

## Daño celular por fuerzas de corte en cultivos de dinoflagelados tóxicos

Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, M<sup>a</sup> Carmen Cerón,  
El Hassan Belarbi, Francisco García\* y Emilio Molina  
*Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería; 04120 Almería*  
\* [fgarcia@ual.es](mailto:fgarcia@ual.es); Tel. 950015303

### Resumen

La sensibilidad celular a las fuerzas de corte es el principal obstáculo para el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos con fines comerciales. En el presente trabajo se propone un protocolo para determinar umbrales de daño por fuerzas de corte asociadas a turbulencia continua e intermitente en cultivos de dinoflagelados tóxicos. El dinoflagelado modelo ha sido *Protoceratium reticulatum*. Esta especie ha resultado ser extraordinariamente frágil, mucho más que otras líneas celulares que hasta ahora eran considerados los más sensibles a fuerzas de corte, como los eritrocitos.

### Introducción

Los dinoflagelados tóxicos, además de ser fuente de toxinas para la elaboración de estándares, producen metabolitos bioactivos únicos con actividades diversas, desde antibióticos hasta moléculas con fuerte actividad anticancerígena. Por éstas, y otras razones, han atraído la atención de un gran número de investigadores en diferentes campos [1].

Los avances en investigaciones médicas, farmacológicas y en el desarrollo de métodos analíticos fiables requieren de la provisión de toxinas puras en cantidad y calidad suficiente. Sin embargo, sólo unas pocas están disponibles comercialmente, con precios muy elevados y calidad desigual.

Los intentos de cultivar masivamente dinoflagelados en biorreactores convencionales para satisfacer el notable aumento de la demanda de biotoxinas no han tenido demasiado éxito, entre otras razones, por la alta sensibilidad de éstos a las fuerzas de corte [2-6]. Todas las especies estudiadas son extremadamente sensibles a la agitación, aunque no comparten un mismo umbral de daño [5]. Otros efectos relacionados con el daño celular por fuerzas de corte son alteraciones del ciclo celular y producción de peróxidos.

Estudios previos han revelado que el nivel de daño parece depender de la esfuerzo cortante promedio, de la duración del periodo agitado y del momento del día en el que se introduce dicha agitación [7-9]. Sin embargo, dichos estudios se diseñaron con fines medioambientales y no ingenieriles. Para salvar esta distancia, en este trabajo se ha elaborado un protocolo de cultivo que nos permite valorar las posibilidades de una cepa para ser

cultivada masivamente. A través de la alteración de factores tales como estrés de corte, tiempos de ciclo de exposición a la turbulencia y fracción de tiempo de exposición, se pueden estudiar los mecanismos de inhibición del crecimiento por fuerzas de corte y detectar umbrales de estrés en dinoflagelados.

### **Materiales y métodos**

La especie cultivada fue *P. reticulatum* GG1AM, amablemente cedida por el Dr. Franco del Centro Oceanográfico de Vigo. Los cultivos se realizaron en matraces erlenmeyer dispuestos sobre un agitador orbital, usando medio de cultivo L1, ciclos luz-oscuridad 12:12 y temperatura de 18 °C. En la Tabla 1 se recogen las condiciones del diseño experimental. La evolución de la población celular fue seguida a través de medidas diarias de concentración celular. Una vez detectado el umbral de daño se realizaron ensayos siguiendo el diámetro celular promedio, viabilidad y actividad esterasa y auto-fluorescencia por citometría de flujo. En cultivos expuestos a estrés promedio inhibitorio (no letal), se analizó el ciclo celular en mitad de la fase exponencial, utilizando yoduro de propidio tras un tratamiento previo de 30 minutos con RNasaH ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los resultados fueron analizados y compensados mediante FlowJo software (Tree star, Ashland, Oregon). Así mismo, para dicho ensayo se cuantificaron el contenido en yessotoxinas y en lipoperóxidos en células una vez alcanzada la fase estacionaria.

### **Resultados y Discusión**

La Fig. 1 ilustra los datos de velocidad específica de crecimiento relativos al cultivo control no agitado en función de la velocidad de corte promedio aplicada a la suspensión celular. El umbral de daño para esta especie estaría alrededor de  $0.1 \text{ s}^{-1}$ . Este valor es varios órdenes de magnitud inferior a los valores mínimos de estrés de corte existentes en fotobio-reactores convencionales (ver Fig. 1).

Los ensayos C7 a C14 de la Tabla 1 se realizaron al mismo estrés promedio pero diferente régimen de turbulencia. Se registraron valores muy diferentes de la velocidad específica de crecimiento relativa. Las Figs. 2 y 3, para estos cultivos, muestran la influencia que la frecuencia de agitación y el periodo (día o noche) pueden tener cuando los cultivos son expuestos a fuerzas de corte inhibitorias. Claramente, la agitación durante el periodo nocturno tuvo un efecto más nocivo sobre el crecimiento que cuando ésta se aplicaba durante el periodo luminoso.

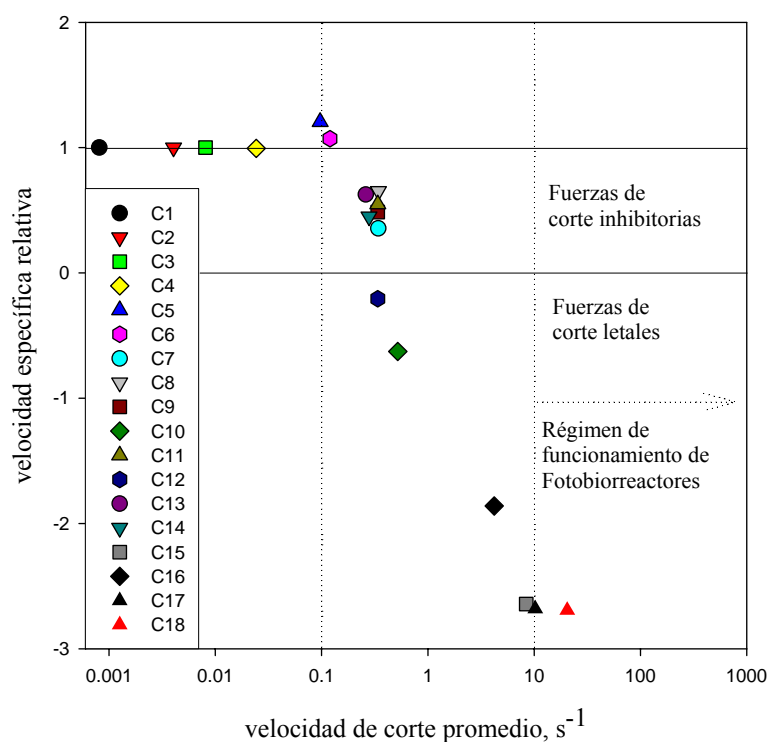


Figura 1.-Efecto de la velocidad de corte promedio sobre el crecimiento de *P. reticulatum*, expresado como la velocidad específica de crecimiento relativa a un cultivo control no agitado.

Ensayo	Características del régimen de agitación					
	t	t <sub>e</sub>	t	N <sup>o</sup>	*Fas	Re
C1	0	0.9	1	12	L	9934
C2	0	0.9	1	12	L	9934
C3	0	0.8	1	12	L	9934
C4	0	0.5	1	12	L	9934
C5	2	0	2	1	LO	9934
C6	2	0	2	1	LO	9934
C7	6	6	1	2	LO	1986
C8	1	1	2	12	LO	1986
C9	0	0.5	1	24	LO	1986
C10	1	1	2	12	LO	1986
C11	1	12	2	1	L	1986
C12	1	12	2	1	O	1986
C13	1	1	2	6	L	1986
C14	1	1	2	12	LO	1586
C15	2	0	2	1	LO	3973
C16	1	1	2	12	LO	3973
C17	1	1	2	12	LO	6510
C18	2	0	2	1	LO	6510

\*L= luz; O=oscuridad; LO=luz y oscuridad

Tabla 1. Condiciones experimentales de los ensayos realizados. (t<sub>c</sub>=t<sub>a</sub>+t<sub>e</sub>, tiempo de ciclo de la turbulencia; t<sub>a</sub>=periodo de turbulencia en el ciclo; t<sub>e</sub>=periodo de reposo en el ciclo).

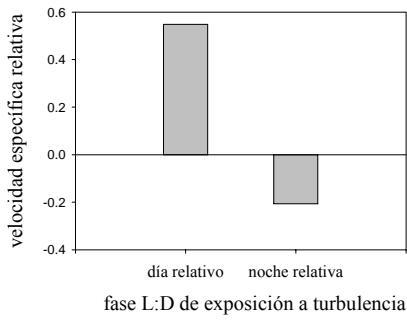


Figura 2.-Influencia de la agitación en diferentes fases del periodo L:D.

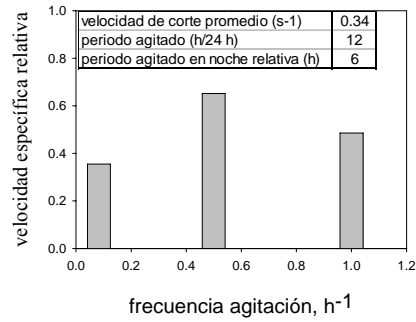


Figura 3.-Influencia de la frecuencia de agitación.

La Fig. 4 resume el efecto de las fuerzas de corte inhibitorias (no letales) sobre el ciclo celular en relación a un cultivo control estático. Puede observarse que en el cultivo agitado la fracción de células en fase S fue considerablemente mayor desde las 19:00 h hasta las 9:00 h del día siguiente. Sin embargo, esto no se tradujo en un aumento en el número de células respecto del control. Sino todo lo contrario, la fracción de células en fase G2/M fue mayor en el control desde las 3:00 h a las 9:00 h.

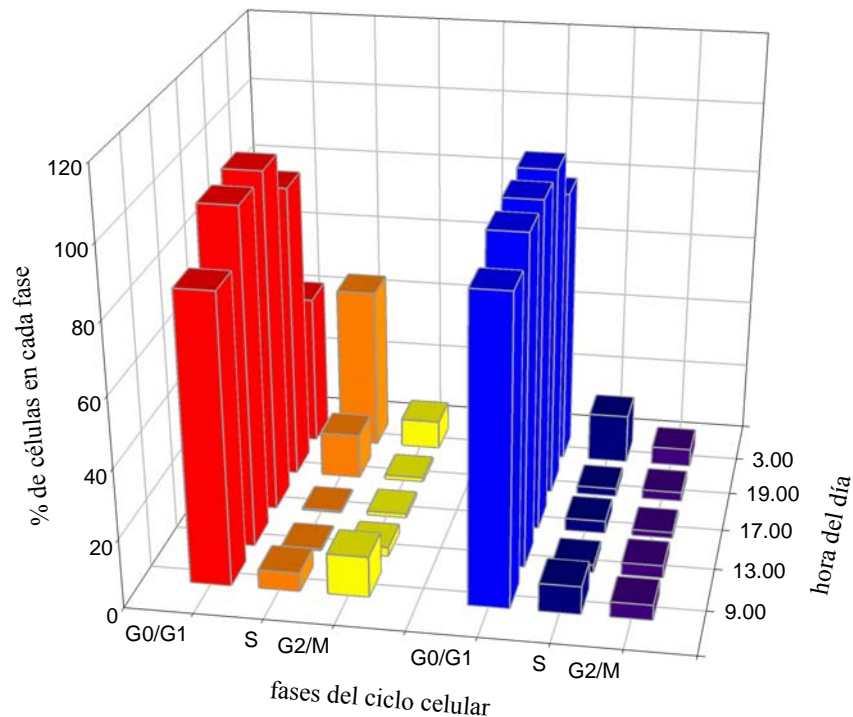


Figura 4.-Efecto de un nivel de turbulencia inhibitoria del crecimiento sobre el ciclo celular de *P. reticulatum*.

La progresión en el ciclo celular de los dinoflagelados está parcialmente ligada al reloj circadiano. De esta manera, las células que han completado ciertos requerimientos previos y pueden progresar en el ciclo celular comenzarán la fase de síntesis al final de la fase luminosa. La mitosis se producirá en un periodo que comprende las últimas horas de oscuridad y las primeras de luz. La agitación durante la fase oscura produce un daño mucho más acusado (ver Fig. 2). Esto es consistente con los datos publicados por Juhl [8], que encontró mayor sensibilidad en los periodos cercanos a la división celular. También Pollinger y Zemel [9] produjeron inhibición agitando durante las 2 últimas horas de la fase oscura y no observaron efecto trasladando la agitación a la fase luminosa. Sin duda, las fases más sensibles a las fuerzas de corte son las que preceden la mitosis. El daño estructural que sufre una célula en un momento cercano a la división es claramente mayor porque su volumen es mayor y porque la conformación de la membrana celular está alterándose para permitir la escisión en dos células. Sin embargo, los mecanismos de daño a través de la alteración del ciclo celular son más complejos. En la Figura 5 se han representado los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular relativos a cultivos control estáticos. Lo que se observa para la 2ª hora de luz es un aumento de células en fase S para los cultivos agitados, que es, además, proporcional a la extensión del periodo agitado a todo el ciclo L:D (el estrés promedio es el mismo). Yeung y Wong [11], con *H. triquetra* y *C. cohnii*, encontraron detención de la progresión del ciclo en fase G1 tras introducir agitación continua. Por tanto, es probable que exista algún punto de restricción en G1 que se mantenga como resultado de las fuerzas de corte.

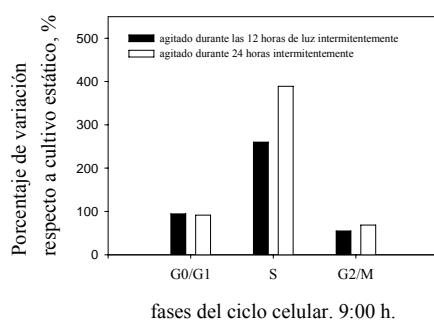


Figura 5.- Porcentaje de variación de fases del ciclo celular para cultivos sometidos a agitación

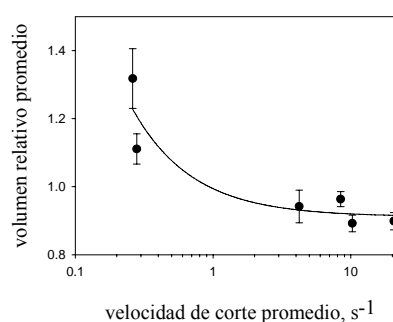


Figura 6.-Biovolumen relativo para diferentes intensidades de agitación

En nuestros ensayos, con agitación intermitente, la progresión en el ciclo continuaba, observándose una alteración en el porcentaje de células en fase S. Por otro lado, si como hemos argumentado, las células que están a punto de dividirse son más sensibles a las fuerzas hidrodinámicas, y se rompen antes de completar la mitosis, es improbable observar una posible detención en G2/M. El daño estructural y la mecano-transducción como resultado de las fuerzas de corte tendrán, probablemente, efecto sobre los

diferentes puntos de restricción del ciclo celular de los dinoflagelados, a tenor de los datos referenciados y los aquí expuestos.

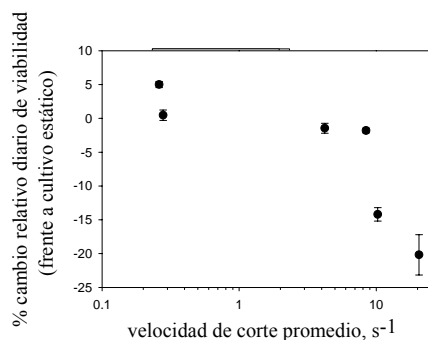


Figura 7.- Cambio relativo en la viabilidad celular para diferentes intensidades de agitación.

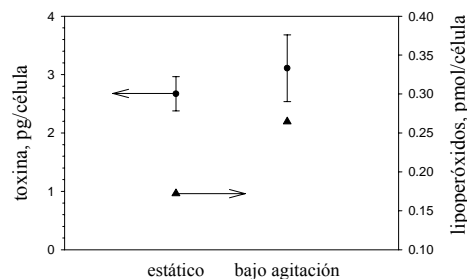


Figura 8.- Contenido de yessotoxina y lipoperóxidos por célula para cultivo estático y agitado

Las Figs. 6 y 7 muestran los cambios relativos en tamaño y viabilidad para cultivos sometidos a diferentes intensidades de agitación. Hasta aproximadamente  $1 \text{ s}^{-1}$  se observa aumento del biovolumen y de viabilidad respecto al cultivo estático. A partir de este punto se registra disminución del biovolumen relativo y de viabilidad con el aumento de la fuerza de corte promedio. Está referenciado [2-5] un aumento de volumen para células de dinoflagelados sometidas a fuerzas de corte. La pérdida de viabilidad no había sido referenciada antes. Al sobrepasar cierto umbral (en este caso  $1 \text{ s}^{-1}$ ) la rotura de células es más acusada, siendo más proclives las de mayor volumen. Esto explicaría la disminución de tamaño en los agitados. Además, el estrés oxidativo y el consiguiente desencadenamiento de procesos de apoptosis podrían acelerarse al aumentar la energía hidrodinámica disipada ya que existe para dichos niveles de agitación (por encima del  $1 \text{ s}^{-1}$ ) pérdida de viabilidad celular. Prueba de la aparición de estrés oxidativo es el aumento en el contenido de lipoperóxidos en los cultivos estresados fluidodinámicamente. En este sentido, los resultados de la Fig. 8, obtenidos con fuerzas de corte inhibitorias, muestran un aumento tanto del contenido de lipoperóxidos como de toxinas respecto al cultivo control.

### Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. José M. Franco y Dra. Beatriz Paz, del Centro Oceanográfico de Vigo, y a los Profesores Manuel Norte y J. Javier Fernández, del Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, por su inestimable ayuda en esta tarea del desarrollo de Bioprocesos relacionados con el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos para la producción de toxinas. Esta investigación está siendo financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-07924-C04-04), España.

### Referencias

- [1] Camacho, F.G., J.G. Rodríguez, A.S. Mirón, M.C.C. García, E.H. Belarbi, Y. Chisti, E.M. Grima. 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates, *Biotechnology Advances*. 25:176-194.
- [2] Berdalet, E., M. Estrada. 1993. Effects of turbulence on several dinoflagellate species. Elsevier Science Publishers B.V. 737-739.
- [3] Juhl, A.R., M.I. Latz. 2000. Effect of growth conditions on flow-induced inhibition of population growth of a red-tide dinoflagellate. *Limnology and Oceanography*. 45:905-915.
- [4] Juhl, A.R., V.L. Trainer, M.I. Latz. 2001. Effect of fluid shear and irradiance on population growth and cellular toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnology and Oceanography*. 46:758-764.
- [5] Sullivan, J.M., E. Swift. 2003. Effects of small-scale turbulence on net growth rate and size of ten species of marine dinoflagellates. *Journal of Phycology*. 39:83-94.
- [6] Thomas, W.H., C.H. Gibson. 1990. Quantified small-scale turbulence inhibits a red tide dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra* Stein. *Deep-Sea Research*. 37:1583-1593.
- [7] Berdalet, E. 1992. Effects of turbulence on the marine dinoflagellate *Gymnodinium nelsonii*. *Journal of Phycology*. 28:267-272.
- [8] Juhl, A.R., M.I. Latz. 2002. Mechanisms of fluid shear-induced inhibition of population growth in a red-tide dinoflagellate. *Journal of Phycology*. 38:683-694.
- [9] Pollinger, U., E. Zemel. 1981. In situ and experimental-evidence of the influence of turbulence on cell-division processes of *Peridinium-Cinctum* Forma Westii (Lemm) Lefevre. *British Phycological Journal*. 16:281-287.
- [10] Paz, B., J.A. Vázquez, P. Riobó, J.M. Franco. 2006. Study of the effect of temperature, irradiance and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. *Mar. Environ. Res.* 62:286-300.
- [11] Yeung, P.K.K., J.T.Y. Wong. 2003. Inhibition of cell proliferation by mechanical agitation involves transient cell cycle arrest at G1 phase in dinoflagellates. *Protoplasma*. 220:173-178.