

Estudio de la sensibilidad de las células de neuroblastoma Neuro-2a a estándares de toxinas marinas

Elisabeth Cañete, Amandine Caillaud y Jorge Diogène
*Centre d'Aquicultura, IRTA,
Ctra Poble Nou s/n, 4340 Sant Carles de la Rapita. Tarragona*

Resumen

Los métodos de detección de toxinas marinas basados en el estudio del efecto tóxico en cultivos celulares aportan información relevante respecto a la actividad tóxica de las toxinas y eventualmente contribuyen a describir su mecanismo de acción. Al igual que todas las metodologías de detección de toxinas, los ensayos de citotoxicidad necesitan de validaciones para convertirse en métodos de uso convencional. En éste trabajo abordamos la respuesta de células Neuro-2a (ATCC, CCL131) frente a diferentes estándares de toxinas marinas utilizando un método dependiente de ouabaina y veratridina (O/V). Este modelo celular, rico en canales de sodio, es un modelo habitualmente empleado para estudios de toxinas que actúan sobre estos canales. Con el fin de estudiar su aplicabilidad a otras toxinas, hemos realizado un estudio multi-toxínico. En las condiciones utilizadas en presencia de O/V se obtuvieron EC50s de 8,6 nM para la saxitoxina (bloqueadora de canales de sodio), 8,2 nM para la brevetoxina-3 y 36,9 nM para la brevetoxina-2 (activadoras de canales de sodio). Entre las toxinas que no actúan sobre canales de sodio, se produjo mortalidad en las células Neuro-2a sin tratamiento previo con O/V de forma dosis-dependiente, obteniéndose las siguientes EC50s: palitoxina 0,1nM, pectenotoxina-2 28,3 nM, ácido okadaico 21,9 nM y dinophysistoxina-1 20,6 nM. El ácido domoico no produjo mortalidad en las células Neuro-2a con o sin O/V. El modelo Neuro-2a se configura como una estrategia potente para el estudio de un amplio espectro de toxinas marinas.

Introducción

La necesidad de utilizar modelos biológicos bajo condiciones controladas en la detección de toxinas marinas junto a la presión por reducir la experimentación animal favorece la utilización de cultivos celulares como modelos para estudiar las toxinas marinas presentes en el fitoplancton o en los bivalvos. Muchos tipos celulares se han utilizado hasta el momento tanto en el estudio de la detección tóxica como en el estudio de los mecanismos de acción de dichas toxinas [1]. Uno de los sistemas más robustos utilizados hasta el momento en el estudio citotóxico de toxinas que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje ("Voltaje gated sodium channels", VGSC) tiene como herramientas el cultivo de células de neuroblastoma Neuro-2a [2,3,4] y el estudio de la viabilidad de estas células, tras la exposición de las toxinas, mediante el ensayo MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, Sigma] [4].

En éste estudio se ha evaluado el potencial citotóxico de 8 toxinas (ácido okadaico, dinophysistoxina-1, pectenotoxina-2, palytoxina, ácido domoico, saxitoxina, brevetoxina-2 y brevetoxina-3) sobre la viabilidad celular de células de neuroblastoma Neuro-2a para establecer la sensibilidad de este método de detección a cada una de ellas. La detección de la toxicidad tanto del ácido okadaico como de la dinophysistoxina-1 (toxinas inhibitoras de fosfatasas) en una gran variedad de tipos celulares permite gran plasticidad en la elección del tipo celular escogido para su estudio citotóxico. Sin embargo, las toxinas que actúan sobre canales VGSC dependen de tipos celulares que presenten estos canales, como son los cultivos de células de neuroblastoma Neuro-2a. Las exposiciones de las células a las toxinas se realizan con y sin tratamiento previo de ouabaina y veratridina (OV). La veratridina aumenta el flujo del sodio hacia el interior de la célula a través de los canales de sodio de la membrana y un inhibidor de la bomba sodio potasio (ouabaina) impide que la célula contrareste el efecto de la veratridina.

Material y métodos

Cultivo de las células Neuro-2. Las células de neuroblastoma, Neuro-2a (ATCC, CCL131), se mantienen en cultivo con RPMI al 10% de FBS a una temperatura de 37°C y a 5,0% de CO₂. El medio de cultivo RPMI es de Sigma y se suplementa con 1% de solución de piruvato de sodio (100 mM), 1% de solución L-glutamina (200 mM) y 0,5% de solución antibiótica (10 mg mL⁻¹ de estreptomycin y 1.000 u mL⁻¹ de penicilina). Para la resiembra de las células se utiliza solución tripsina (diluida con PBS hasta 0,5g L⁻¹).

Para los ensayos de viabilidad celular se utilizan placas de 96 pocillos, con medio de cultivo RPMI al 5% de FBS con aproximadamente 30.000 células por pocillo. La placa puede ser utilizada a las 24 horas de su preparación.

Exposición de las toxinas y evaluación de los efectos tóxicos. Para la exposición de los extractos a los cultivos celulares, éstos se deben evaporar con flujo de nitrógeno y con calor. El extracto evaporado se resuspende en medio de cultivo al 5% de FBS y se dosifica en los pocillos correspondientes. A partir de la dosis más concentrada se preparan las 8 dosis (dilución 1:2) y se dispensan tres pocillos por dosis (tres réplicas).

Cultivos celulares control y células pretratadas (minutos antes de la exposición a la toxina a estudiar) con ouabaina y veratridina son expuestas a las toxinas. Las concentraciones de ouabaina y de veratridina empleadas (10:1) son escogidas para producir mortalidad en aproximadamente el 80% (0,3 mM ouabaina, 0,03 mM veratridina) para toxinas bloqueadoras de canales VGSC (saxitoxina) o el 20% (0,1 mM ouabaina, 0,01 mM veratridina) para toxinas activadoras del canal de sodio (brevetoxina 2 y 3) y para el resto de toxinas estudiadas.

La evaluación de los efectos tóxicos se hará mediante la lectura de la viabilidad celular con el ensayo MTT.

El análisis de las curvas dosis-respuesta se realiza con el software Prism 4 (GraphPad, San Diego, California, USA).

Toxinas. Las toxinas utilizadas para el estudio son: ácido okadaico (AO) (Sigma); saxitoxina (STX), pectenotoxina 2 (PTX2) y ácido domoico (NRC-CNRC); brevetoxina 2 (PbTx-2) y brevetoxina 3 (PbTx-3) (Calbiochem); dinophysistoxina 1 (DTX-1) y palytoxina (Wako).

Resultados y discusión

La STX, toxina bloqueadora del canal de sodio, contrarresta el efecto tóxico de O/V (a dosis letales de O/V del 80 % de la población) a una concentración efectiva del 50% (EC50) en 8,6 nM (Tabla 1). En células sin tratamiento previo con O/V no dan respuesta a las mismas concentraciones de STX (Figura1).

TOXINA	SIN O/V		CON O/V	
	EC50	Error tipo	EC50	Error tipo
Saxitoxina	No efecto	No efecto	8,6	4,08
Ácido domoico	No efecto	No efecto	No efecto	No efecto
Brevetoxina 2	No efecto	No efecto	36,9	5,34
Brevetoxina 3	No efecto	No efecto	8,2	12,28
Pectenotoxina 2	28,3	3,37	17,4	11,43
Palytoxina	0,1	3,95	0,04	4,32
Ácido okadaico	21,9	2,12	8,8	3,11
Dinophysistoxina 1	20,6	3,49	23,1	9,77

Tabla 1. Resumen de las EC50 calculadas a partir de células N2a expuestas a los seis estándares de toxinas estudiadas con y sin la utilización de ouabaina y veratridina tras 24 horas de exposición.

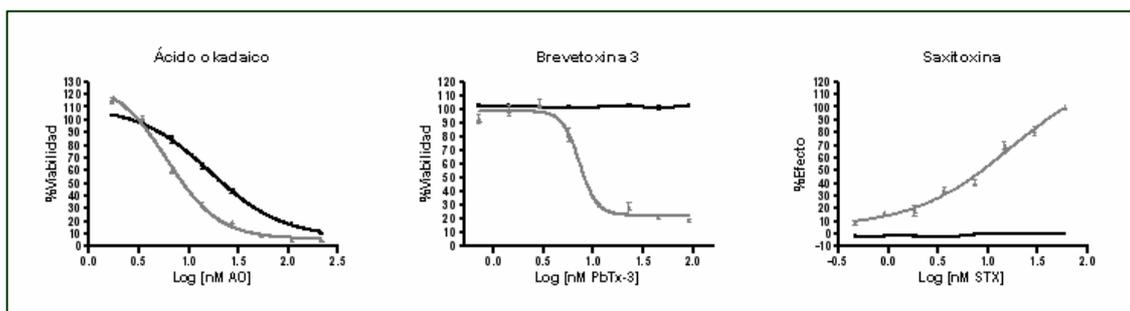


Figura 1. Ejemplo de curvas dosis-respuesta en células N2a expuestas a ácido okadaico, Brevetoxina 3 y saxitoxina con (gris) y sin (negro) la utilización de ouabaina y veratridina tras 24 horas de exposición. Tres réplicas por dosis en placas de 96 pocillos a una densidad celular aproximada a 30.000 células por pocillo.

Las concentraciones de AD utilizadas en el experimento, determinadas en base a estudios sobre cultivos primarios de células procedentes de hipocampo de rata [5], no producen efectos sobre la viabilidad de las células con o sin tratamiento previo con O/V. El ácido domoico es un análogo del neurotransmisor glutamato y compiten por el mismo receptor de membrana [6], por lo que era de esperar que el ensayo que trata de sensibilizar las células frente a toxinas que actúen sobre canales de sodio (ensayo O/V), no tuviera repercusión sobre el efecto del AD en éstas células. De forma a determinar el potencial tóxico del AD a nivel celular, el modelo escogido deberá disponer de canales de membrana específicos [7] y los sistemas de detección deberán adaptarse a los cambios producidos en las células tras la exposición tóxica (detección de la movilidad de calcio intracelular o del cambio de potencial de membrana).

Las toxinas activadoras del canal de sodio PbTx-2 y 3 tienen capacidad de matar células pretratadas con O/V con una respuesta dosis-dependiente (Fig.1). Para este tipo celular la PbTx-3 tiene mayor potencia tóxica (EC50: 8,2 nM) que la PbTx-2 (EC50: 36,9 nM) (Tabla1).

La Palytoxina se sabe que afecta al equilibrio iónico celular, aumentando la permeabilidad de la célula para el Na⁺ y el K⁺ pero no para el Ca²⁺, pero en altas concentraciones (100 nM) inhibe la Na⁺, K⁺-ATPasa [9]. Las curvas dosis-respuesta obtenidas en éste experimento determinan que las células son sensibles a bajas concentraciones de esta toxina tanto para células no tratadas con O/V con una EC50 de 0,1 nM que se reduce a 0,04 nM si se tratan previamente las células con O/V (Tabla1). El equilibrio iónico celular se ha desestabilizado con la presencia de la ouabaina y de la veratridina y como consecuencia la respuesta citotóxica de la palytoxina aumenta. En el caso de la PTX2 y del AO la concentración a la que se presenta el 50% del efecto tóxico sin O/V es de aproximadamente 10 nmoles L⁻¹ superior que para las células previamente tratadas con O/V. Las EC50's obtenidas para células sin tratamiento con O/V para la PTX2 y el AO son de 28,3 nM y 21,9 nM respectivamente (Tabla 1).

En las curvas dosis-respuesta de la DTX-1 se obtiene una similar EC50 para células con y sin tratamiento previo de O/V con EC50's de 23,1 y 20,6 nM respectivamente (Tabla1).

Con este trabajo quedan definidas las limitaciones del sistema frente a las toxinas estudiadas para su posterior aplicación en muestras procedentes de extractos de bivalvos o de fitoplancton tóxico. La utilización de este método en la detección de toxicidad de muestras problema parece ser una buena alternativa al bioensayo ratón debido a la sencillez, rapidez y sensibilidad del ensayo a excepción de las muestras que presenten AD.

Agradecimientos

Al equipo de R.W. Dickey en el Gulf Coast Seafood Laboratory del FDA (Alabama, U.S.A).

Bibliografía

- [1] Sar, E.A., M.E. Ferrario, B. Reguera. 2002. Ensayos *in vivo* e *in vitro* para la detección de toxinas. En: E.A. Sar, Ferrario M.E. y Reguera B. (Eds.). *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía. Capítulo 3.
- [2] Jellett J.F., L.J. Marks, J.E. Stewart, M.L. Dorey, W. Watson-Wright, J.F. Lawrence. 1992. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: Automated endpoint determination and standardization of the *in vitro* tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay. *Toxicon*. 30:1143-1156.
- [3] Kogure K., M.L. Tamplin, U. Simidu, R.R. Colwell. 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon*. 26:191-197.
- [4] Manger R.L., S. Leja, S.Y. Lee, J.M. Hungerford, M.M. Wekell 1993. Tetrazolium-Based Cell Bioassay for Neurotoxins Active on Voltage-Sensitive Sodium Channels: Semiautomated Assay for Saxitoxins, Brevetoxins, and Ciguatoxins. *Analytical Biochemistry*. 214:190-194.
- [5] Van Dolah F.M., T.A. Leighfield, B.L. Haynes, D.R. Hampson, J.S. Ramsdell. 1997. A microplate receptor assay for the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid, utilizing a cloned glutamate receptor. *Analytical Biochemistry*. 245:102-105.
- [6] Shenfeng Q., P.C. Wook, M.C. Currás-Collazo. 2005. Sequential involvement of distinct glutamate receptors in domoic acid-induced neurotoxicity in rat mixed cortical cultures: Effect of multiple dose/duration paradigms, chronological age, and repeated exposure. *Toxicological Sciences*. 89:243-256.
- [7] Habermann E. 1989. Palytoxin acts through Na^+ , K^+ -ATPase. *Toxicon*. 27: 1171-1187.