



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 334 425**

⑫ Número de solicitud: 200900978

⑮ Int. Cl.:
G01N 33/12 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **06.04.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
09.03.2010

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Oviedo**
Plaza de Riego, 4 - Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES

⑱ Inventor/es: **Fernández Sánchez, María Teresa;**
Novelli Clotti, Antonello y
Pérez Gómez, Anabel

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Método para la detección y cuantificación selectiva de palitoxinas mediante sus efectos tóxicos sobre células excitables.**

㉕ Resumen:

Método para la detección y cuantificación selectiva de palitoxinas mediante sus efectos tóxicos sobre células excitables. La presente invención se refiere a un método para la detección y cuantificación sistemática de palitoxina y sus derivados (PLTXs) en muestras problema mediante la utilización de células excitables y un inhibidor selectivo de la citotoxicidad de las PLTXs. La adición a las células de muestras problema contaminadas con PLTXs disminuye la viabilidad celular de forma proporcional a la concentración de PLTXs existente en la muestra. La presencia del inhibidor de la toxicidad de las PLTXs durante la exposición de las células a muestras problema contaminadas con PLTXs previene específicamente su toxicidad. La comparación de los niveles de supervivencia de células tratadas con la muestra contaminada con PLTXs respecto a los valores obtenidos en cultivos tratados con concentraciones variables de PLTX purificada permite determinar la concentración de PLTXs presente en la muestra problema.

ES 2 334 425 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección y cuantificación selectiva de palitoxinas mediante sus efectos tóxicos sobre células excitables.

La presente invención se refiere a un método para la detección y cuantificación sistemática de la presencia de palitoxina y sus derivados (PLTXs) en muestras problema, como extractos de alimentos marinos o muestras de aguas, mediante la utilización de células excitables y el uso de un inhibidor selectivo de la citotoxicidad de las PLTXs.

Las PLTXs, unas ficotoxinas particularmente potentes y letales, son retenidas y acumuladas por diversos organismos marinos, en particular por moluscos de habitual consumo, en sus tejidos sin que se aprecien cambios en su morfología o viabilidad, por lo que se hace necesario el desarrollo de métodos rápidos, sensibles y específicos para su detección y cuantificación.

La invención resulta de aplicación en aquellos sectores que precisen de la detección, identificación y cuantificación de sustancias químicas y bioquímicas de carácter tóxico en seres vivos, como por ejemplo en los sectores medioambiental o agroalimentario, y en particular en el campo de la seguridad alimentaria de productos marinos.

Estado de la técnica

Durante los últimos años, los dinoflagelados productores de PLTXs ha demostrado tener una distribución mundial, haciendo de esta toxina un riesgo grave y real para la salud. Por ello, resulta imprescindible controlar sistemáticamente los niveles de PLTXs contenidos en los alimentos antes de autorizar su salida al mercado. En la actualidad, el método de detección de toxinas universalmente aceptado es el bioensayo del ratón (Yasumoto T., Oshima Y., Sugawara M., Fukuyo Y., Oguri H., Igarashi T., Fujita N. (1980) *Bull Japan Soc Sci Fish.* 46: 1405-1411) que se basa en la observación de los efectos producidos tras la inyección intraperitoneal de extractos de hepatopáncreas de moluscos en ratones.

Este bioensayo es de sencilla realización y ha resultado de gran utilidad para determinar si el producto es apto o no para el consumo humano. Sin embargo, cuenta con grandes inconvenientes:

- Económicos: Es un procedimiento costoso.
- Baja sensibilidad: los resultados obtenidos llevan implícito un gran margen de error.
- Falta de especificidad: no permite obtener información precisa de la naturaleza del agente tóxico.
- Elevada variabilidad: los resultados obtenidos pueden variar para el mismo extracto de marisco contaminado.
- Éticos: requiere el empleo masivo de animales de laboratorio.

Estos inconvenientes han favorecido la búsqueda de alternativas que, a pesar de sus múltiples ventajas, entre las que destacan una mayor sensibilidad a concentraciones más bajas de toxina y menos variabilidad en los resultados obtenidos, también presentan inconvenientes.

Así, los bioensayos de toxicidad en líneas celulares desarrollados hasta ahora (Bellocci M., Ronzitti G., Milandri A., Melchiorre N., Grillo C., Poletti R., Yasumoto T., Rossini GP. (2008) *Anal Biochem.* 374 (1): 48-55; Espina B., Cagide E., Louzano MC., Martinez-Fernandez M., Vieytes MR., Katikou P., Villar A., Jaen D., Maman L., Botana LM. (2009) *Biosci Rep.* 29 (1): 13-23; Tan CH., Teh YF. (1972) *Experientia.* 28: 46) o la medida de la actividad hemolítica de la PLTX (Bignami GS. (1993) *Toxicon.* 31 (6): 817-820; Riobó P., Paz B., Franco JM., Vázquez JA., Murado MA., Cacho E. (2008) *Food Chem Toxicol.* 46 (8):2639-2647), no resultan sensibles a todas las toxinas conocidas hasta el momento y poseen una elevada variabilidad relacionada con la naturaleza tumoral de las líneas celulares utilizadas o, en el caso de las hemáties, con la especie animal de la que se aíslan.

Los radioinmunoensayos (Levine L., Fujiki H., Gjika HB., Van Vunakis H. (1988) *Toxicon.* 26: 115-1121), a pesar de su especificidad, tienden a ser reemplazados por métodos no radiactivos por motivos de seguridad, mientras que los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAs) (Bignami GS., Raybould TJ., Sachinvala ND., Grothaus PG., Simpson SB., Lazo CB., Byrnes JB., Moore RE., Vann DC. (1992) *Toxicon.* 30 (7): 687-700), aunque son sensibles y relativamente rápidos en la detección, no discriminan entre formas biológicamente activas y no activas.

Por otro lado, recientemente se han desarrollado nuevos métodos físico-químicos, entre los que destaca la cromatografía líquida en fase reversa con espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS) (Cimiello P., Dell' Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno GS., Tartaglione L., Grillo C., Melchiorre N. (2006) *Anal Chem.* 78 (17): 6153-6159). Dicho método posee un gran potencial por su rapidez, sensibilidad e inequívoca identificación de la PLTX en extractos contaminados. Sin embargo, este tipo de procedimientos requieren de un equipamiento costoso, complejo y, en muchos de los casos, de personal especializado. Además, sólo permiten cuantificar toxinas conocidas de las que estén disponibles patrones purificados, lo cual no siempre está asegurado.

Descripción de la invención

El método propuesto en el presente documento se basa en primer lugar en que la exposición de los cultivos de células excitables a concentraciones crecientes de PLTXs da lugar a una disminución de su viabilidad, mientras que el pretratamiento con un inhibidor de la permeabilidad iónica celular o con una molécula con grupos isotiocianato previene la degeneración y muerte celular inducida por las PLTXs. En segundo lugar, la exposición de los cultivos de células excitables a concentraciones subtóxicas de PLTXs y ácido domoico de forma conjunta induce la aparición de un sinergismo tóxico, que puede ser inhibido mediante el inhibidor de los efectos de las PLTXs o mediante el pretratamiento con un inhibidor de los receptores activados por ácido domoico.

La presente invención se refiere a un método para la detección y cuantificación selectiva de PLTXs en células excitables, que comprende las siguientes etapas:

- a) Establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de distintas concentraciones de PLTX a un primer grupo de células excitables.
- b) Establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un segundo grupo de células excitables. A efectos de la presente invención, una muestra problema se refiere a extractos de alimentos o muestras de aguas en los que se quiere detectar la presencia de PLTX y sus derivados (PLTXs).
- c) Establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un tercer grupo de células excitables tratadas con una concentración efectiva de un inhibidor de los efectos de las PLTXs.
- d) Establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un cuarto grupo de células excitables tratadas con una concentración efectiva de un inhibidor de los receptores activados por ácido domoico.
- e) Detección de los efectos citotóxicos inducidos en cada grupo de células y cuantificación de los niveles de viabilidad celular mediante el uso de protocolos o métodos efectivos para estos propósitos.
- f) Comparación de los niveles de viabilidad entre los diferentes grupos de células para identificar a las PLTXs como los agentes causantes de citotoxicidad y determinar su concentración en la muestra problema.
- g) Comparación de los niveles de viabilidad entre los diferentes grupos de células para identificar la presencia conjunta de PLTXs y ácido domoico en la muestra problema.

En una realización preferida, el inhibidor de los efectos de las PLTXs es un inhibidor de la permeabilidad iónica celular.

En otra realización preferida, el inhibidor de los efectos de las PLTXs es una molécula con grupos isotiocianato.

En una realización más preferida el inhibidor de los efectos de las PLTXs es ácido 4,4'-diisotiocianato-estilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS).

En otra realización específica, las células excitables son neuronas del sistema nervioso central. En una realización más específica, las células excitables son neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario.

En una realización todavía más preferida, el inhibidor de los efectos de las PLTXs es DIDS, las células excitables son neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario y la detección de los efectos citotóxicos se realiza mediante la observación de los cultivos celulares con microscopía en contraste de fase. En una realización aún mas preferida, la detección de los efectos citotóxicos para concentraciones de PLTXs iguales o superiores a 1 nM se realiza transcurridos 15 min desde las adiciones.

En otra realización todavía más preferida, el inhibidor de los efectos de las PLTXs es DIDS, las células excitables son neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario y la detección de los efectos citotóxicos se realiza utilizando colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia.

En otra realización todavía más específica, el inhibidor de los efectos de las PLTXs es DIDS, las células excitables son neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario y la cuantificación de los niveles de viabilidad celular se realiza utilizando colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia. En una realización aún más específica, para concentraciones de PLTXs iguales o superiores a 1 nM la cuantificación de los efectos citotóxicos se realiza transcurridas 6 horas desde las adiciones, y para concentraciones de PLTX inferiores a 1 nM, transcurridas 24 horas.

La presencia de PLTXs se determina mediante la comparación de los niveles de supervivencia de las células tratadas con la muestra problema respecto a las tratadas con la muestra problema y el inhibidor de los efectos de las PLTXs, de manera que la protección observable en las células expuestas a la muestra problema y el inhibidor respecto

a las expuestas sólo a la muestra problema indica que el agente causante de toxicidad es PLTX o un derivado. La cuantificación de PLTXs se realiza mediante la comparación de los niveles de supervivencia de las células tratadas con la muestra problema respecto a las tratadas con la PLTX comercial. La presencia conjunta en la muestra problema de PLTXs y ácido domoico, se detecta mediante la comparación de los niveles de viabilidad de las células tratadas con la muestra problema respecto a las tratadas con la muestra problema y el inhibidor de los receptores activados por ácido domoico, de manera que un nivel de viabilidad superior en las células tratadas conjuntamente con la muestra problema y el inhibidor que en las células expuestas sólo a la muestra problema indica que los agentes causante de citotoxicidad son conjuntamente PLTXs y ácido domoico.

La aplicación del presente bioensayo para la detección y cuantificación de PLTXs en el análisis rutinario de muestras problema requiere una inversión mínima, lo que le otorga una gran ventaja sobre otras técnicas. De esta manera, sólo requiere de la adquisición de:

- Una campana de flujo laminar.
- Un incubador de CO₂.
- Un microscopio de contraste de fases con epifluorescencia.

El bioensayo con células excitables es un método sencillo, fiable y fácilmente utilizable, que requiere equipos de coste limitado y personal con cualificación media, siendo estas grandes ventajas para su aplicación y generalización, frente a otras técnicas y métodos, como los analítico-químicos, que requieren un equipamiento costoso, complejo y, en muchos de los casos, de personal especializado.

Por otro lado, aunque en el bioensayo del ratón la inyección de PLTX induce la aparición de algunos síntomas característicos antes de la muerte del animal, no es posible detectar inequívocamente la naturaleza del agente causal. El procedimiento que se propone permite detectar cualitativa y cuantitativamente la presencia de PLTXs mediante un único ensayo, suponiendo por tanto un ahorro considerable tanto de tiempo como de animales necesarios, respecto al bioensayo del ratón.

La utilización de cultivos de células excitables en cultivo primario, le otorga una ventaja fundamental sobre los bioensayos de toxicidad de PLTX en líneas celulares o la medida de su actividad hemolítica, ya que como se ha comentado con anterioridad, dichos ensayos poseen una elevada variabilidad relacionada con el origen tumoral de los cultivos celulares empleados para su detección, o en el caso de la cuantificación hemolítica, con la especie animal de la que se aíslan las células sanguíneas. Además, los bioensayos de toxicidad en líneas celulares detectan concentraciones de toxina entre 0,5 y 1,25 nM, mientras que el método basado en el uso de células excitables en cultivo primario tiene una sensibilidad mayor, ya que detecta concentraciones de PLTX superiores a 0,2 nM.

Hay también que destacar que este método permite detectar sinergismos tóxicos entre moléculas, tales como las PLTXs y el ácido domoico. Este sinergismo es particularmente importante cuando cada uno de los dos tipos de toxinas está presente en concentraciones subtóxicas.

El presente bioensayo puede ser relevante para instituciones dedicadas a la investigación alimentaria. Además, al ser un método sencillo, que requiere equipos de coste limitado y personal con cualificación media, frente a otras técnicas más tediosas y caras, puede ser significativo para laboratorios con la disponibilidad instrumental más limitada.

Explicación de una forma de realización preferente

Para una mejor comprensión de la presente invención, se expone el siguiente ejemplo de realización preferente, descrito en detalle, que debe entenderse sin carácter limitativo del alcance de la invención.

La preparación de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario se llevó a cabo mediante el procedimiento previamente establecido que se describe a continuación:

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución I

NaCl 124 mM, KCl 5,37 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, D-glucosa 14,5 mM, Hepes 25 mM, rojo fenol 27 µM, MgSO₄ 1,2 mM, seroalbúmina bovina (BSA) 3 mg/mL. La solución se equilibró a pH 7,4 con NaOH.

Solución II

Solución I suplementada con 0,25 mg/mL de tripsina.

Solución III

Solución I suplementada con 80 $\mu\text{g/mL}$ de Desoxirribonucleasa I (DNasa I), 0,52 mg/mL de inhibidor de tripsina y MgSO_4 elevado a 2,8 mM.

Solución IV

Solución I suplementada con 25,6 $\mu\text{g/mL}$ de DNasa I, 166,4 $\mu\text{g/mL}$ de inhibidor de tripsina y MgSO_4 elevado a 1,7 mM.

Solución V

Solución I suplementada con 0,1 mM de CaCl_2 y elevada a 2,5 mM de MgSO_4 .

A continuación se extrajeron por disección 8-13 cerebelos procedentes de crías de rata de 8 días de edad y se depositaron en 2 mL de solución I. Con ayuda de unas pinzas, se eliminó la meninge que individualiza el cerebelo de otras partes del cerebro y lo separa del hueso del cráneo. Los cerebelos se desmenuzaron mediante cortes ortogonales con una cuchilla, y los pequeños fragmentos de tejido se resuspendieron en 30 mL de solución I. Tras una centrifugación a baja velocidad, el tejido se resuspendió en 30 mL de solución II y se incubó a 37°C durante 10 min con agitación con el fin de producir la tripsinización del mismo. La reacción se detuvo añadiendo 15 mL de la solución IV. La suspensión se agitó ligeramente durante 1 minuto y después se centrifugó. El precipitado obtenido se resuspendió en 2 mL de solución III.

El tejido se sometió entonces a una disgregación mecánica, disociando por aspiración-expulsión con una pipeta Pasteur, y se añadieron 5 mL de solución V. La suspensión se agitó y se dejó reposar verticalmente durante 5-10 min con el fin de permitir la sedimentación de posibles grumos de células no disociadas. Las células en suspensión se recogieron por centrifugación a baja velocidad durante 5 min y el precipitado obtenido se resuspendió en medio de cultivo Basal Eagle's Medium suplementado con 10% de suero fetal de ternera (inactivado por calor a 56°C durante 30 min), 100 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, 2 mM de glutamina y 25 mM de KCl.

Los grumos de células no disociadas se sometieron a un nuevo tratamiento de trituración con una pipeta Pasteur, y las células disociadas así obtenidas se añadieron a las anteriores. Las células se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/cm² sobre placas Petri de plástico pretratadas con poli-L-lisina (5 $\mu\text{g/mL}$). Los cultivos se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO_2 al 5% y una humedad del 95%. Tras este proceso se obtuvieron 10-12 placas de cultivo de 35 mm de diámetro por cerebelo, y la preparación se llevó a cabo en aproximadamente 3 horas. La utilización de placas de menor diámetro permitió aumentar considerablemente el rendimiento sin perjudicar la sensibilidad del método.

Con objeto de impedir la replicación de las células no neuronales se añadió, al cabo de 20-24 h, un agente citostático (arabinofuranósido de citosina, 10 μM). Tras ocho días en cultivo, las células estuvieron listas para su utilización, y pudieron mantenerse en cultivo durante al menos un mes añadiendo periódicamente glucosa (5,6 mM) al medio de cultivo y reponiendo la pérdida de agua debida a la evaporación. Después de ocho días en cultivo, más del 95% de la población neuronal pudo ser identificada morfológicamente como perteneciente al tipo de neurona granular, siendo el 5% restante neuronas GABAérgicas fundamentalmente. La proporción de astrocitos no superó el 3%.

Para la realización del bioensayo, se formaron 4 grupos con las placas que contienen las neuronas, donde cada concentración o dilución se ensayó por duplicado. Se añadió (5R,10S)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imino hidrogeno maleato (MK-801, 1 μM) a todas las placas de neuronas para evitar la posible excitotoxicidad por glutamato endógeno o exógeno, a través del receptor NMDA.

A cada grupo se adicionó:

- Grupo 1. Concentraciones crecientes de PLTX purificada (100 pM, 250 pM, 500 pM, 750 pM, 1 nM). En este grupo se incluyeron dos placas control que no contienen PLTX.

- Grupo 2. 200 μL de cada una de las siguientes diluciones de la muestra problema: 0, 10, 50, 100.

- Grupo 3. El inhibidor DIDS a una concentración final de 500 μM y 15 minutos después, 200 μL de cada una de las siguientes diluciones de la muestra problema: 0, 10, 50, 100. En este grupo se incluyeron dos placas que contienen el inhibidor DIDS en ausencia de la muestra problema.

- Grupo 4. El inhibidor de los receptores activados por ácido domoico 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) a una concentración final de 15 μM y 15 min después, 200 μL de cada una de las siguientes diluciones de la muestra problema: 0, 10, 50, 100. En este grupo se incluyeron 2 placas que contienen el inhibidor CNQX en ausencia de la muestra problema.

La neuroprotección observada en el grupo 3 respecto al grupo 2 indicó la presencia de PLTXs en la muestra problema, mientras que la comparación de los porcentajes de supervivencia entre el grupo 1 y el grupo 2 indicó su concentración. La presencia de neuroprotección en el grupo 4 respecto al grupo 2 indicó la presencia de ácido domoico actuando mediante un efecto sinérgico con las PLTXs.

La detección de PLTXs en la muestra problema se llevó a cabo tras 20 min de exposición observando los cultivos con microscopía óptica en contraste de fase y determinando la presencia de "toxicidad temprana", caracterizada por el hinchamiento y ennegrecimiento de las neuronas tratadas con PLTX purificada o muestras problema contaminadas con PLTXs, en ausencia de DIDS. Con este procedimiento rápido se detectaron concentraciones iguales o superiores a 1 nM de toxina.

La cuantificación de PLTXs mediante el recuento de la supervivencia neuronal se llevó a cabo tras 6 h y 24 h de incubación. Tras 6 h se detectaron concentraciones iguales o superiores a 1 nM de toxina, mientras que tras 24 h de exposición el método fue mucho más sensible, ya que pudieron detectarse concentraciones de hasta 200 pM de PLTX, y en el caso de ejercer un efecto sinérgico con el ácido domoico, inferiores a ella.

La cuantificación de la supervivencia neuronal se realizó mediante el siguiente protocolo:

- Se aspiró el medio de cultivo.
- Se adicionó 1 mL de la denominada solución de Locke (NaCl 154 mM, Ca₂Cl 2,3 mM, KCl 5,6 mM, Hepes 8,4 mM, Mg₂Cl 1 mM, glucosa 5,6 mM).
- Se aspiró y adicionó nuevamente 1 mL de la misma solución.
- Se aspiró y adicionó nuevamente 1 mL de solución Locke que contiene 150 µg/mL de diacetato de fluoresceína.
- Se incubó 4 min a 37°C.
- Se visualizó en un microscopio de epifluorescencia.

Mediante esta técnica, las células vivas y los circuitos neuronales funcionales aparecieron perfectamente teñidos con el colorante fluorescente, mientras que los núcleos de las células muertas se visualizaron como puntos rojos. Se fotografiaron al azar varios campos representativos del cultivo y se procedió al recuento tanto de las células vivas (de color verde), como de las muertas (de color rojo), calculando finalmente el porcentaje de supervivencia neuronal al dividir el número de neuronas vivas entre el número total de neuronas (vivas y muertas) en cada fotografía.

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección y cuantificación selectiva de PLTXs en células excitables, que comprende las siguientes etapas:

- a) establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de distintas concentraciones de PLTX a un primer grupo de células excitables;
- b) establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un segundo grupo de células excitables;
- c) establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un tercer grupo de células excitables tratadas con una concentración efectiva de un inhibidor de los efectos de las PLTXs;
- d) establecimiento de una relación dosis-respuesta mediante la adición de diluciones seriadas de la muestra problema a un cuarto grupo de células excitables tratadas con una concentración efectiva de un inhibidor de los receptores activados por ácido domoico;
- e) detección de los efectos citotóxicos inducidos en cada grupo de células y cuantificación de los niveles de viabilidad celular mediante el uso de protocolos o métodos efectivos para estos propósitos;
- f) comparación de los niveles de viabilidad entre los diferentes grupos de células para identificar a las PLTXs como los agentes causantes de citotoxicidad y determinar su concentración en la muestra problema;
- g) comparación de los niveles de viabilidad entre los diferentes grupos de células para identificar la presencia conjunta de PLTXs y ácido domoico en la muestra problema.

2. Método, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el inhibidor de los efectos de las PLTXs es un inhibidor de la permeabilidad iónica celular.

3. Método, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el inhibidor de los efectos de las PLTXs es una molécula con grupos isotiocianato.

4. Método, según reivindicaciones 2 y 3, **caracterizado** porque el inhibidor de los efectos de las PLTXs es DIDS.

5. Método, según reivindicación 1, **caracterizado** porque las células excitables son neuronas del sistema nervioso central.

6. Método, según reivindicación 5, **caracterizado** porque las células excitables son neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo primario.

7. Método, según reivindicación 4 y 6, **caracterizado** porque la detección de los efectos citotóxicos se realiza mediante la observación de los cultivos celulares con microscopía en contraste de fase.

8. Método, según reivindicación 7, **caracterizado** porque para concentraciones de PLTXs iguales o superiores a 1 nM la detección de sus efectos citotóxicos se realiza transcurridos 15 min desde las adiciones.

9. Método, según reivindicación 4 y 6, **caracterizado** porque la detección de los efectos citotóxicos se realiza utilizando colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia.

10. Método, según reivindicación 4 y 6, **caracterizado** porque la cuantificación de los niveles de viabilidad celular se realiza utilizando colorantes vitales y microscopía de epifluorescencia.

11. Método, según reivindicación 10, **caracterizado** porque para concentraciones de PLTXs iguales o superiores a 1 nM la cuantificación de los efectos citotóxicos se realiza transcurridas 6 horas desde las adiciones, y para concentraciones de PLTX inferiores a 1 nM, transcurridas 24 horas.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 334 425

⑫ Nº de solicitud: 200900978

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 06.04.2009

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **G01N 33/12** (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2047403 A1 (UNIVERSIDAD DE OVIEDO) 16.02.1994, todo el documento.	1-11
A	BELLOCCI, M. et al.: "A Cytolytic Assay for the Measurement of Palytoxin Based on a Cultured Monolayer Cell Line", Analytical Biochem. (2008), vol. 374, pp.: 48-55, todo el documento.	1-11
A	LEDREUX, A. et al.: "Suitability of the Neuro-2a Cell Line for the Detection of Palytoxin and Analogues (Neurotoxic Phycotoxins)" Toxicon (2009), vol. 53 (2), pp.: 300-308, disponible on-line desde diciembre de 2008, en <URL:http://www.elsevier.com/locate/toxicon>, <DOI:10.1016/j.toxicon.2008.12.005>, todo el documento.	1-11
A	BOTANA, L.M. et al.: "Functional assays for Marine Toxins as an Alternative, High-Throughput-Screening Solution to Animal Tests", Trends in Analytical Chemistry, (2009), vol. 28 (5), pp.: 603-611, disponible on-line desde 10/03/2009 en Science Direct, <DOI: 10.1016/j.trac.2009.02.014>, todo el documento.	1-11
A	RIOBÓ AGULLA, P.: "Palitoxinas, ensayos biológicos y métodos químicos para su determinación en organismos marinos", Tesis doctoral (2008), Universidad de Vigo [recuperado el 22.01.2010] [Recuperado de Internet] <URL:http://www.digital.csic.es/bitstream/10261/6970/1/Tesis%20PilarRiobo.pdf>	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

19.02.2010

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1