ha consentito di confermare l'identità delle P-CTX presenti a concentrazione maggiore.

Inoltre il metodo di acquisizione MRM M2 con 3 transizioni per tossina è risultato essere meno soggetto all'effetto matrice, dunque più selettivo e i limiti di rilevamento si sono avvicinati molto ai valori raccomandati dall'EFSA.

Nel secondo studio l'utilizzo delle cellule di neuroblastoma (N2a) di topo ha permesso di effettuare diversi saggi biologici volti a caratterizzare il meccanismo di azione delle ciguatossine; nello specifico, è stato confermato il coinvolgimento dei canali del potassio nella tossicità delle ciguatossine.

La sola presenza degli inibitori dei canali Kv rende insensibile P-CTX-3C alle cellule N2a, dunque è fondamentale la combinazione tra inibitori dei canali Kv e O/V.

È stato infatti notato che le CTX erano maggiormente più tossiche utilizzando O/V quali inibitori e aggiungendo degli inibitori specifici per i

canali Kv, la sensibilità era infatti aumentata nell'ordine TEA-CI, 4-AP e 4-AP/TEA-CI.

È stato dimostrato anche che l'inibizione dei canali Kv aumenta la citotossicità delle CTX, in particolare l'inibizione delle correnti $i_{K(A)}$ e $i_{K(DR)}$ suggerisce un coinvolgimento dei canali Kv nella tossicità delle ciguatossine.

Inoltre questo saggio ha accelerato le fasi di purificazione della matrice poiché ha consentito di diluire i campioni di carne di pesce prima di procedere al test.

Questo studio quindi, oltre a essere utilizzato come metodo di screening per la rilevazione delle CTX, è stato importante anche per dimostrare la correlazione tra canali Kv e tossicità delle ciguatossine.

In conclusione, attualmente non sono presenti dei test che siano semplici, rapidi, sensibili e quantitativi per l'identificazione delle ciguatossine, tuttavia i metodi qui descritti rappresentano un valido approccio nello studio e nella rilevazione delle CTX.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Astrid Spielmeyer, Christopher R. Loeffler, Dorina Bodi. Extraction and LC-MS/MS Analysis of Ciguatoxins: A Semi-Targeted Approach Designed for Fish of Unknown Origin. 2021 Sep 8. DOI: 10.3390/toxins13090630. PMID: 34564634.
2. Ivannah Pottier, Richard J. Lewis, Jean-Paul Vernoux. Ciguatera Fish Poisoning in the Caribbean Sea and Atlantic Ocean: Reconciling the Multiplicity of Ciguatoxins and Analytical Chemistry Approach for Public Health Safety. 2023 Jul 10. DOI: 10.3390/toxins15070453. PMID: 37505722
3. Jaume Reverté, Mounira Alkassar, Jorge Diogène, Mònica Campàs. Detection of Ciguatoxins and Tetrodotoxins in Seafood with Biosensors and Other Smart Bioanalytical Systems. 2023 May 18. DOI: 10.3390/foods12102043. PMID: 37238861
4. Lucía Soliñoa, Pedro Reis Costaa. Global impact of ciguatoxins and ciguatera fish poisoning on fish, fisheries and consumers. 2020 Jan 7. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109111. PMID: 31927300
5. Manoella Sibat, Christine Herrenknecht, Hélène Taiana Darius, Mélanie Roué, Mireille Chinain, Philipp Hess. Detection of pacific ciguatoxins using liquid chromatography coupled to either low or high resolution mass spectrometry (LC-MS/MS). 2018 Aug 4. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.08.008. PMID: 30100527
6. Marco C. Inserra, Mathilde R. Israel, Ashlee Caldwell, Joel Castro, Jennifer R. Deuis, Andrea M. Harrington, Angelo Keramidas, Sonia Garcia Caraballo, Jessica Maddern, Andelain Erickson, Luke Grundy, Grigori Y. Rychkov, Katharina Zimmermann, Richard J. Lewis, Stuart M. Brierley & Irina Vetter. Multiple sodium channel isoforms mediate the pathological effects of Pacific ciguatoxin-1. 2017 Feb 22. DOI: 10.1038/srep42810. PMID: 28225079
7. Monica Campas, Sandra Leonardo, Maria Rambla-Alegre, Núria Sagrist, Raquel Vaya, Jorge Diog`ene, Mabel Torr`ens, Alex

- Fragoso. Cyclodextrin polymer clean-up method for the detection of ciguatoxins in fish with cell-based assays. 2022 Sep 13.
DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134196. PMID: 36115230
8. Paz Otero, Marisa Silva. Emerging Marine Biotoxins in European Waters: Potential Risks and Analytical Challenges. 2022 Mar 8.
DOI: 10.3390/md20030199. PMID: 35323498
9. Tibor Pasinszki, Jimaima Lako, Todd E. Dennis. Advances in Detecting Ciguatoxins in Fish. 2020 Jul 28.
DOI: 10.3390/toxins12080494. PMID: 32752046
10. Toshiaki Yokozeki, Madoka Kawabata, Kazuhiro Fujita, Masahiro Hiram, Takeshi Tsumuraya. Sensitive Detection of Ciguatoxins Using a Neuroblastoma Cell-Based Assay with Voltage-Gated Potassium Channel Inhibitors. 2024 Feb 29.
DOI: 10.3390/toxins16030118. PMID: 38535783.

