

ACTAS DEL
XV

CONGRESO NACIONAL Y
I CONGRESO IBÉRICO DE
ACUICULTURA

CASA COLÓN 13/16 OCTUBRE
HUELVA 2015
ACUICULTURA, CULTIVANDO EL FUTURO



ORGANIZAN:



**Sociedad
Española de
Acuicultura**



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

Organismos organizadores:

- Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA)
Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía
- Sociedad Española de Acuicultura (SEA)

Editores:

José Ignacio Navas
María Luisa Cordero
Salvador Cárdenas

Editoriales:

IFAPA
SEA

Año de Publicación: 2015

ISBN: 978-84-608-2878-5

Depósito Legal: M-32497-2015

Generación de una línea celular de cerebro de lubina (DLB-1). Aplicación en estudios de toxicología y virología

P. Morcillo¹, J.G. Oliveira², I. Bandín², M.A. Esteban¹, J. Meseguer¹, E. Chaves-Pozo³ y
A. Cuesta¹

¹Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Biología, Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, 30100 Murcia.

²Unidad de Ictiopatología-Patología Viral, Departamento de Microbiología y Parasitología. Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela. Campus Vida. Santiago de Compostela. 15782.

³Centro Oceanográfico de Murcia, Instituto Español de Oceanografía, 30860 Puerto de Mazarrón.

Summary

Cell lines are very important tools in many studies of biology. In fish, there are some cell lines available but very few of marine fish. Thus, we have generated a cell line (DLB-1) derived from the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and aimed to assess its application in fish Toxicology and Virology. Thus, we found that DLB-1 cells were killed by incubation with heavy metals (Cd, Hg, As and Pb) in a dose-dependent manner, resulting similarly susceptible to cadmium, methylmercury and arsenic but very resistant to lead and that the metallothionein gene was up-regulated. Finally, we evaluated its susceptibility to nodavirus, the most pathogenic virus for this fish species. Our results show that DLB-1 cells are able to support the replication of all nodavirus genotypes. Further characterization of this cell line would help to study many aspects of the fish biology, concretely of the European sea bass.

Resumen

Las líneas celulares son herramientas fundamentales para diversos estudios de Biología. En peces existen pocas líneas celulares y muy pocas de peces marinos. Por ello, hemos generado y caracterizado una línea celular (DLB-1) a partir de cerebro de lubina (*Dicentrarchus labrax*) y evaluamos su posible aplicación en Toxicología y Virología de peces. La incubación con distintos metales pesados (Cd, Hg, As o Pb) produce mortalidad en las células DLB-1 de manera dosis-dependiente, siendo muy tóxicos el Cd, Hg y As y muy poco el plomo. Además, se indujo la expresión del gen de la metalotioneína. Por otro lado, hemos evaluado la susceptibilidad de las células DLB-1 a nodavirus, el principal virus que afecta a lubinas. Los datos muestran que las células DLB-1 son susceptibles a los 4 genotipos de nodavirus. Esta línea celular puede ser muy útil para diversos estudios de la Biología de peces, concretamente de la lubina.

Justificación

Las líneas celulares son herramientas muy útiles para el estudio y la caracterización de múltiples procesos celulares. En el caso de peces, existen pocas líneas celulares disponibles comercialmente, las cuales son imprescindibles en el caso de los estudios de Virología, ya que son necesarias para el diagnóstico y la producción de los virus. En el caso de los peces de interés en acuicultura en el Mediterráneo, sólo existe una línea celular comercial (SAF-1) obtenida a partir de dorada (*Sparus aurata*) (Béjar et al., 2005) y algunas otras no comerciales para rodaballo y lubina (Buonocore et al., 2006; Wang et al., 2010). Por ello, sería de gran interés el desarrollo de más líneas celulares de peces de nuestro entorno para profundizar en el estudio de diversos aspectos de su Biología.

El uso de líneas celulares ha sido fundamental en campos como Toxicología y Virología. En el primero de ellos, el uso de líneas celulares de peces permite realizar estudios sobre la toxicidad de distintos compuestos presentes en la naturaleza (Segner, 1998), siendo los datos obtenidos perfectamente extrapolables a los resultados obtenidos *in vivo* (Segner, 2004), lo que demuestra su utilidad. Por otro lado, uno de los virus de peces marinos más importantes, en cuanto a las pérdidas que ocasiona, es el virus de la necrosis nerviosa viral (VNN, nodavirus), que afecta principalmente a lubina, pero también a otras especies (OIE, 2012). Para los estudios de diagnóstico, y la producción de nodavirus, se emplean principalmente líneas celulares de peces asiáticos. Por ello, es necesaria la generación de líneas celulares de especies susceptibles a nodavirus, como la lubina, para estudiar la interacción entre nodavirus y el huésped. En base a esto, en este trabajo nos planteamos la generación de una línea celular de lubina así como su posible aplicación en estudios de Toxicología y Virología de peces.

Material y Métodos

Se realizaron explantes a partir de cerebro de ejemplares adultos de lubina en medio de cultivo (L-15 suplementado) y cultivados en una estufa a 25°C. El cultivo celular fue observado diariamente y cada vez que se obtenía confluencia se realizaba el subcultivo mediante tripsinización y dilución con medio de cultivo fresco cada 3 semanas, intervalo que fue reduciéndose hasta los 5-7 días en la actualidad.

Para los estudios de Toxicología, 2'5x10⁴ células son cultivadas en placas de 96 pocillos en presencia de distintos metales pesados: CdCl₂, CH₃HgCl₂, As₂O₃, Pb(NO₃)₂. Tras 24 de incubación se determinó la viabilidad mediante las técnicas colorimétricas MTT (Mosmann, 1983) y rojo neutro (Borenfreund y Puerner, 1985) y la concentración que produce el 50% de mortalidad (EC₅₀). En células DLB-1 expuestas a la EC₅₀ se estudió la expresión del gen de la metalotioneína (*mt*) mediante PCR a tiempo real.

Para los estudios de Virología, las células fueron incubadas con diluciones de distintos genotipos de nodavirus: RGNNV, SJNNV, BFNNV y TPNNV. Las células fueron incubadas a 20 o 25°C y los cultivos se fueron observando diariamente para evaluar el efecto citopático.

Resultados y Discusión

Con el avance del cultivo se estableció satisfactoriamente una línea celular estable (DLB-1), con un tiempo de doblaje de 69'41 h, que en la actualidad lleva 90 pases. La morfología oscila entre fibroblástica, con baja densidad, y epitelial, con altas densidades.

La exposición a metales pesados mostró una mortalidad dosis-dependiente para todos los metales. La concentración que produjo la lisis de la mitad de la población (EC_{50}) fue de 15 μ M para Cd, 18 μ M para As, 20 μ M para Hg y de 1'5 mM para Pb, lo que indica que son muy resistentes al plomo. Además, en las células DLB-1 expuestas a la EC_{50} se indujo considerablemente la expresión de *mt*.

En cuanto a la susceptibilidad de las células DLB-1 a nodavirus, todos los genotipos fueron capaces de replicar a 25°C mientras que a 20°C sólo los genotipos RGNNV y SJNNV pudieron hacerlo.

Bibliografía

- Béjar, J., J. Porta, J.J. Borrego y M.C. Álvarez. 2005. The piscine SAF-1 cell line: genetic stability and labeling. *Marine Biotechnology* 7(4): 389-395.
- Borenfreund, E. y J.A. Puerner. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 24: 119-124.
- Buonocore, F., A. Libertini, D. Prugnoli, M. Mazzini, y G. Scapigliati. 2006. Production and characterization of a continuous embryonic cell line from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Marine Biotechnology* 8(1): 80-85.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- OIE. 2012. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Pp. 409-427.
- Segner, H. 1998. Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser Basel. Series EXS 86: 1-38.
- Segner, H. 2004. Cytotoxicity assays with fish cells as an alternative to the acute lethality test with fish. *Alternatives to Laboratory Animals* 32(4): 375-382.
- Wang, N., X.L. Wang, Z.X. Sha, Y.S. Tian, y S.L. Chen. 2010. Development and characterization of a new marine fish cell line from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 36(4): 1227-1234.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido co-financiado mediante proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación con fondos FEDER (AGL2013-43588-P), de la Fundación Séneca (04538/GERM/06) y un contrato Ramón y Cajal a E. Chaves-Pozo (RYC-2009-05441).

ORGANIZAN



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

PATROCINAN



COLABORAN

