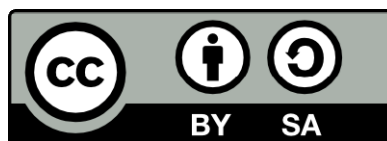




Optimización de ensayos celulares para la detección de toxinas marinas responsables de intoxicaciones alimentarias. Aplicación en extractos lipofílicos de muestras naturales de *Mytilus galloprovincialis*

Elisabet Cañete Ortiz



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

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

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



**UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA**

Departament de Biologia Cel·lular

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

Memoria presentada por

Elisabet Cañete Ortiz

Para optar al grado de

DOCTOR POR LA UNIVERSITAT DE BARCELONA

Tesis doctoral realizada bajo la dirección del **Dr. Jorge Diogène Fadini** y
tutorizada por **la Dra. Mercè Durfort i Coll**.

Programa de doctorado de Biologia Cel·lular. Bienio: 2004-2006.

El director

La tutora

La doctorante

Dr. Jorge Diogène Fadini

Dra. Mercè Durfort i Coll

Elisabet Cañete Ortiz

AGRADECIMIENTOS

Para ser justa debería agradecer que este trabajo se haya realizado a la ayuda de la suma de unos cuantos factores y de muchas personas. Espero no dejarme a nadie:

Yo, ni siquiera quería estudiar Biología, pero gracias a mis padres y a mi hermano, que me enseñaron desde pequeña que en la vida hay que labrarse un futuro pero siempre luchando por las ilusiones aunque eso suponga, a veces, un atentado a la estabilidad, así llegué a decidir tras una entrevista con Jorge, junto a mi padre, aparcados delante del centro, que aceptaría aquella beca doctoral. Aunque supusiera conducir tres horas diarias y aunque no me formara para un futuro trabajo bien remunerado y cerca de casa.

Gracias también a Gemma que fue fuente de motivación y me ayudó tanto a hacerme de taxista cuando no podía conducir como a escuchar cuando he necesitado hablar.

Gracias al equipo del Dr Robert W. Dickey del Gulf Coast Seafood Laboratory, FDA, en Alabama. Ellos me acogieron rápidamente como a un miembro más de su pequeña familia y me ayudaron a volver a ver la luz al final del túnel.

Gracias a Allisson. La colaboración con Chile me trajo de regalo una buena amiga. Gracias por tu apoyo.

Gracias a mis compañeros de investigación: Amandine, Elena Mallat, Mònica, Pablo, Gemma, Marga y Laurence. He aprendido y disfrutado como una enana con vosotros, gracias.

Gracias a todos los compañeros del Centre de Sant Carles de la Ràpita del IRTA y en especial a los de la SMM: Laura, Cristina, Núria, Vanessa, Esther y Josep Maria. Creo que no existe un lugar más cálido para ser doctorante y la naturaleza de las personas que lo componen es el que hace posible ese ambiente. Capi, gràcies per les converses i les experiències viscudes a les sortides a la mar.

Por supuesto, tengo que agradecer a Jorge la paciencia que ha tenido conmigo. Sé que el camino ha sido largo y duro en algunas ocasiones, pero te doy las gracias por haberme dado la oportunidad de hacer el tipo de doctorado que siempre había querido hacer.

Tengo que dar las gracias también al Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) por la financiación de mi beca/contrato y por dejarme hacer uso de las instalaciones del Centre de Sant Carles de la Ràpita bajo la dirección de la Dra Dolors Furones.

Me queda ya agradecer el apoyo moral y, por qué no, algún que otro tironcillo de orejas, para que no me durmiera en los laureles, de buenos amigos como Corbi, Cristina, Maria, Marta, Irene, Virginia e Isaias, Ana Rojo... del resto de mi familia y familia política y de los actuales amigos y compañeros del PEBC.

Pero sin duda alguna, aquel que ha tenido que apretarse el cinturón para que yo cumpliera ese sueño, el que ha aguantado todos los bajos momentos, el que me ha dado empujoncitos cada vez que insinuaba que quizás no debía seguir...A Edu, es a quien más tengo que agradecer. Gracias.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	2
1.1	Generalidades sobre las toxinas marinas de origen fitoplanctónico	2
1.2	Distribución geográfica.....	17
1.3	Problemática de las toxinas marinas en el ámbito agroalimentario.....	19
1.3.1	Sistemas de detección y cuantificación en alimentos. Legislación vigente	19
1.3.2	Métodos alternativos al bioensayo ratón en el ámbito de la detección de biotoxinas marinas	23
1.4	Utilización de los CBAs en el ámbito de las toxinas marinas	24
1.4.1	Tipos celulares utilizados.....	25
1.4.2	Variables en la evaluación de la toxicidad	26
1.4.3	Utilización de agonistas o antagonistas	27
1.4.4	Tiempos de exposición	30
1.4.5	Los CBAs como herramienta toxicológica de detección y cuantificación de toxinas marinas.....	30
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo general.....	34
2.2	Objetivos concretos	35
3	PUBLICACIONES	36
3.1	Artículo 1	36
3.2	Artículo 2	48
3.3	Artículo 3	60
3.4	Artículo 4	68
3.5	Artículo 5	80
4	DISCUSIÓN.....	110
4.1	Consideraciones generales.....	110
4.1.1	La optimización del método	110
4.2	Respuesta del CBA frente a toxinas purificadas (artículo1 y artículo 2) ..	112
4.2.1	Parámetros utilizados en la evaluación del CBA como método toxicológico.....	112
4.2.2	El tipo celular.....	113
4.2.3	Reducción del tiempo del ensayo.....	114
4.2.4	Pre-tratamiento de O/V para las toxinas que actúan sobre VGSCs ..	116
4.2.5	Reducción de la variabilidad en la cuantificación del efecto tóxico ...	124

4.3	Respuesta del CBA frente a toxinas en muestras naturales (artículo 3, artículo 4 y artículo 5)	127
4.3.1	Cálculos de la cantidad de mg equivalentes de vianda idónea para la cuantificación en CBA	127
4.3.2	Eliminación de los efectos tóxicos de la matriz que interfieren en la evaluación de la muestra (artículo 3 y 4)	128
4.3.3	Optimización del método para la detección y la semicuantificación en rutina	130
4.4	Resumen de las aportaciones científico-técnicas de este trabajo	140
4.4.1	Seguridad en la detección de toxinas	140
4.4.2	Optimización del protocolo para su práctico uso en rastreo	141
4.5	Principales puntos futuros de estudio para el desarrollo completo del método.....	143
5	CONCLUSIONES.....	146
6	REFERENCIAS.....	150
7	APÉNDICES	162
7.1	Informe del director.....	162
7.2	Material y métodos.....	166
7.2.1	Protocolo de mantenimiento celular	166
7.2.2	Protocolo de exposición a células y lectura de viabilidad.....	169
7.2.3	Protocolo de preparación del extracto de toxinas lipofílicas de mejillón y fraccionamiento por SPE en 17 fracciones.....	173