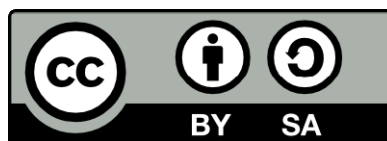




Optimización de ensayos celulares para la detección de toxinas marinas responsables de intoxicaciones alimentarias. Aplicación en extractos lipofílicos de muestras naturales de *Mytilus galloprovincialis*

Elisabet Cañete Ortiz



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- CompartirIgual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - CompartirIgual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**

APÉNDICES

7 APÉNDICES

7.1 Informe del director



A Sant Carles de la Ràpita, el 30 de noviembre de 2011.

La tesis defendida por Elisabet Cañete, "Optimización de ensayos celulares para la detección de toxinas marinas responsables de intoxicaciones alimentarias. Aplicación en extractos lipofílicos de muestras naturales de *Mytilus galloprovincialis*", incluye cuatro artículos ya publicados y un manuscrito sometido. A tenor de lo que refleja la copia de tesis sometida, Elisabet Cañete ha contribuido con notoriedad al desarrollo de metodologías basadas en cultivos celulares para la determinación de toxinas marinas responsables de intoxicaciones alimentarias, principalmente presentes en moluscos de consumo. De esta manera, independientemente de los índices de impacto de sus publicaciones, podemos avanzar que su investigación tendrá una buena acogida dentro del campo de desarrollo de métodos celulares alternativos a los bioensayos con animales, y en particular dentro del campo de toxinas marinas. Actualmente, los métodos analíticos (cromatografía líquida y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas) están siendo consolidados como métodos de determinación de toxinas en detrimento de bioensayos con ratón. En este contexto, el desarrollo de métodos celulares para determinación de toxinas, orientación elegida por Elisabeth Cañete en su tesis, se presenta como una opción para que en el futuro los ensayos celulares se empleen en detrimento del bioensayo ratón dentro de la evaluación

toxicológica de las toxinas y la de sus efectos y mecanismo de acción, eso sí, con la prudencia de que ensayos celulares y bioensayos en mamíferos cubren niveles de información toxicológica diferentes.

En el presente informe adjuntamos una tabla que recoge el listado de las cinco contribuciones, indicando el índice de impacto para cada una de ellas. A continuación, resumimos la participación de la candidata a cada una de éstos trabajos, indicando que sólo la publicación número 3, « Cell-based assay coupled with chromatographic fractioning: a strategy for marine toxins detection in natural samples. », ha formado parte de otra tesis realizada en nuestro laboratorio que fue defendida en la Universitat de Barcelona; esta publicación también fue utilizada por la Dra. Amandine Caillaud. Se indica aquí, y en el informe correspondiente a la tesis de Amandine Caillaud, la contribución de estas coautoras a esta publicación.

Participación de la doctorante a las diferentes contribuciones

Respecto a la participación de la doctorante a las diferentes contribuciones, Elisabet Cañete es primera autora de cuatro de las cinco presentadas. Ello refleja el grado de responsabilidad que ha tenido en la ejecución de las diferentes partes de todos y cada uno de estos trabajos, es decir, en la identificación de la problemática, el diseño experimental, la obtención de resultados, la obtención de conclusiones y la discusión de éstas dentro del contexto científico actual. Igualmente, Elisabet Cañete, en las contribuciones donde aparece como primera autora, se ha responsabilizado de la coordinación entre los coautores de los trabajos, la puesta en formato de los manuscritos y su revisión final, incluyendo, las correcciones o modificaciones solicitadas por los revisores externos.

Detallamos a continuación en una tabla, para cada uno de estos trabajos, la contribución más específica de Elisabet Cañete en las partes experimentales de los trabajos:



Dr. Jorge Diogène Fadini

Director de Tesis, Investigador del IRTA Sant Carles de la Ràpita
Seguiment del Medi Marí i Seguretat Alimentària

IRTA

Ctra. de Poble Nou, Km 5,5

E-43540 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona)

tel: 902 789 449 (ext 1807)

fax: 977 744 138

jorge.diogene@irta.es

www.irta.es

Nº	Título	Autores	IF (2010)	Descripción de la participación de la doctorante en las partes experimentales de los trabajos que se describen en las contribuciones
1	Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins, 2008. <i>Toxicon</i> 52 (4), 541-550.	E. Cañete J. Diogène	2.451	Cultivos celulares de las cepas Neuro-2a y NG108-15 Puesta a punto del ensayo de citotoxicidad en las células expuestas a patrones certificados de siete toxinas en diferentes condiciones experimentales Determinación de las citotoxicidades de los patrones Estudio de la estabilidad de las toxinas en función de las condiciones de evaporación.
2	Improvements in the use of neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins, 2010. <i>Toxicon</i> 55 (2-3), 381-389.	E. Cañete J. Diogène	2.451	Cultivos celulares de las cepas NG108-15 Puesta a punto del ensayo de citotoxicidad en las células expuestas a patrones certificados de siete toxinas en diferentes condiciones experimentales Determinación de las citotoxicidades de los patrones
3	Cell-based assay coupled with chromatographic fractioning: a strategy for marine toxins detection in natural samples, 2009. <i>Toxicology in vitro</i> 23 (8), 1591-1596	A. Caillaud E. Cañete P. de la Iglesia G. Giménez J. Diogène	2.546	Cultivos celulares de las cepas Neuro-2a Determinación del efecto matriz en muestras de extracto de bivalvos Extracciones de mejillón y fraccionamientos cromatográficos de los extractos
4	NG108-15 cell-based and protein phosphatase inhibition assays as alternative semiquantitative tools for the screening of lipophilic toxins in mussels. Okadaic acid detection, 2010. <i>Toxicology in vitro</i> 24 (2), 611-619.	E. Cañete M. Campàs P. de la Iglesia J. Diogène	2.546	Extracciones de mejillón y fraccionamientos cromatográficos de los extractos Cultivos celulares de la cepa NG108-15 Puesta a punto del ensayo de citotoxicidad en las células expuestas a patrones certificados y extractos de moluscos Determinación de la citotoxicidad de las muestras (Fracciones de los extractos obtenidas por cromatografía) Contribución a las etapas iniciales de puesta a punto del ensayo de inhibición de fosfatasa en extractos de mejillón
5	Evaluation of a toxicological alternative tool for lipophilic toxicity screening in mussels. NG108-15 cell-based assay coupled to chromatographic fractioning: a case study for YTX contamination. <i>Manuscrito sometido a: Toxicology in Vitro.</i>	E. Cañete P. de la Iglesia J. Diogène	2.546	Extracciones de mejillón y fraccionamientos cromatográficos de los extractos Cultivos celulares de la cepa NG108-15 Puesta a punto del ensayo de citotoxicidad en las células expuestas a patrones certificados y extractos de moluscos Determinación de la citotoxicidad de las muestras (Fracciones de los extractos obtenidas por cromatografía)

7.2 Material y métodos

7.2.1 Protocolo de mantenimiento celular

7.2.1.1 En células Neuro-2a

Descripción del protocolo de mantenimiento del cultivo de células de mamífero Neuro-2a, células de neuroblastoma de *Mus musculus*. Suministrado por el ATCC con número de catálogo: CCL-131.

Preparación del medio de cultivo

Utilizamos el medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen, 31870-074) (sigma, R0883), en formato líquido de 500 ml. Para preparar medio de cultivo al 10% de suero. Quitar de la botella de medio de 500 ml 62,5 ml para complementarlo con:

- 50 ml de suero (FBS : Iberlabo DE14-801F). Se guarda a -20°C.
- 5 ml de solución de piruvato de sodio (100 mM). (Sigma, S8636). Se guarda a 4°C.
- 5 ml de solución L-glutamina (200 mM) (Innogenetics, 17-605F). Se guarda a -20°C.
- 2,5 ml de solución antibiótica (10 mg/ml de estreptomicina y 1000 u/ml de penicilina) (Innogenetics, 17-602E). Se guarda a -20°C.

El medio preparado se guarda a 4°C durante un máximo de un mes.

Resiembra de las células

La resiembra se hace tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). El mantenimiento de la cepa se hace con frascos de 75 cm² en el incubador Binder número 1 y un frasco de 25 cm² (de seguridad) en el incubador Binder número 2.

Pasos de la resiembra:

- Observación del estado de la monocapa de células.
- Rotular dos frascos de cultivo celular de 75 cm² y un frasco de 25 cm² (fecha, tipo celular, medio de cultivo y pasaje).
- Añadir a cada frasco de 75 cm² y de 25 cm², 28 y 9,5 ml de medio RPMI

10%, respectivamente.

- Eliminar el medio antiguo de los frascos con células.
- Lavado de la monocapa de células con 10 ml de PBS (una vez).
- Añadir 4 ml de solución tripsina (Sigma, T4174) (diluida con PBS hasta 0,5g/L).
- Esperar 30 segundos.
- Retirar la tripsina.
- Dar unos golpecitos hasta que las células se desprendan de la superficie del frasco.
- Añadir 8 ml de medio RPMI 10% para resuspender las células.
- Aspirar el medio y dispensar diferentes veces para tener una resuspensión homogénea y evitar las aglomeraciones de células.
- Añadir 2 de los 8 ml de resuspensión celular en cada frasco de 75 cm² y 0,5 ml en el frasco de 25 cm².
- Mover suavemente, primero con el frasco en vertical (para que se homogenice la solución) y después en horizontal (per que es disperse por toda la superficie del frasco).
- Depositar los frascos nuevos en los incubadores a 37°C y 5% CO₂.

Todas las soluciones se ponen a temperatura ambiente, como mínimo una hora antes de hacer la resiembra para que se atemperen las soluciones.

Solución PBS

La solución tampón PBS (Phosphate buffered saline) 1X se prepara mediante:

- 50 mL solución PBS 10X. Se guarda a 4°C.
- 25 mL solución 3M NaCl. Se guarda a temperatura ambiente.
- 425 mL agua de calidad HPLC. Se guarda a temperatura ambiente.

Autoclavar después de la preparación de la solución 10X. Se guarda a 4°C durante un mes.

PBS 10X

El PBS 10X se prepara añadiendo solución 200 mM KH_2PO_4 a la solución 200mM Na_2P_04 hasta obtener un pH de 7,4.

Solución 200 mM Na_2P_04

7,1 g de Na_2P_04 en 250mL de agua de calidad HPLC. Se guarda a temperatura ambiente.

Solucinó 200mM KH_2PO_4

6,8 g de KH_2PO_4 en 250mL de agua de calidad HPLC. Se guarda a temperatura ambiente.

Solución 3M NaCl

Disolver 87,66 g de Na Cl en 400 mL de agua de calidad HPLC. Llevar hasta 500 mL en un una probeta. Puede permanecer a temperatura ambiente durante un año.

7.2.1.2 En células NG108-15

El protocolo de mantenimiento del cultivo de células NG108-15, línea celular resultante de la fusión de células N18TG2 (células de neuroblastoma de ratón) y células C6-BU-1 células de glioma de rata) en la presencia de virus Sendai inactivado, utilizado para el desarrollo de los experimentos de esta tesis doctoral es muy similar al de las células Neuro-2a. A continuación paso a describir los puntos diferentes entre ambos protocolos:

Preparación del medio de cultivo

Para este tipo celular se utiliza medio de cultivo DMEM (Sigma, D5671) (se guarda a 4°C), en formato líquido de 500 ml. Para preparar medio de cultivo al 10% de suero. Quitar de la botella de medio de 500 ml 64,5 ml para complementarlo con:

- 50 ml de suero (FBS: Iberlabo DE14-801F).
- 1 ml de solución Pyridoxine-HCL (2 g/ L). Se guarda a 4°C.
- 10 ml de solución L-glutamina (200 mM) (Innogenetics, 17-605F).

- 1 botella de HAT (resuspender con medio de cultivo) (Sigma, H0262). Se guarda a -20°C.
- 2,5 ml de solución antibiótica (10 mg/ ml de estreptomina y 1000 u/ ml de penicilina) (Innogenetics, 17-602E).

Solución Pyridoxine-HCL 2 g/ L

Se prepara mediante la disolución de 0,1 g Pyridoxine-HCL (Sigma, P6280) en 50 ml de agua de calidad HPLC. Una vez preparada se guarda a -20°C.

Resiembra de las células

Para este tipo celular no es necesario utilizar tripsina y por lo tanto el paso del lavado con PBS también se suprime. Con los golpecitos en el frasco y la aspiración y dispensación continua del medio nuevo sobre las células, es suficiente para la desadhesión y recuperación de las células del frasco.

7.2.2 Protocolo de exposición a células y lectura de viabilidad

7.2.2.1 Preparación de las placas de 96 pocillos

A partir de un frasco de 75 cm² de un cultivo celular aproximadamente al 90-100% de confluencia se preparan las placas de 96 pocillos para los ensayos de citotoxicidad:

- En una botella de vidrio se dispensan 18 ml de medio de cultivo 5% FBS por cada placa a preparar.
- Resuspender el contenido de un frasco de 75 cm² de células en 8 ml de medio de cultivo 5% FBS de la misma forma que en la resiembra de la cepa.
- Dispensar 2 ml de la resuspensión celular por cada placa a preparar en la botella de vidrio.
- Homogeneizar la solución.
- Dispensar 200 µL de la solución por pocillo excepto en los pocillos destinados al blanco (BLC).

El resultado son placas de aproximadamente 35 000 células/ pocillo para Neuro-2a y en el rango de 25 000 - 50 000 para NG108-15. Se realizan contajes de células vivas, mediante el uso de azul de tripano, cada vez que se preparan placas.

7.2.2.2 Exposición a las células

Todos los pocillos deben tener el mismo volumen final (230 μ L), añadimos solución inocua (medio de cultivo 5% FBS o PBS) para llegar a este volumen.

- Los pocillos de los bordes no se utilizan para los experimentos de citotoxicidad en ellos puede haber mayor variabilidad de resultados, se añaden 30 μ L de la solución inocua.
- Los pocillos control reciben también 30 μ L de la solución inocua.
- Los pocillos de los ensayos reciben X μ L del extracto o las toxinas resuspendidas en solución inocua y (30 - X) μ L de solución inocua.
- Durante el tiempo de exposición los pocillos BLC se quedan vacíos.

Para los ensayos con O/V

Se dan unos cambios en la preparación de la placa para la exposición de las células. Previamente a la dispensación del volumen de solución inocua, se dispensan 10 μ L de solución ouabaina y 10 μ L de solución veratridina en todos los pocillos en los que se va a realizar el ensayo, incluyendo los controles O/V +.

La preparación de la solución ouabaina y la solución veratridina, para cada experimento, se realiza a partir de la dilución de solución ouabaina 10 mM y de la solución veratridina 1mM o 10 mM en PBS.

Solución ouabaina 10 mM

La ouabaina de la casa comercial Fluka (Fluka, 75640) tiene un peso molecular de 728,77 y de 584,65 la de Sigma (Sigma, 464414). La ouabaina es muy sensible a la luz, en todo momento se debe proteger con recipientes adecuados.

La preparación de la solución de ouabaina se prepara mediante la disolución en agua de calidad HPLC. La solución debe ser totalmente transparente, sin precipitados, para ello debe sonicarse a 37°C durante aproximadamente 3-4 horas. Una vez preparada se guarda a 4°C.

Antes de la preparación de la dilución para cada grupo de ensayos, la solución de ouabaina 10 mM debe sonicarse durante un mínimo de una hora a 37°C para asegurar la solubilización total de la ouabaina en el agua.

Para Fluka, 250 mg de ouabaina se disolverán en 34,25 ml de agua. En el caso de Sigma, 250 mg de ouabaina se disolverán en 42,76 ml.

Siempre debe tenerse en cuenta que la actividad de la ouabaina disminuye a pH ácido.

Solución veratridina 1 y 10 mM

La veratridina tanto de la casa comercial Fluka (Fluka, 94838) como Sigma (Sigma, V5754) tienen un peso molecular de 673,79.

La solución de la veratridina debe hacerse en solución ácida (pH 2,0) mediante la dilución de agua de calidad HPLC y HCL 1 M. La disolución de la veratridina debe hacerse durante unos minutos con sonicación a 37°C.

En la preparación, hay que tener especial cuidado ya que el soluto de veratridina es muy volátil. Se disuelve el contenido total del frasco, ajustando el volumen a la concentración necesaria:

Para soluciones 1 mM, 50 mg de veratridina (Fluka o Sigma) se disuelven en 74,21 mL y en 7,4 mL para la solución 10 mM.

Las soluciones se guardan a -20°C.

7.2.2.3 Lectura de la viabilidad mediante el ensayo MTT

Una vez transcurrido el tiempo de exposición, se siguen los siguientes pasos:

- Eliminar el medio de los pocillos por sacudidas enérgicas (varias, rotando la placa, para eliminar todo el medio).
- Se exponen las células a 60 µl/ pocillo de una dilución de solución MTT en

medio de cultivo 5% FBS en relación 1:5, respectivamente. La solución preparada (protegida de la luz) debe homogeneizarse durante 10 minutos (no dejar mucho más tiempo, ya que se forman precipitados), a temperatura ambiente, antes de la exposición celular.

- Las placas con MTT se mantienen en el incubador durante un tiempo aproximado de 10 a 30 minutos según el tipo celular, número de células por placa, actividad de las mismas, etc. Es mejor controlar visualmente la reacción para que los controles sin tratamiento no lleguen a una absorbancia superior a 1.
- Una vez transcurrido el tiempo de exposición al MTT, el medio se elimina también mediante sacudidas enérgicas.
- Se añade en cada pocillo 100 µl de DMSO (Sigma, D4540) para solubilizar los cristales de formazán formados en el interior celular. Las placas deben agitarse (en un agitador de placas, preferiblemente) para homogeneizar la coloración del DMSO.
- La lectura de la absorbancia se realiza a 570 nm. La lectura de la absorbancia es proporcional a la viabilidad celular.

El DMSO y el MTT son tóxicos y deben recibir un tratamiento especial para su eliminación.

Solución MTT

La solución MTT se prepara a partir de un gramo de MTT en polvo (Sigma, M5655) disuelto en 200 ml de PBS para obtener una solución de 5 mg/ml. La mezcla se agita (mediante un agitador magnético) hasta su completa disolución a temperatura ambiente (puede tardar horas).

Se debe proteger de la luz. La solución se guarda a -20°C.

7.2.3 Protocolo de preparación del extracto de toxinas lipofílicas de mejillón y fraccionamiento por SPE en 17 fracciones.

7.2.3.1 Preparación del extracto bruto

La preparación del extracto bruto, se basa en el protocolo del bioensayo ratón para toxinas lipofílicas (Yasumoto et al., 1978).

El contenido de vianda de aproximadamente 2 kg de mejillón fresco de una muestra (mejillón recogido en una zona y momento determinado), se tritura (con trituradora tipo túrmix) y homogeniza. A partir de 7 g del homogenado inicial se realizan tres extracciones con acetona:

- Se le añaden 24 ml de acetona a los 7 g de vianda y se tritura en ultraturax durante 3 minutos.
- Centrifugación a 3000 rpm y 4°C durante 5 minutos.
- Recuperación del sobrenadante y filtración con filtro de 0,45 µm. Se reserva la primera extracción.
- Se recupera el pellet y se vuelve a añadir 24 ml de acetona, repitiendo la trituración en ultraturax, la centrifugación y la filtración, dos veces más.

El volumen del extracto obtenido (24 ml X 3 extracciones) se evapora en rotavapor al máximo, al menos hasta los 3 ml. Se disuelve el extracto en 11,67 ml de MeOH, para tener un equivalente final en la solución metanólica de 0,6 g de vianda equivalente/ ml. Se realiza partición líquido-líquido con 11,67 ml de hexano por triplicado, recuperando siempre la fracción metanólica (la capa inferior). Cada lavado con hexano se debe hacer agitando el recipiente, de forma enérgica, durante un minuto.

La solución metanólica se reduce en el rotavapor y finalmente se evapora a sequedad con flujo de nitrógeno a 40°C. Se disuelve el extracto seco en 11,67 ml de MeOH y se reserva a -20°C.

7.2.3.2 Fraccionamiento del extracto bruto mediante el protocolo de 17 fracciones definido en el artículo 4

El principio de este protocolo es el reparto de los componentes del extracto bruto de mayor a menor polaridad mediante un gradiente genérico acetonitrilo-agua en función de su afinidad hacia la fase estacionaria del cartucho (figura 23).

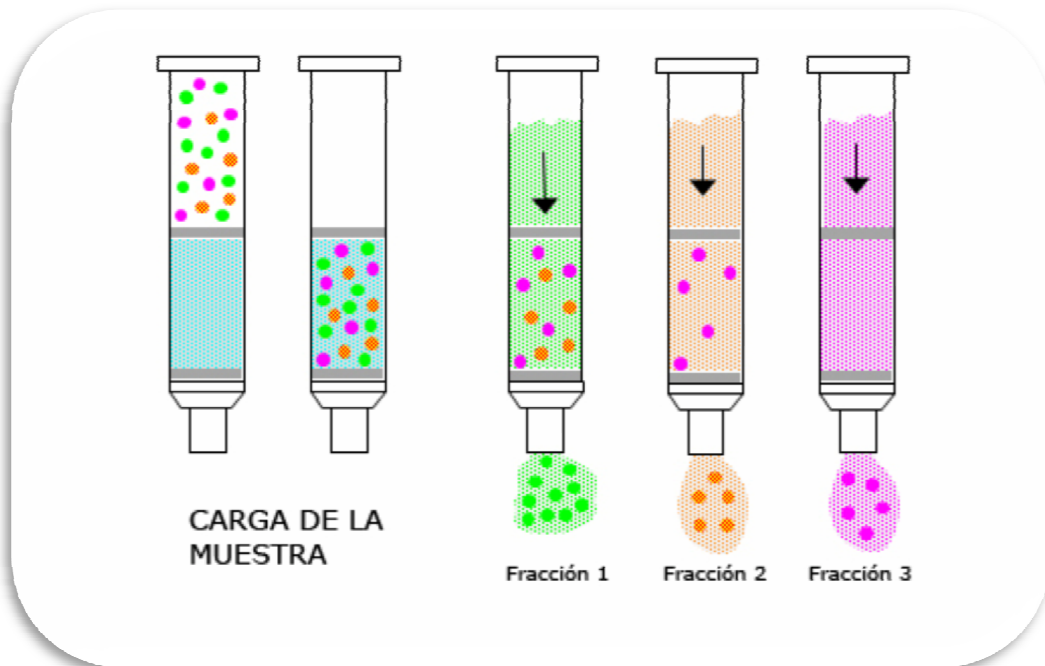


Figura 23: Esquema la elución de los diferentes componentes del extracto en el fraccionamiento. Primero se carga la muestra en el cartucho y a medida que se van utilizando diferentes proporciones de los las fases móviles A y B, van eluyendo los componentes del extracto en función de su polaridad.

En el fraccionamiento se utilizan:

- Disolventes de calidad HPLC: acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH).
- Agua ultrapura Milli-Q.
- Ácido acético (AcH).
- Fase móvil A: Agua con 0,1% AcH.
- Fase móvil B: ACN con 0,1% AcH.

Las disoluciones o mezclas de reactivos se filtran con filtros de membrana de 0,45 μm .

Para cada muestra se utiliza un nuevo cartucho C-18. Éste se acondiciona previamente con 6 ml de ACN puro, y previo a la carga de la muestra, se

acondiciona en la proporción de fase móvil A y B con la que se empieza el protocolo de fraccionamiento, 90% A y 10% B. El cartucho no debe quedarse nunca seco. Mediante el uso de un manifold se genera vacío, potenciando el paso de los solventes por el cartucho. Se debe controlar que el flujo sea lo más constante posible (a dos segundos por goteo, aproximadamente).

Una vez acondicionado el cartucho, éste se carga con la muestra: 90% A y 10% extracto bruto en MeOH, previamente mezclados. Esta carga corresponde a un equivalente de 768 mg de vianda.

Se preparan previamente las mezclas de solventes necesarios para cada fracción.

Al inicio de la carga de la mezcla de solventes de la fracción 1 se empieza a recoger la fracción número uno del extracto. Una vez cargados los 5 ml de la mezcla, se deja eluir hasta el inicio del filtro que protege la fase estacionaria del cartucho (ver figura 24).

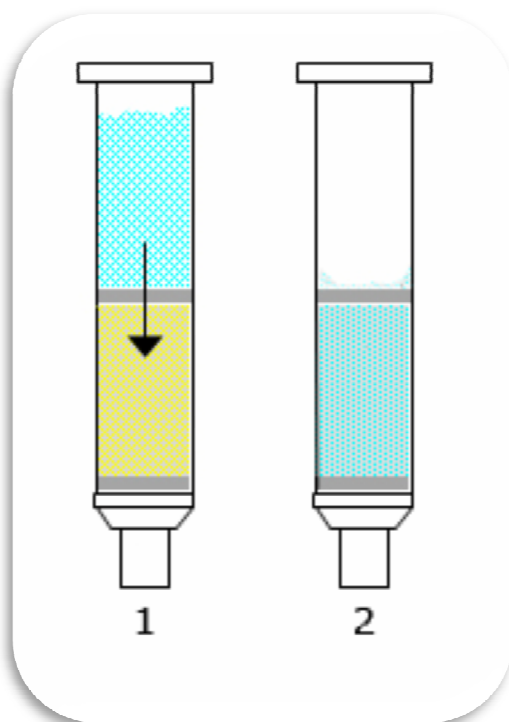


Figura 24: Carga y elución de los solventes en los fraccionamientos. En el cartucho 1, se muestra en azul la carga del solvente que eluye por el cartucho. En el cartucho 2, se muestra el punto en el que se para para la recolección de la fracción.

En este punto se para el flujo de elución y se carga el cartucho con la mezcla de solventes correspondiente a la siguiente fracción y se inicia la recolección de la

misma y así hasta llegar a eluir totalmente el contenido de la fracción número 17 . Los porcentajes de las mezclas de solventes en cada fracción están especificadas en la tabla 1 del artículo 4.

En cada fracción se recoge un total de 5 ml excepto en las fracciones 15, 16 y 17 en las que se recogen 6 ml. El volumen total recuperado para cada fracción corresponde a las moléculas afines a la fracción de un equivalente de 768 mg de vianda.

Para los ensayos de exposición a las células, se evapora (bajo flujo de nitrógeno, a 40°C) el volumen correspondiente a los mg equivalentes necesarios para cada exposición y sus réplicas. Se resuspenden en medio de cultivo 5% FBS para su exposición. El resto de las fracciones se conserva a -20°C.

Se debe prestar especial atención a la resuspensión total del extracto evaporado en el medio de cultivo, si no es suficiente el uso de un agitador convencional, se aplicará sonicación.

Nota: La evaporación de las fracciones más acuosas a 40°C, bajo flujo de nitrógeno puede tardar varias horas. El protocolo mejora si se dispone de un sistema de evaporación del tipo rotavapor para pequeños volúmenes, que combina modificación de la presión (genera vacío), aumento de la temperatura y rotación de la muestra sobre su recipiente.