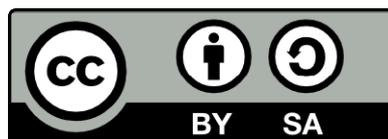




Optimización de ensayos celulares para la detección de toxinas marinas responsables de intoxicaciones alimentarias. Aplicación en extractos lipofílicos de muestras naturales de *Mytilus galloprovincialis*

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.**

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas de los experimentos relacionados con la optimización del modelo frente a toxinas purificadas se pueden resumir en los siguientes puntos:

- 1. La línea celular estable NG108-15 (neuroblastoma x glioma hybrid cells) da mejores resultados de sensibilidad que la línea Neuro-2a en la optimización de un CBA (Cell-Based Assay) para el rastreo de los diferentes grupos de toxinas responsables de intoxicaciones alimentarias.**
- 2. La reducción del tiempo de crecimiento del tapiz celular de 24 horas a 1 hora es una buena forma de reducir el tiempo del ensayo sin alterar de forma drástica la sensibilidad, capacidad de cuantificación y repetitividad del efecto tóxico de los principales grupos de toxinas marinas.**
- 3. El tiempo mínimo de uno de los ensayos que compongan el método debe tener un tiempo de exposición superior o igual a 48 horas para asegurar el correcto análisis toxicológico de las toxinas estudiadas. La comparación de los efectos tóxicos de una exposición a 24 horas y otra a 48 horas generará valiosa información cualitativa.**
- 4. En aquellos ensayos en los que los valores de toxicidad sean relativos al efecto de algún factor propio del ensayo (como el pre-tratamiento con ouabaina y veratridina en la detección de toxinas que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje), la cuantificación de los efectos tóxicos debe realizarse siempre mediante cuantificación de toxicidad relativa. Si se desea comparar ensayos o evaluar el propio ensayo, mejor tratar los datos de toxicidad de forma absoluta.**

- 5. En la optimización del ensayo con pre-tratamiento O/V (Ouabaina /Veratridina) para toxinas dependientes de VGSCs (Voltage Gated Sodium Channels), utilizando una línea celular determinada, se debe buscar la proporción de O/V más adecuada para esa línea celular e ir modificando las concentraciones de la dilución en función del ensayo o de la sensibilidad de las células en un momento determinado.**

- 6. Para aquellos grupos de toxinas en los que el CBA no es específico, la utilización de algunas condiciones como el ensayo O/V o la exposición a 48 horas sólo representan leves cambios en la sensibilidad de la respuesta.**

- 7. La repetitividad del efecto (entre diferentes días de experimentación) del OA (Okadaic Acid) en el CBA permite la generación de una curva patrón común para la cuantificación del efecto tóxico a 24 y 48 horas de exposición. Se tiene en cuenta, de esta manera, mayor número de componentes que afectan a la variabilidad de la estimación del efecto tóxico, y además, se reduce la cantidad de toxina necesaria para hacer las curvas patrón. No se obtuvo tal repetitividad para los ensayos con YTX (yessotoxin) ni con AZA-1 (azaspiracid-1).**

- 8. El tiempo de evaporación de la muestra (bajo las condiciones de este estudio) puede tener influencia en la variabilidad de respuesta que presenta el AZA-1 entre diferentes días de experimentación.**

Para el bloque de experimentos relacionados con la aplicación del método a muestras naturales, las conclusiones del trabajo se pueden resumir en los siguientes puntos:

- 9. La exposición del extracto acético de mejillón no permite detectar en el CBA optimizado los efectos tóxicos producidos por las**

concentraciones de las toxinas lipofílicas en los niveles regulados por la Unión Europea.

10. El fraccionamiento de extracto de mejillón en 60 fracciones en HPLC (High Performance Liquid Chromatography) previo a la exposición de las células en el CBA, minimiza los efectos matriz del extracto y permite detectar compuestos tóxicos. Si bien no parece un protocolo apropiado para su uso intensivo y sistemático en el rastreo de toxinas lipofílicas en muestras naturales.

11. El protocolo de 17 fracciones en SPE (Solid-Phase Extraction) optimizado para el rastreo de toxinas lipofílicas previo a la exposición de las células a 24 y 48 horas permite:

- La reducción de los efectos matriz de las muestras control hasta permitir la detección y semicuantificación del efecto tóxico de concentraciones de OA, DTX-1 (dinophysistoxin-1), PTX-2 (pectenotoxin-2), YTX y AZA-1 en el límite permitido por la legislación vigente.
- Generar unos valores de toxicidad cuantitativa y cualitativa que, en general, se pueden relacionar con los resultados obtenidos por MBA (mouse bioassay) y LC-MS/MS para las muestras naturales estudiadas. Este protocolo también puede poner en evidencia la existencia de otros compuestos bioactivos no identificados por LC-MS/MS, reforzando de esta manera la necesidad de la co-utilización de un método toxicológico, junto con el método LC-MS/MS en la sustitución del MBA.

12. Queda aún mucho trabajo en la optimización de un CBA (con otros grupos de toxinas, diferentes matrices, evaluar más muestras

naturales, etc) que permita la discriminación entre muestras positivas y negativas (en contenido de toxinas) que suponga un riesgo para la salud pública. Pero su uso como método toxicológico, con el apoyo de métodos de detección analítica y métodos funcionales, puede ser una de las opciones inmediatas más seguras en la sustitución del MBA en el análisis rutinario de productos de origen alimentario.