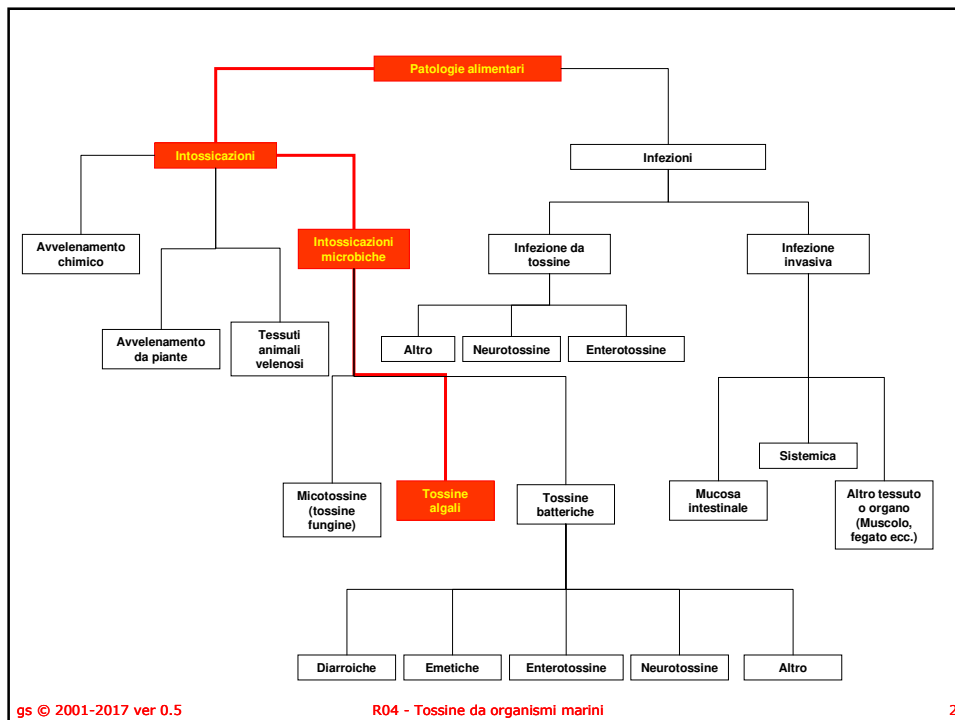


Prof. Giorgio Sartor

TOSSINE DA ORGANISMI MARINI

Copyright © 2001-2017 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 0.5 - Mar-17



Tossine da organismi marini

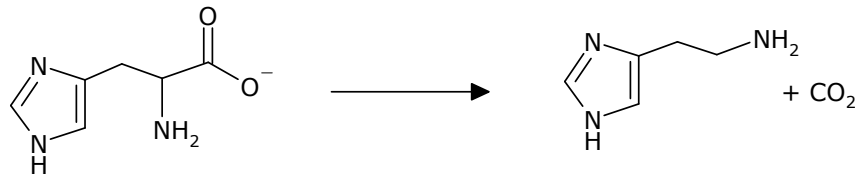
- Intossicazione sgombroide: avvelenamento da pesce avariato (istamina)
- Tossine algali in pesci e molluschi marini (dinoflagellate)
 - Ciguatera
 - intossicazione alimentare causata dall'ingestione di alimenti di origine marina contaminati da ciguatossina, presente in molti microrganismi (*Gambierdiscus toxicus*)
 - Amnesic shellfish poisoning (ASP)
 - Acido domoico
 - Diarrheic shellfish poisoning (DSP)
 - Acido okadaico, Yessotossina
 - Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)
 - Brevetossina
 - Paralytic shellfish poisoning (PSP)
 - Saxitossina
- Tetrodotossina
- *Pfiesteria*

Sindrome sgombroide

- È una patologia simil-allergica risultante dall'ingestione di pesce alterato.
- È il secondo tipo più frequente di intossicazione da prodotti ittici, seconda solo alla ciguatera.
- Viene spesso confusa con allergia alimentare e deriva dal consumo di specie ittiche a carne rossa, appartenenti alle famiglie *Scombridae* (tonno, tonno pinna gialla, tonnetto striato, sgombro, lampuga), *Clupeidae* (sardine, aringhe, cheppie e acciughe) e specie ittiche imparentate con queste, refrigerate o conservate in modo non adeguato dopo la pesca.

Sindrome sgombroide

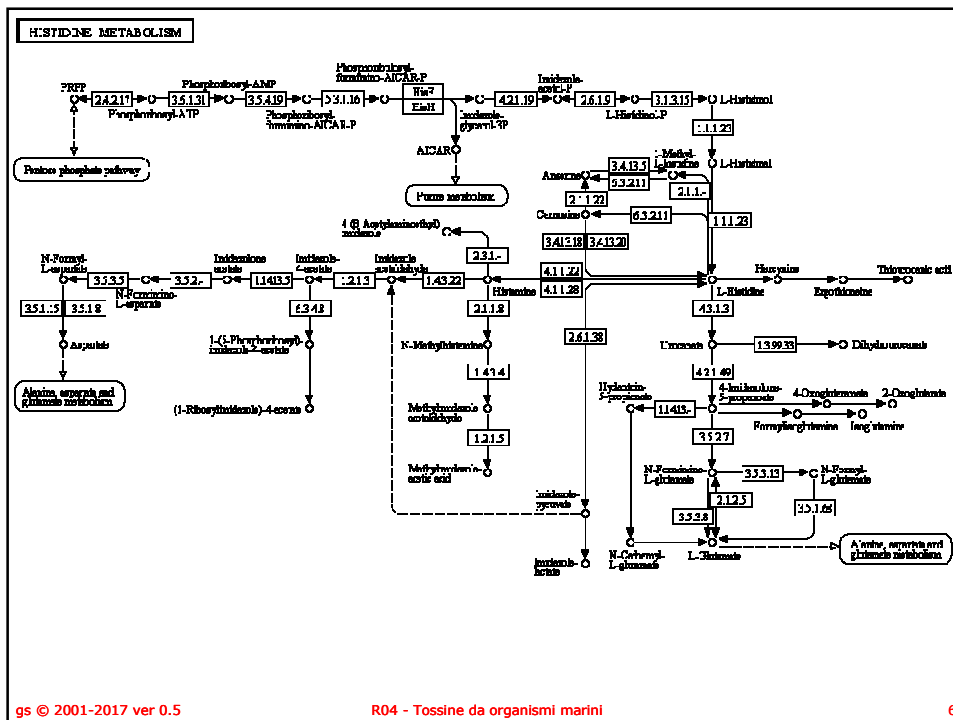
- Può derivare dall'inappropriato trattamento del pesce durante l'immagazzinamento o la lavorazione che provocano la degradazione dell'istidina a istamina;
- L'istidina è presente in natura in molti tipi di pesce e a temperature superiori ai 16 °C a contatto con l'aria essa viene convertita in istamina ad opera dell'istidina decarbossilasi prodotta da vari batteri (*Photobacterium phosphoreum*, *Morganella morganii*, *Raoultella planticola*)



gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

5

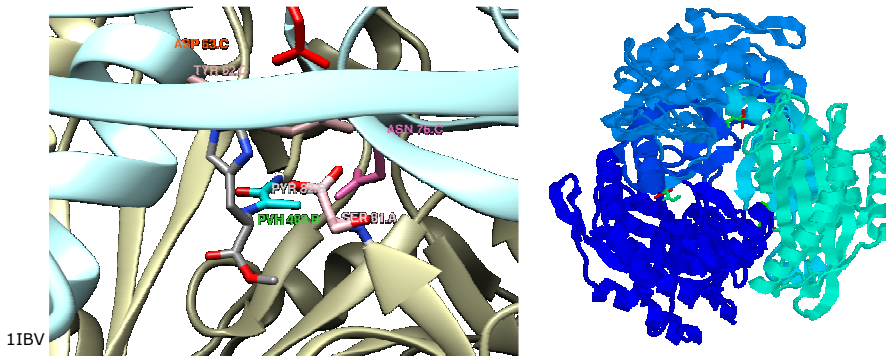


gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

6

Istidina decarbossilasi (EC 4.1.1.22)



- In animali ha come gruppo prostetico il piridossale, nei batteri il gruppo prostetico è un **piruvoile**.

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

9

Sindrome sgombroide

- Inizio: immediato fino a 30 minuti
- Sintomi iniziali:
 - Formicolio o bruciore alla bocca;
 - Arrossamento e prurito;
 - Calo pressorio
- Sintomi successivi:
 - Nausea, vomito e diarrea
- Durata da tre ore a svariati giorni.
- Trattamento:
 - Antistaminici;
 - Controllo della temperatura;
- Valori ammessi (FDA): 50 ppm

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

10

Dinoflagellate

- Alghe unicellulari fotosintetiche coperte da placche di cellulosa che danno un aspetto "corazzato";
- Alcune motili con due flagelli
- Importanti nella catena trofica marina e di acque dolci;
- Alcune specie marine causano le maree rosse
 - Condizioni per la fioritura
 - Colorano di rosso l'acqua
 - Producono tossine
 - *Pfiesteria* specie recente (1988).

Dinoflagellate

- Varie specie (*Gymnodinium breve*, *Alexandrium* spp) producono tossine che provocano morie nei pesci;
- Se uno branco di pesci nuota in una fioritura di alghe le possono danneggiare con rilascio di tossine nell'acqua;
- Le tossine sono termostabili e vengono bioconcentrate;
- Le tossine danneggiano le branchie causando asfissia e morte.

Maree rosse

- Solo alcune specie di dinoflagellate causano le maree rosse:
 - *Glenodinium spp.*, *Gymnodinium spp.* e *Gonyaulax spp.*
- Le maree rosse sono dovute alla rapida proliferazione delle alghe causata da condizioni meteo, dall'abbondanza di nutrienti, dall'inquinamento e dal fotoperiodo.

Tossine algali

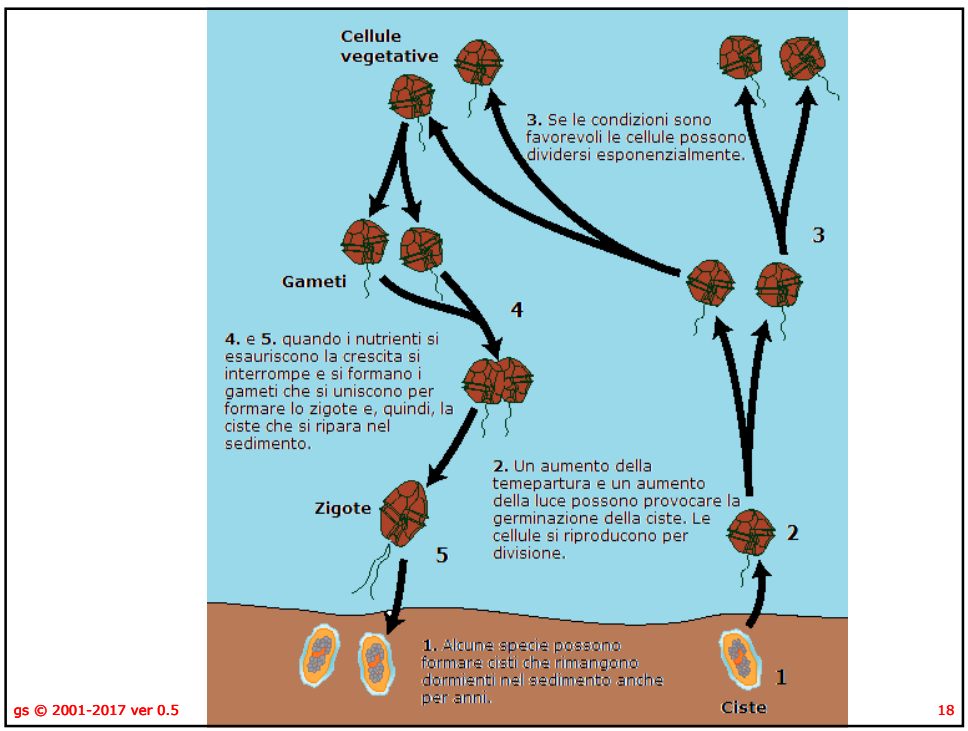
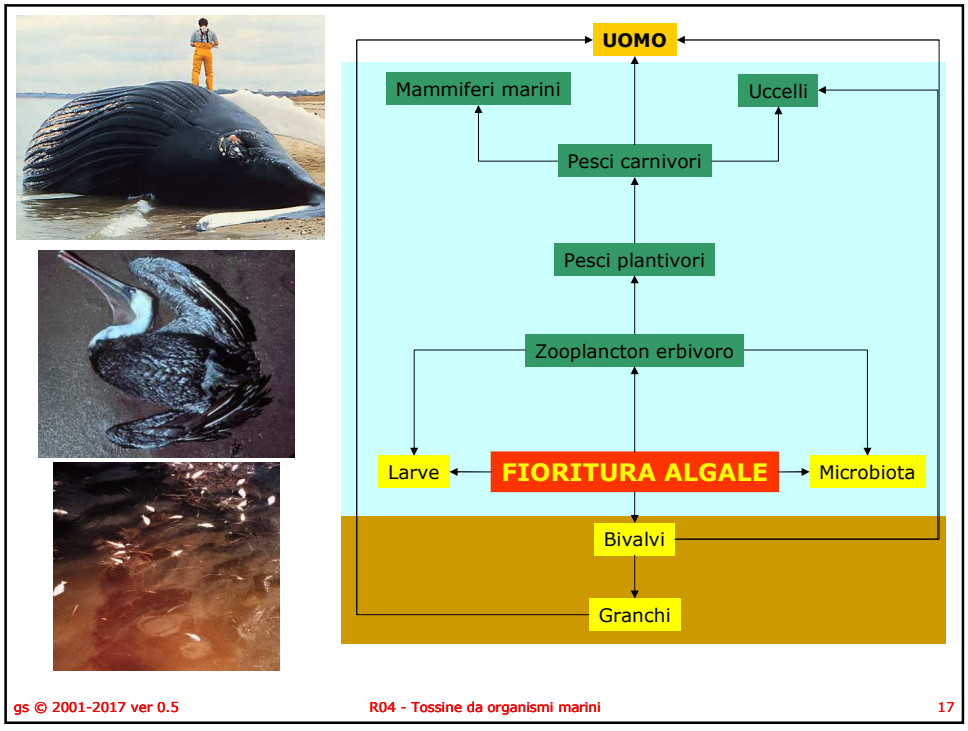
Test di tossicità

- I molluschi contaminati non si differenziano in termini di gusto o aspetto da quelli non contaminati;
- La cottura o altri trattamenti culinari non distruggono le tossine;
- Quindi gli allevamenti di pesce e molluschi devono costantemente monitorare la presenza delle tossine;
- Al momento il test più comune è il mouse bioassay.

Mouse Bioassay

- Iniezione intraperitoneale (IP) di un estratto delle ghiandole digestive del mollusco in un topo di 18-20 g;
- Viene misurato il tempo dopo il quale compare la morte:
 - Una *mouse unit* corrisponde alla quantità che uccide il topo in 24 ore;
- PRO:
 - Il metodo è validato in molto paesi, è rapido e relativamente poco costoso;
- CONTRO:
 - Bassa riproducibilità e lungo tempo di saggio;
 - Nessuna informazione sulla tossina.



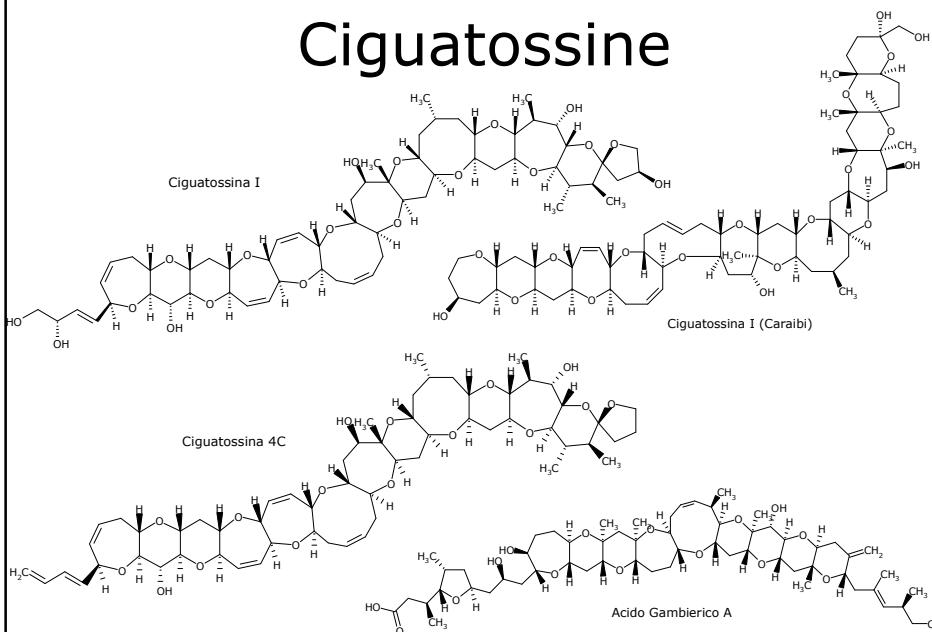


Ciguatossine

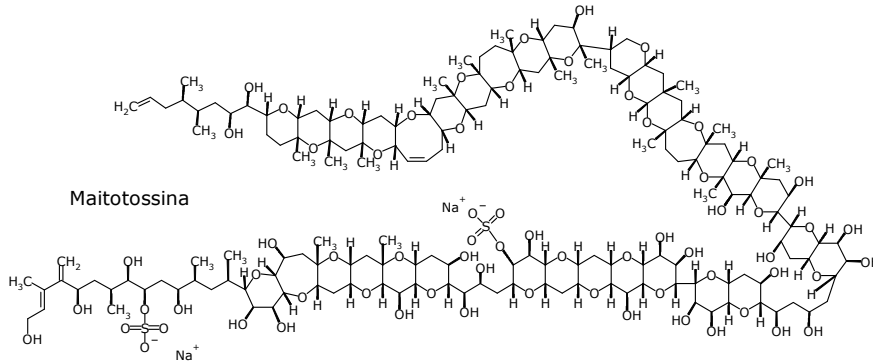
- Le ciguatossine sono state isolate dal detrito organico del reef corallino;
- Le tossine derivano dal metabolismo secondario di microalghe dinoflagellate del genere *Gambierdiscus* spp;
- Sono polieterei liposolubili e termostabili, sono responsabili per l'avvelenamento da ciguatera;
- Sono attivatori dei canali del sodio e sono prevalentemente presenti in pesce proveniente da acque tropicali e subtropicali.
- In generale le specie ittiche che contengono le tossine si nutrono di alghe o di detriti del reef corallino: pesce chirurgo (*Ctenochaetus striatus*), pesce pappagallo (*Scarus gibbus*), e predatori carnivori predatori di questi ultimi: murene, dentici, cernie, sgombri, barracuda ...



Ciguatossine



Ciguatossine



- Più altre sei conosciute e isolate:
 - Ciguatossina 3C
 - Acido Gambierico B, C, D
 - Gambierolo
 - Gambiertossina 4b

Ciguatossine

- Le differenze strutturali sembrano essere associate alla regione oceanica di provenienza della dinoflagellata;
- La scoperta recente di alghe *Gambierdiscus* nel Nord-Atlantico e nel Mediterraneo, oltre che nelle isole Canarie, ha generato l'ipotesi che vi sia un contributo dei cambiamenti climatici nella distribuzione delle microalghe che producono ciguatossine;
- I danni al reef provocato da uragani o dall'uomo aumenta le possibilità di colonizzazione dello stesso da parte delle macroalghe alle quali sono legate le dinoflagellate *Gambierdiscus*;
- Questi danni possono causare una aumentata incidenza dei livelli di tossine fino a 10 - 15 anni dopo l'evento;
- Ciguatossina: liposolubile; agisce aprendo i canali del Na^+ ;
- Maitotossina: idrosolubile; aumenta l'ingresso di ioni Ca^{++} .

Avvelenamento da ciguatera

- Inizio: <6 ore
- Sintomi:
 - Gastrointestinali: nausea, vomito, diarrea
 - Neurologici: Formicolio o bruciore alla bocca, dolori articolari e muscolari, sensibilità alla temperatura alterata;
 - Cardiovascolari: aritmia, bradicardia, tachicardia, ipotensione;
- Durata:
 - Qualche giorno; raramente i sintomi neurologici possono persistere per mesi o anni;
- Trattamento sintomatico

Controllo

- Mouse bioassay
 - "Cigua-check"
 - ELISA in valutazione
- Ottenere specie ittiche da aree sicure
- Specie implicate:
 - murene, dentici, cernie, sgombri, barracuda
- FDA: nessuna linea guida

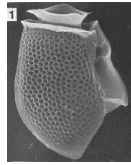
Eventi

- 1981: Puerto Rico, 49 casi, 2 mortali (Barracuda, *Seriola* spp. , *Caranx ruber*)
- 1987: Caraibi, 57 casi
- 1988: Florida, >100 casi
- 1992: California, 25 casi
- 1994: California
- 1995: Isola di Guam

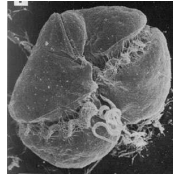
Tossine dei molluschi

- Amnesic shellfish poisoning (ASP)
 - Acido domoico
- Diarrheic shellfish poisoning (DSP)
 - Acido okadaico, Yessotossina
- Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)
 - Brevitossina
- Paralytic shellfish poisoning (PSP)
 - Saxitossina

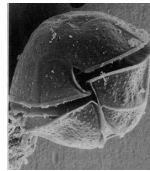
Dinoflagellate



Dinophysis spp.
Acido Okadaico



Gymnodinium breve
Brevetossina



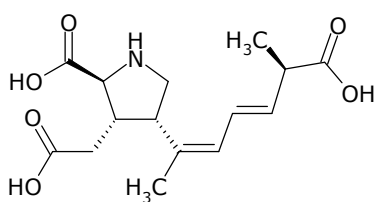
Alexandrium spp.
Saxitossina

gs © 2001-2017 ver 0.5

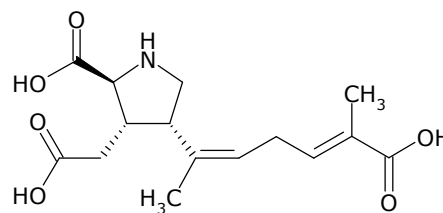
R04 - Tossine da organismi marini

27

Amnesic shellfish poisoning (ASP)



Acido Domoico (DA)



Acido Isodomoico (IDA)

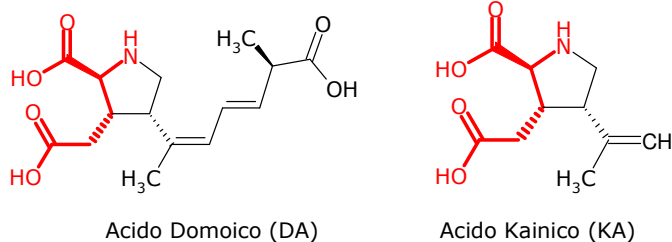
- Nonostante che nell'uomo le patologie da Acido domoico siano state attribuite al solo consumo di crostacei e/o molluschi, la tossina si può accumulare in svariati organismi marini che si nutrono di fitoplancton (acciughe, sardine).

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

28

Amnesic shellfish poisoning (ASP)



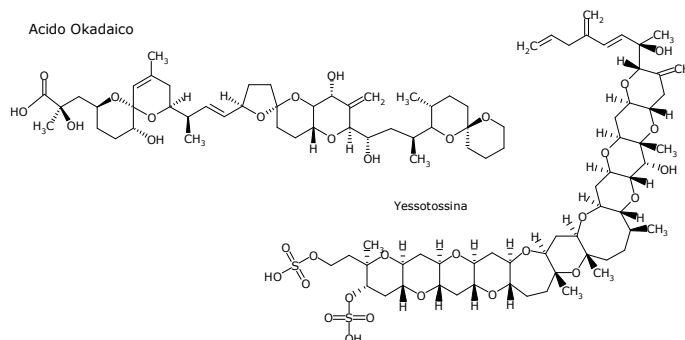
- Agisce come una neurotossina che può causare perdita di memoria, danni cerebrali e, nei casi più gravi, può portare alla morte.
- Il meccanismo d'azione può essere spiegato dalla similarità con il neurotrasmettitore **Glutamato** ma con maggiore affinità per i suoi recettori;
- È tre volte più potente del suo omologo Acido Kainico e cento volte più potente del **Glutamato**;
- Lega i recettori nel SNC al N-metil-D-aspartato (NMDA) causando la depolarizzazione dei neuroni.

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

29

Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)



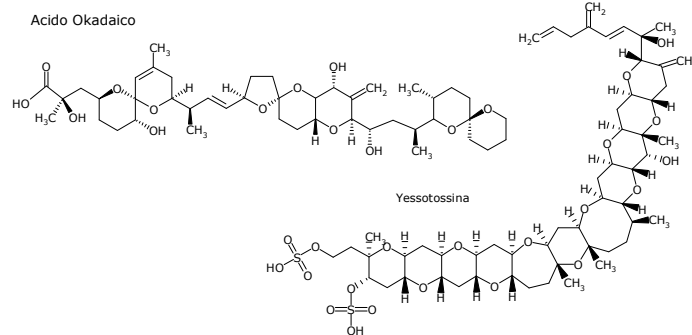
- Da molluschi che si nutrono di alghe dinoflagellate (*Dinophysis* e *Prorocentrum* spp.)
- Localizzazione:
 - Giappone e sud-est asiatico, Scandinavia, Europa occidentale, Cile, Nuova Zelanda, Canada orientale
- Tossine termostabili;
- Probabile alterazione del cAMP quando ingerite.

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

30

Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)



- Acido Okadaico
 - Isolato la prima volta dalla spugna *Halichondria okadae*
 - Tossina capace di superare la barriera transplacentale. I tessuti fetali possono contenere più Acido Okadaico del fegato o del rene.
- Yessotossina
 - Liposolubile
 - Induttore di morte cellulare probabilmente attraverso un'alterazione lisosomiale.

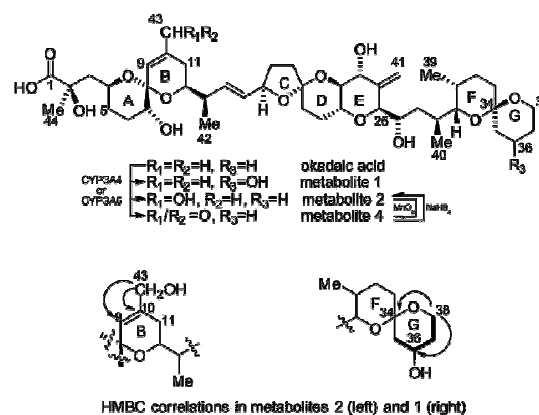
gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

31

Acido Okadaico (OA)

- È stato proposto che l'assemblaggio dell'OA abbia, come unità di partenza, l'acido glicolico al quale poi vengono aggiunte una serie di unità di acetato; (*Biosynthetic studies of the DSP toxin skeleton. Daranas AH1, Fernández JJ, Norte M, Gavín JA, Suárez-Gómez B, Souto ML. Chem Rec. 2004;4(1):1-9.*)
- Metabolizzato via CYP3A4 e CYP3A5;
- Potente inibitore delle serina/treonina fosfatasi.



The structures of three metabolites of the algal hepatotoxin okadaic acid produced by oxidation with human cytochrome P450.
Liu L, Guo F, Crain S, Quilliam MA, Wang X, Rein KS.
Bioorg Med Chem. 2012 Jun 15;20(12):3742-5

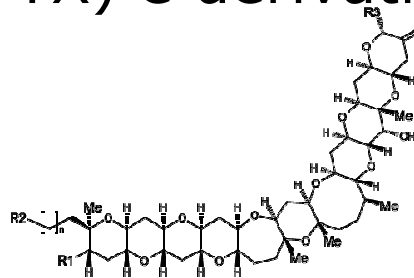
gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

32

Yessotossina (YTX) e derivati

- Il meccanismo d'azione della YTX sembra coinvolgere:
 - Apoptosi attraverso l'attivazione delle caspasi;
 - Interazione con il sistema E-caderina/catenina;
 - Alterazione a livello delle cellule cerebellari del Purkinje in topi trattati con dosi letali di YTX I.P. (condensazione della cromatina, alterata distribuzione cellulare nel tessuto);
 - YTX sembra essere inoltre un potente inibitore delle fosfodiesterasi.



Tossin	R1	R2	R3	n
YTX	OSO ₂ H	OSO ₂ H		1
HomoYTX	OSO ₂ H	OSO ₂ H		2
45-OH-homoYTX	OSO ₂ H	OSO ₂ H		2
Di-desulfo-YTX	OH	OH		1

Fig. 1. Structures of YTX, homoYTX, 45-hydroxy-homoYTX and di-desulfo YTX.

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

33

Diarrheic shellfish poisoning (DSP)

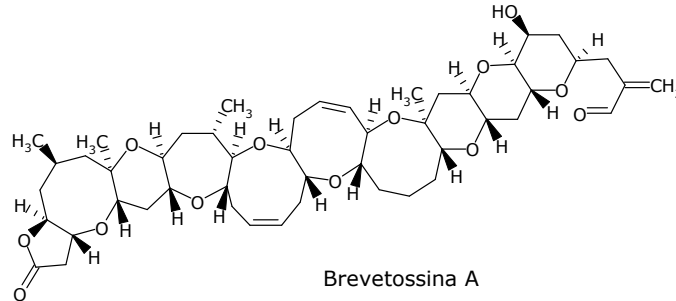
- Inizio: da 30 minuti a 3 ore
- Sintomi: diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, brividi, febbre;
- Durata: 2-3 giorni
- Controllo:
 - Mouse bioassay
 - HPLC
 - Molluschi da acque sicure;
- FDA: 0.2 ppm acido okadaico e acido 35-metil okadaico (DXT1).

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

34

Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)



- Neurotossica: apre i canali del Na⁺;
- Immunotossica: inibisce l'attività enzimatica nelle cellule del sistema immunitario;
- Non facilmente rilevabile o eliminabile dagli alimenti;
- Proviene da dinoflagellate molto fragili che rilasciano la tossina anche nell'aerosol.

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

35

Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)

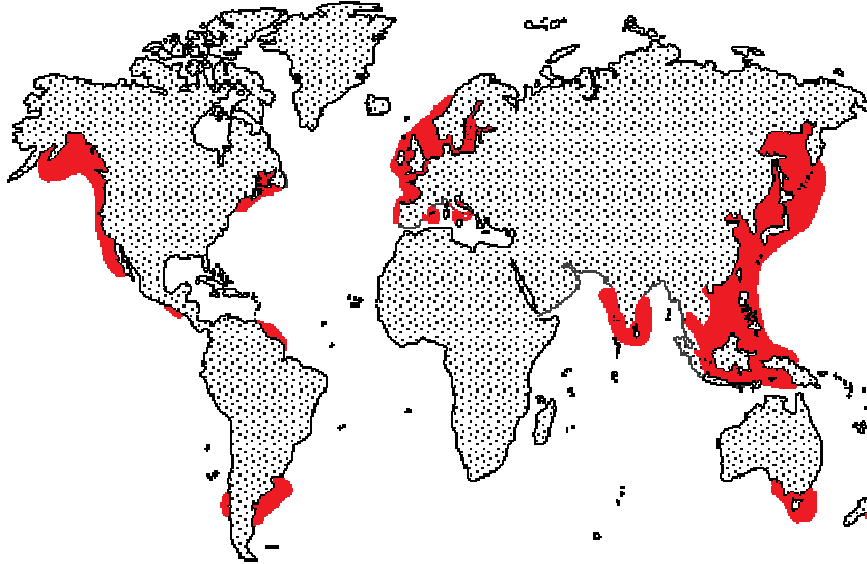
- Sorgente: molluschi che si nutrono con *Gymnodinium breve*
- Localizzazione: golfo del Messico e Atlantico meridionale in USA; Nuova Zelanda
- Inizio: da qualche minuto a qualche ora
- Sintomi: tremolio e semiparalisi dei muscoli delle labbra e della lingua, alterazione del senso della temperatura, diarrea, vomito
- Durata da qualche ora a alcuni giorni
- Controllo:
 - Mouse bioassay
 - HPLC
 - Saggio immunologico commerciale
 - Molluschi da acque sicure
- FDA: 0.8 ppm (20 mouse unità/100g) in ostriche, cozze, vongole.

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

36

Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)



gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

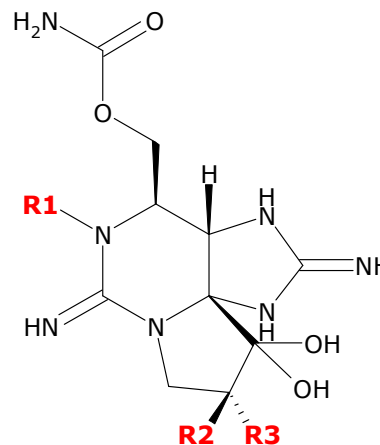
37

Paralytic shellfish poisoning (PSP)

- Da *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium tamarense*, *A. catenella*;

- Vari congeneri:

- Saxitossina:
 - R1=H; R2=H; R3=H
- Neosaxitossina:
 - R1=OH; R2=H; R3=H
- Goniautossina 1 (GTX1):
 - R1=OH; R2=SO₃; R3=H
- Goniautossina 2 (GTX2):
 - R1=H; R2=SO₃; R3=H
- Goniautossina 3 (GTX3):
 - R1=H; R2=H; R3=SO₃
- Goniautossina 4 (GTX4):
 - R1=OH; R2=H; R3=SO₃



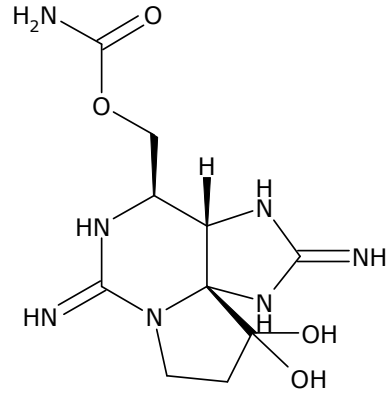
gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

38

Saxitossina

- Neurotossina, si lega a recettori di membrana delle cellule nervose inibendo il flusso di Na^+ ;
- Causa vertigini, paralisi e altri sintomi neurologici;
- Tossicità circa mille volte maggiore del cianuro;
- Nessun antidoto;
- La tossicità è diversa per i molluschi, molti sono insensibili alla saxitossina.

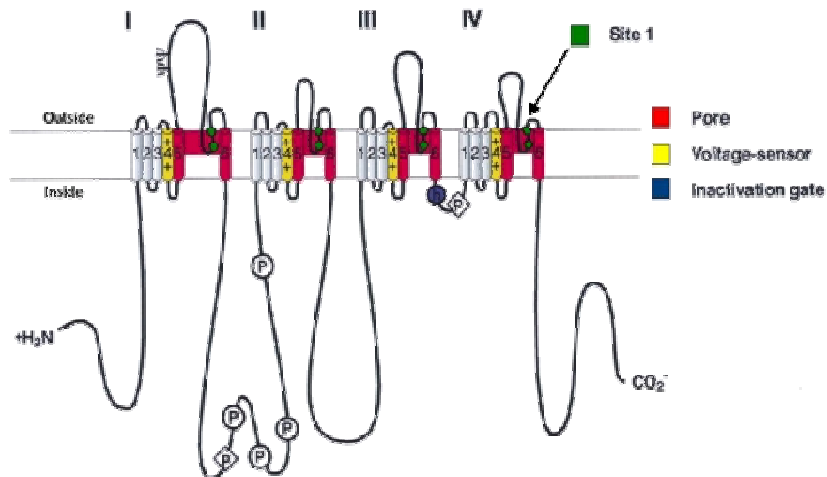


gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

39

Meccanismo



The proposed transmembrane arrangement of the α -subunit of Na^+ channels. The pore is represented in red, the voltage sensors in yellow and the inactivation gate in blue. PSP is mediated by the interaction and blockage of Site 1 by STX.

Route of metabolism and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans. García C, Barriga A, Díaz JC, Lagos M, Lagos N. *Toxicon*. 2010 Jan;55(1):135-44.

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

40

Paralytic Shellfish Poisoning

- Inizio: da 30 minuti a 2 ore;
- Sintomi: formicolio, bruciore, addormentamento, linguaggio incoerente, paralisi respiratoria;
- Durata: il supporto respiratorio entro 12 ore dall'esposizione porta al completo recupero;
- Controllo:
 - Mouse bioassay
 - Monitoraggio delle acque costiere e dei molluschi
 - Molluschi di origine certificata
- FDA: 0.8 ppm saxitossina equivalente (80µg/100g)

Tossicità per i mammiferi marini

- Alta affinità per il tessuto cerebrale;
- Può causare perdita dei meccanismi della termoregolazione;
- Il disorientamento causato dalla tossina aumenta la difficoltà di ritorno alla superficie dopo l'immersione e altera la distribuzione della circolazione in immersione.

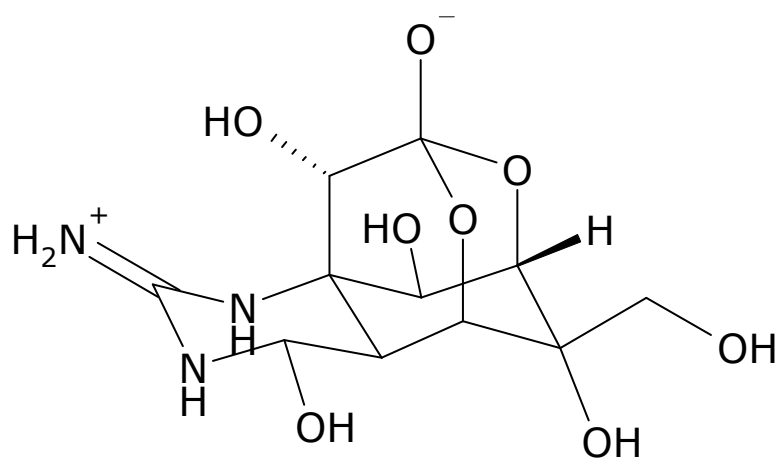
Tetrodossina

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

45

Tetrodossina



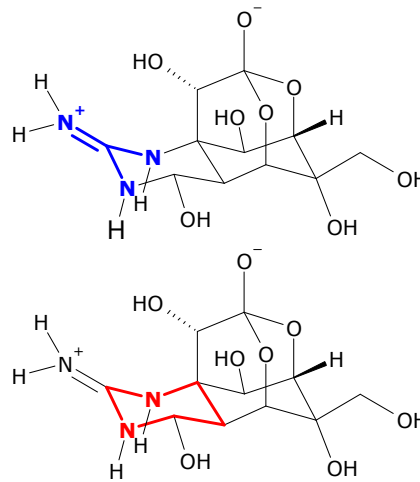
gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

46

Tetrodossina

- Contiene un gruppo **guanidinio** carico positivamente e un **anello pirimidinico**
- È una neurotossina che blocca i canali del sodio.



gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

47

Animali marini

- Pesce Palla (*Tetraodontiformes*)
 - Gonadi, fegato, intestino e pelle di circa 80 specie di pesce palla
 - Cibo molto ricercato in Giappone
- Polpo ad anelli blu (*Hapalochlaena lunulata*)
 - Barriera corallina Australia
 - La TTX è contenuta nelle ghiandole salivari.
- Si trova anche nel Tritone della California, pesce pappagallo, rane del genere *Atelopus*.



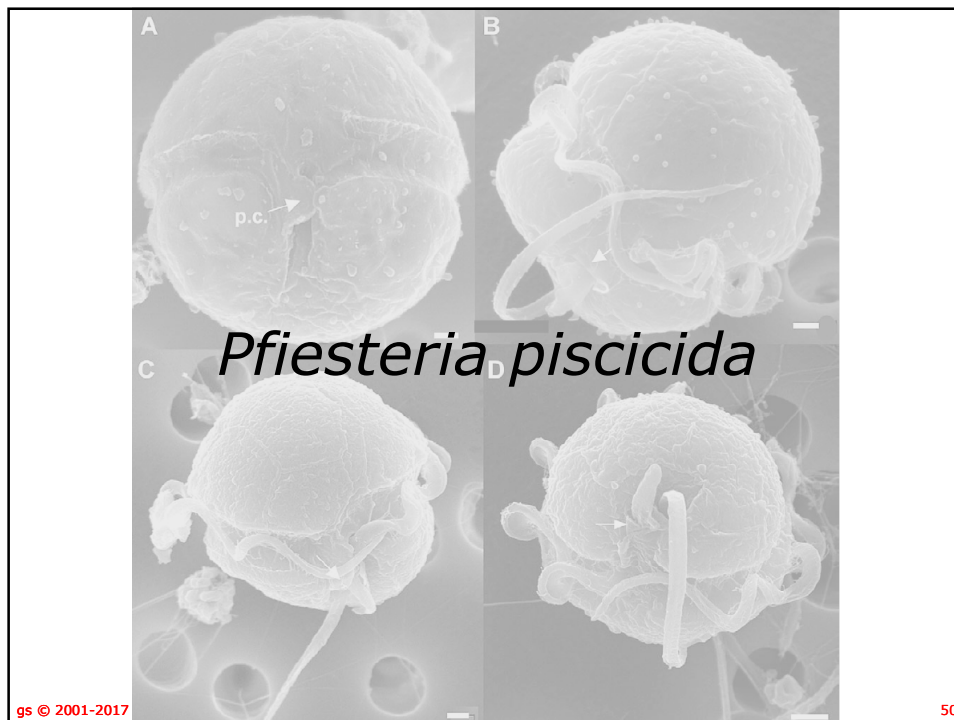
gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

48

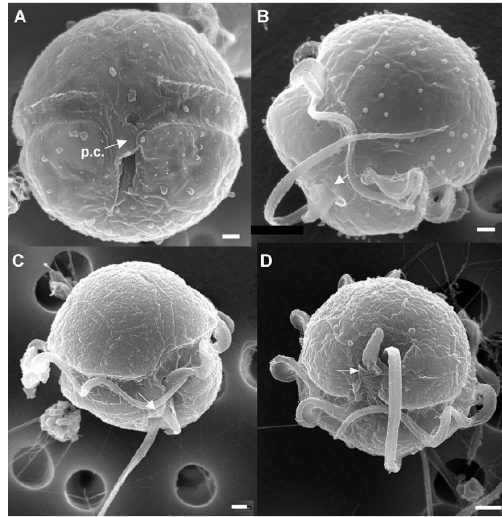
Tetrodotossina

- Inizio: da 20 minuti a 3 ore
- Sintomi iniziali:
 - Addormentamento e pizzicore alle labbra;
 - Paralisi
 - Fatale in 6-8 ore
- Sintomi secondari: formicolio al viso e alle estremità, sensazione di leggerezza e galleggiamento dolore di testa, dolore epigastrico, nausea, diarrea e/o vomito;
- Sintomi terziari: paralisi e morte in 4-8 ore
- Controllo:
 - Mouse bioassay
 - HPLC
 - Non mangiare carne di pesce palla
- FDA: il pesce palla non può essere importato senza specifica autorizzazione



Pfiesteria piscicida

- Da *piscis*: pesci, *cida*: che uccide: assassina di pesci;



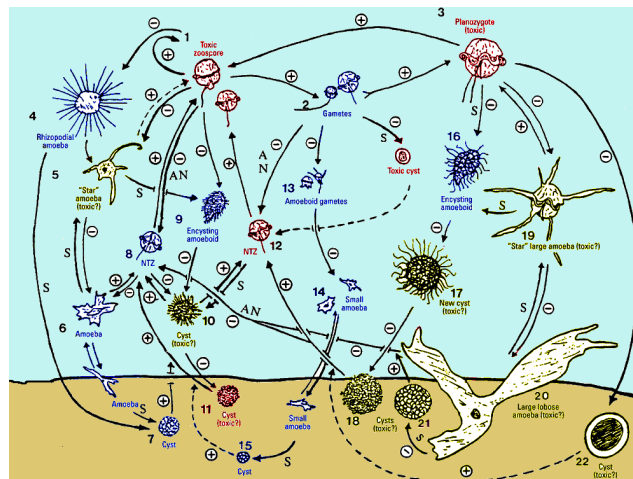
H.G. Marshall et al. / Harmful Algae 5 (2006) 481–496

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

51

Pfiesteria piscicida



- Ciclo vitale complesso: sembra avere più di 20 diversi stati (ciste, flagellata, amebeide, ecc.) e sembra che solo alcuni di essi possano produrre tossina.
- Litaker RW, Vandersea MW, Kibler SR, Madden VJ, Noga EJ, Tester PA (2002). "Life cycle of the heterotrophic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae)". *Journal of Phycology* **38** (3): 442–463

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

52

Pfiesteria piscicida

- Si apposta sul fondo incapsulandosi in una sorta di cisti protettiva, può resistere per anni senza cibo, in condizioni climatiche molto variabili e ad alto tasso d'inquinamento.
- Ciò che ne risveglia l'appetito sono in generale le feci dei banchi di pesci che si depositano sul fondo, incrementandone anche la capacità riproduttiva.
- Si libera della ciste e si presenta come un flagellato; per mezzo dei flagelli riescono a nuotare fino ad aderire alle proprie vittime e liberare una neurotossina che ha due funzioni: paralizzare il sistema nervoso centrale e causare la disgregazione dei tessuti, iniettando una sorta di "proboscide" nelle ferite causate dalla tossina.
- Si nutre di globuli rossi assumendone il colore ed aumentando la propria massa.
- Una volta nutrita si lascia cadere nuovamente sul fondale per reincapsularsi nella ciste protettiva in attesa di un nuovo ciclo di nutrimento.

Pfiesteria piscicida

- Organismo responsabile di morie di pesce;
- Sin dai primi anni '90 la tossina prodotta da *Pfiesteria* può essere stata la sola responsabile della morte di più di un miliardo di pesci in North Carolina;

Pfiesteria piscicida

- La tossina non è stata completamente identificata;
- I pazienti esposti alla tossina hanno sviluppato problemi neurologici e dermatologici.

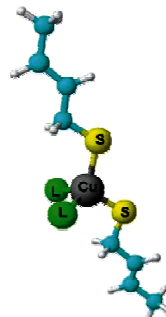


FIGURE 6. Model of the *Pfiesteria* toxin, showing the key features observed in this study. The drawing shows a Cu ion (black) in a distorted tetrahedral environment (suitable for a Cu(I) or Cu(II) ion) complexed by at least two thiol-containing organic ligands (sulfur, yellow; carbon, blue). The green spheres represent either terminal ligands to the Cu ion, additional symmetry related organic ligands, or bridging atoms in a coupled dinuclear complex. The thiol-containing ligand represents the minimum structure as determined by ^{63}Cu NMR spectroscopy. The extent of higher symmetry coordination (or H_2O coordination) or coordination geometry was not addressed in this study.

Metal complexes and free radical toxins produced by *Pfiesteria piscicida*.
Moeller PD, Beauchesne KR, Huncik KM, Davis WC, Christopher SJ, Riggs-Gelasco P, Gelasco AK.
Environ Sci Technol. 2007 Feb 15;41(4):1166-72.

gs © 2001-2017 ver 0.5

R04 - Tossine da organismi marini

55

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

Riferimenti

- Handbook of Ecotoxicology -
- David J. Hoffman, Barnett A., Rattner G., Allen Burton, Jr., John Cairns, Jr. Eds. - LEWIS PUBLISHERS - 2003
- Environmental Toxicology - Biological and health effect of pollutants - II Edition
- Ming-Ho Yu - CRC Press - 2005
- Environmental Stressors in Health and Disease
- Jurgen Fuchs and Lester Packer Eds. - Marcel Dekker, Inc. - 2001

WEB

Vie metaboliche:
KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
Degradazione degli xenobiotici: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>

Struttura delle proteine:
Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
Hexpasy <http://us.expasy.org>
Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/spot/>
Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
Enzyme (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>

Enzimi:
Nomenclatura - IUBMB: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
Proprietà - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
Expasy (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbbd.ahc.umn.edu/>
Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
Metalloioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov>

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da: <http://www.qsartor.org/pro>

- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Università di Bologna

Giorgio Sartor
Ufficiale: giorgio.sartor@unibo.it
Personale: giorgio.sartor@gmail.com

Aggiornato il 20/03/2017 14:07:04