



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia i
Ciències de l'Alimentació



Nuevas perspectivas de los modelos de cultivo celular en la evaluación tóxica de las micotoxinas: de los modelos 2D a los 3D y los dispositivos microfluídicos

Dra. María-José Ruiz

Presidenta de la AETOX

Directora del grupo RiskTox (www.uv.es/RiskTox)

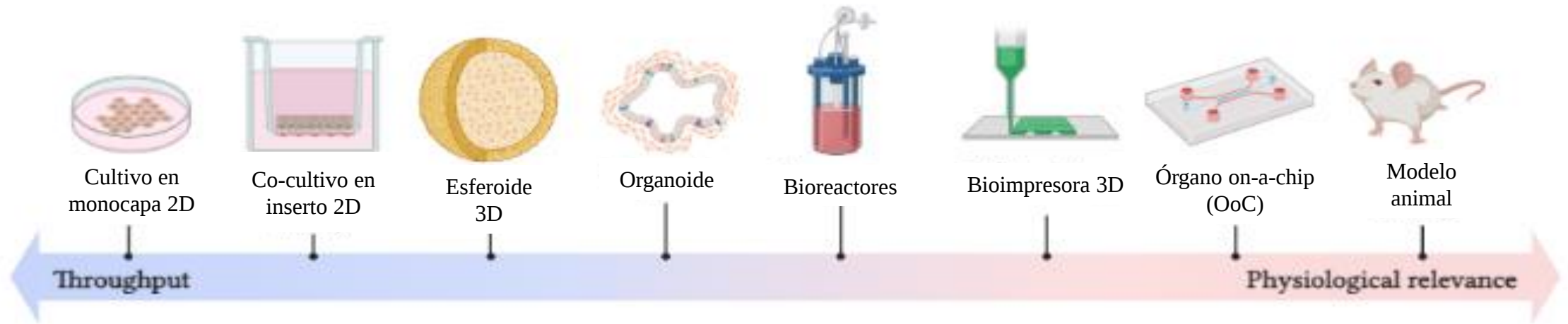
Área de Toxicología (Dpto. Medicina Preventiva)

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

Universitat de València

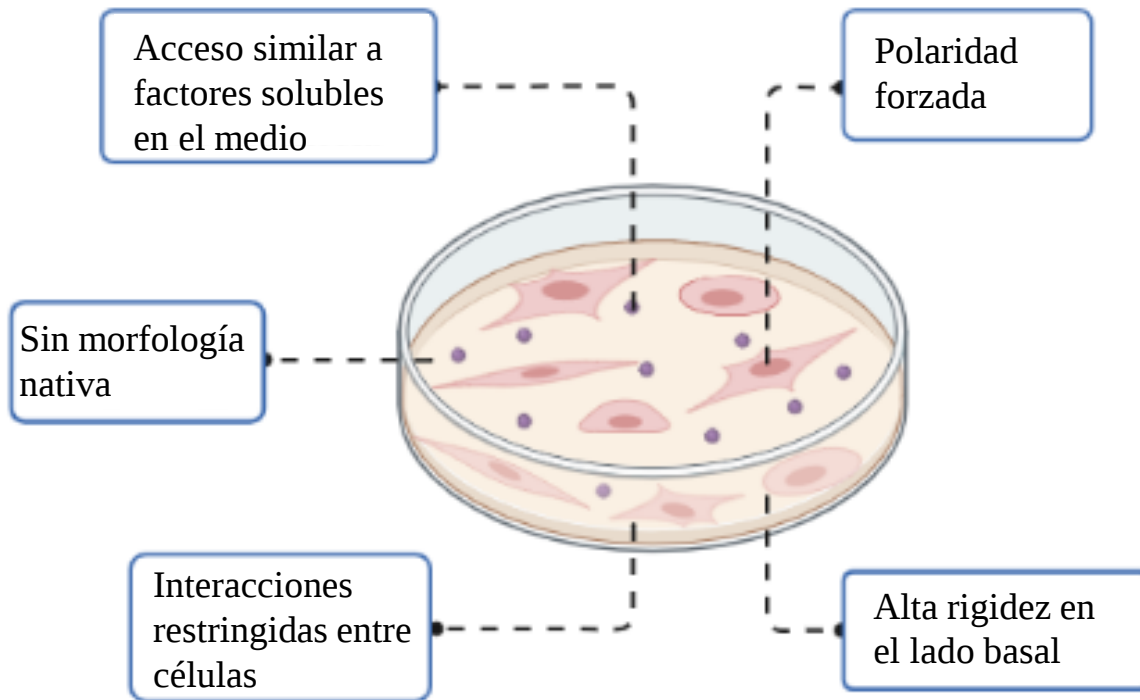
M.Jose.Ruiz@uv.es



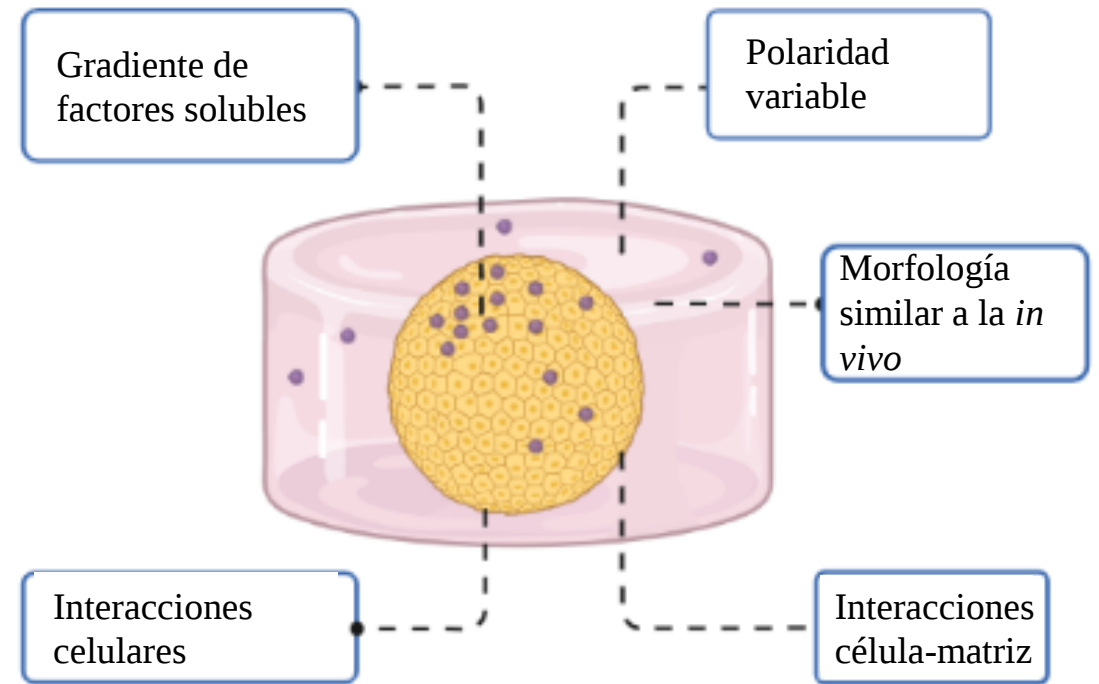


Evolución de los modelos *in vitro*: de los cultivos celulares 2D a los sistemas multi-OoC

Crecimiento celular en monocapa



Crecimiento celular en un entorno 3D

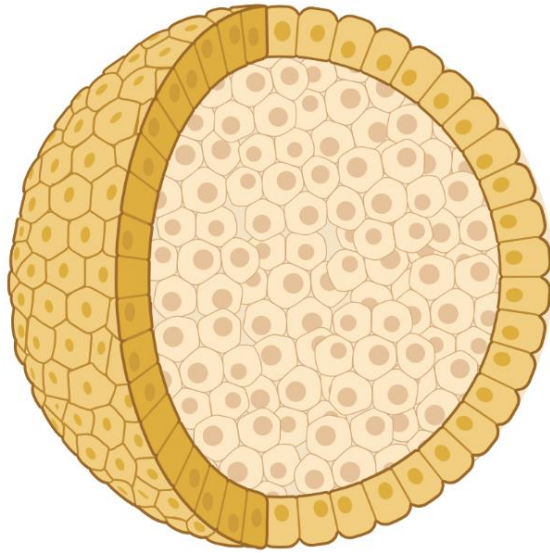


Comparación cultivos celulares 2D *vs* 3D

Los modelos 3D ofrecen una representación más precisa de sus efectos

Esferoides 3D

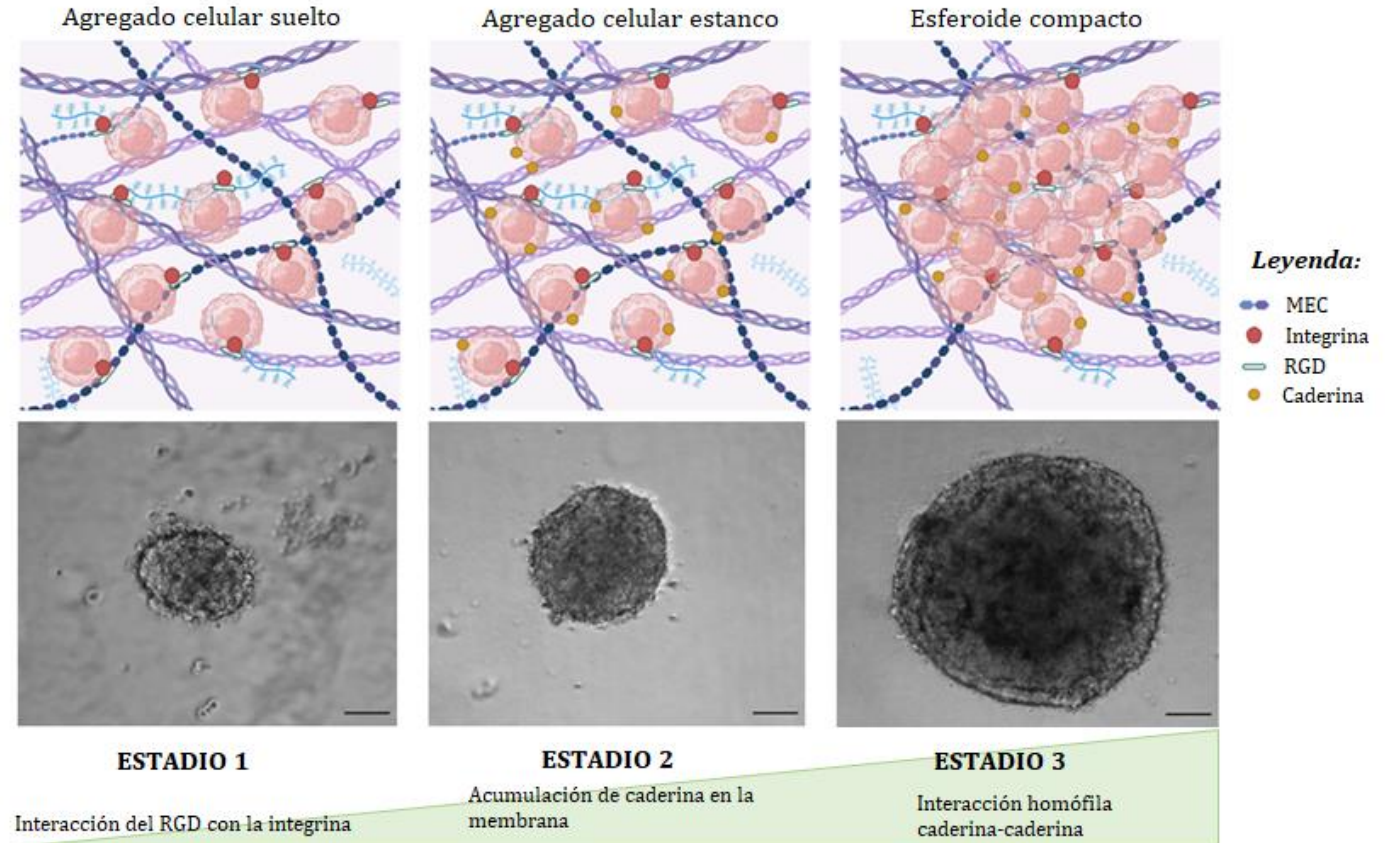
Consideraciones para la manipulación de esferoides



Autoagregación espontánea de las células en forma esférica

Fácil estandarización

Recopilación adecuada de las características fundamentales de los tejidos naturales



Imágenes ópticas representativas de esferoides SK-N-AS en diferentes fases de crecimiento a lo largo de 7 días, desde el agregado suelto de células hasta la formación de un esferoide compacto. Barra de escala = 100 μ m.

Zingales et al., Toxins 2023, 15(7), 422

Esferoides 3D

Consideraciones para la manipulación de esferoides

Con soporte

Material que proporciona el sistema de anclaje externo de las células

- Frascos giratorios
- Microesferas

➤ Polímeros sintéticos:

Polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), polidimetilsiloxano (PDMS)

➤ Polímeros naturales:

Colágeno, alginato, matrigel, gelatina, ácido hialurónico (HA)

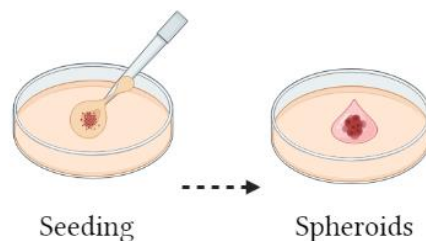
Sin soporte

Promover la autoagregación de las células

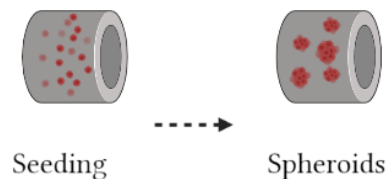
- Cultivo en pellets
- Gota colgante
- Levitación magnética
- Biorreactores
- Placas de micropocillos
- Superposición de líquidos
- Microfluidos
- Placas de ultrabaja adherencia

Superficie de cultivo especializada

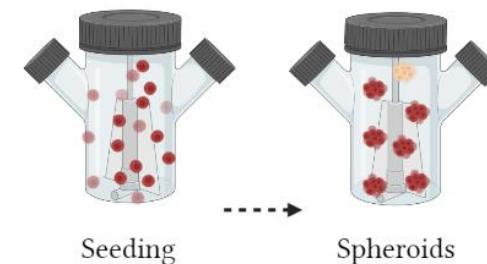
• Hanging Drop



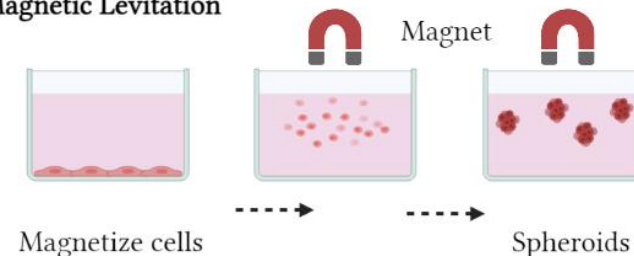
• Bioreactor



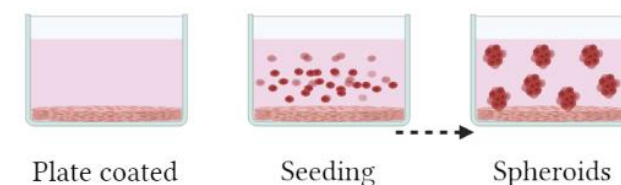
• Spinner Flask



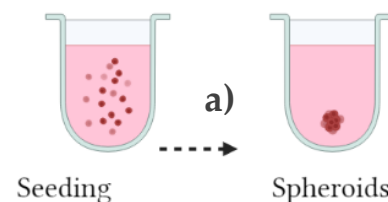
• Magnetic Levitation



• Liquid Overlay

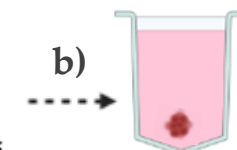


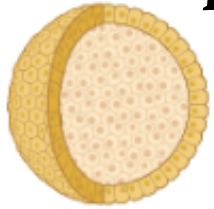
• Ultra-Low Attachment plate



• AggreWell plate

Well plate (side view, v-bottom well, full liquid)





Esferoides 3D

Consideraciones para la manipulación de esferoides

Evaluación del riesgo toxicológico

Un único esferoide por pocillo

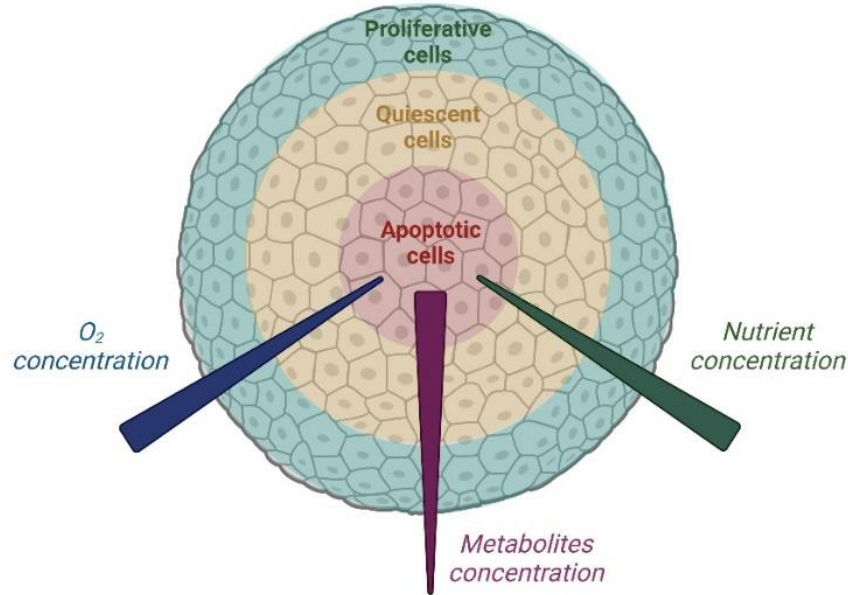
Forma y tamaño uniformes

- **TAMAÑO**



Compactación dependiente de la línea celular (número de células sembradas)

Tiempos de duplicación específicos



El **TAMAÑO ÓPTIMO DEL ESFEROIDE** para imitar las interacciones *in vivo* entre células y crear una formación espontánea de gradiente de oxígeno y otros nutrientes es de **aproximadamente 500 μm** .

- **FORMA**



SOLIDEZ: indicador de la rugosidad de la superficie esferoidal.

Solidez $\geq 0,9$ indica forma regular.

ÍNDICE DE ESFERICIDAD (SI): determina una forma geométrica esférica.

SI $\geq 0,9$ indica esferoides esféricos.

Cultivos celulares 2D *vs* 3D *vs* microfluídica

Modelos *in vitro* en la evaluación de riesgos toxicológicos



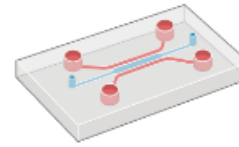
Cultivos celulares 2D

- ✓ Fáciles de manejar
- ✓ Bajo coste
- ✓ Alta reproducibilidad
- ✓ Bien establecidos
- ✗ Condiciones estáticas
- ✗ Baja predicción
- ✗ Falta de interacción célula-célula y célula-matriz



Cultivos celulares 3D

- ✓ Organización similar a la de tejidos
- ✓ Interacción célula-célula y célula-matriz
- ✓ Sensibilidad a compuestos similar a la *in vivo*
- ✓ Mayor estabilidad a largo plazo
- ✗ Condiciones estáticas
- ✗ Sistema de un solo órgano



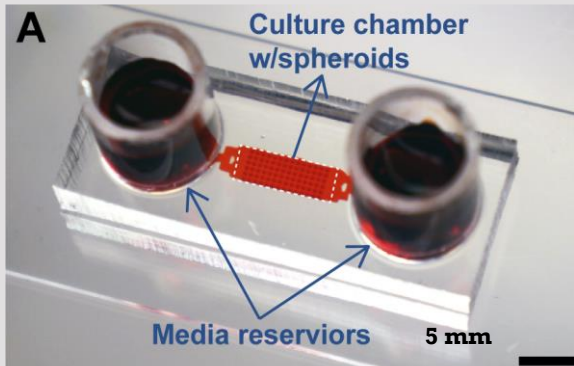
Dispositivos microfluídicos

- ✓ Similar al órgano
- ✓ Sistema multiorgánico
- ✓ Condiciones dinámicas
- ✓ Necesidad de pequeñas muestras de células y reactivos
- ✓ Distribución uniforme de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento
- ✗ Microentorno controlado
- ✗ No tan fácil de manejar
- ✗ Difícil de estandarizar y validar

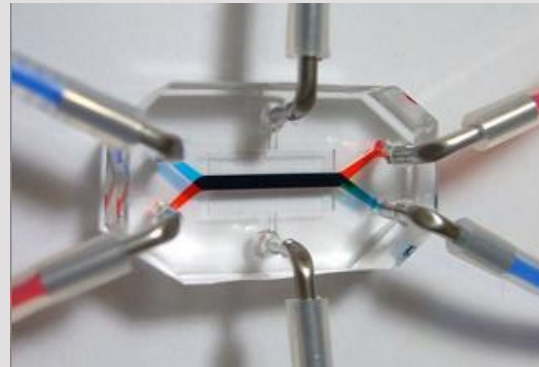
Dispositivos microfluidica

Tecnología de los sistemas que procesan pequeñas cantidades de fluidos (10^{-9} a 10^{-18} litros), utilizando canales con dimensiones de decenas a cientos de micrómetros.

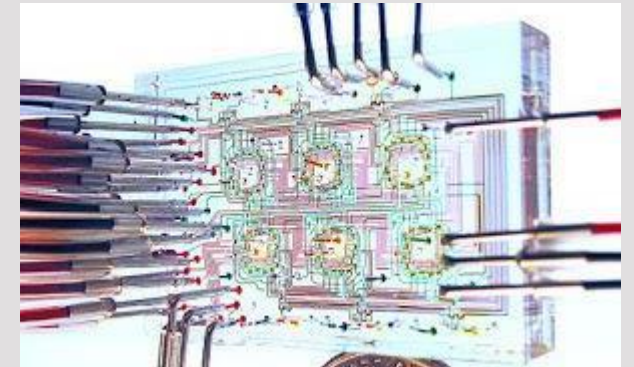
Whitesides, Nature. 2006



Choi et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2020



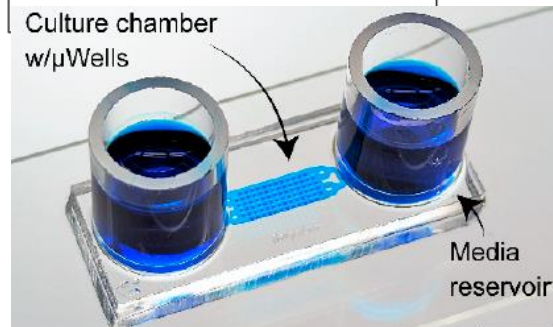
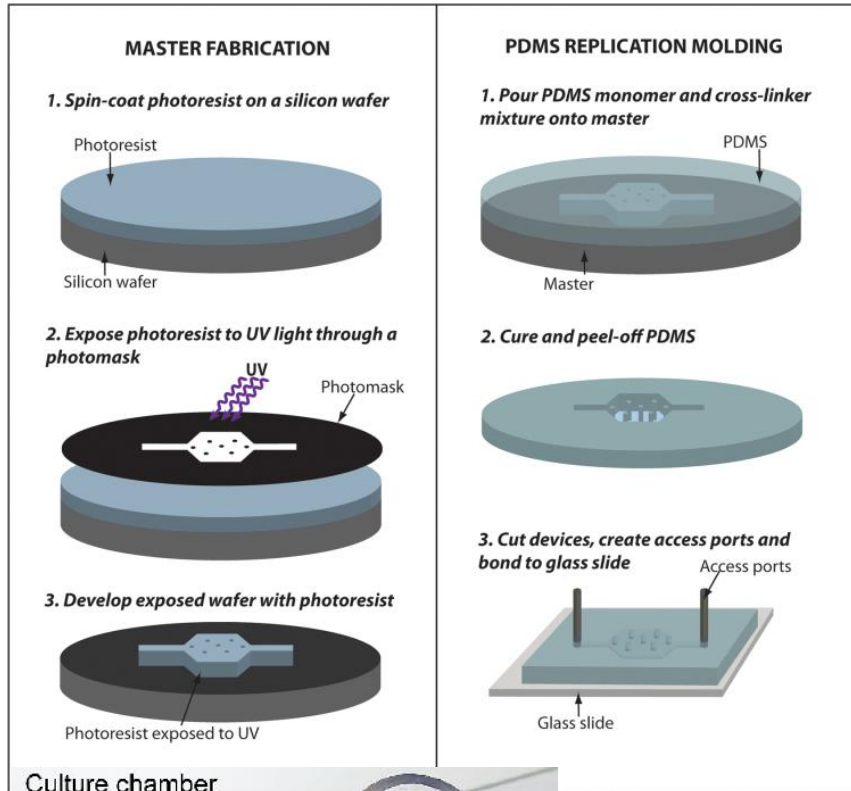
Kim et al. Lab Chip, 2012



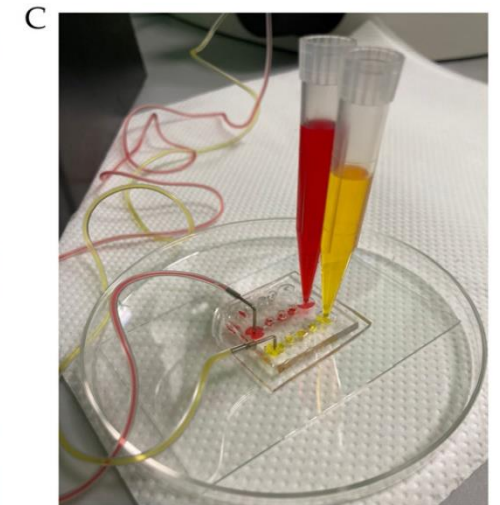
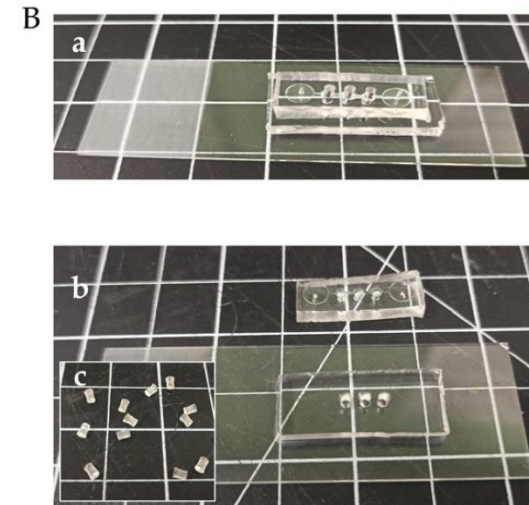
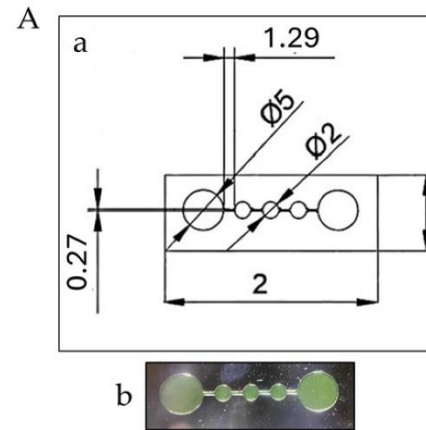
Balagadde et al. Science, 2005

- ✓ Permeable a los gases (PDMS)
- ✓ Óptico transparente
- ✓ Dimensión geométrica a microescala
- ✓ Reducción de reactivos y densidad celular
- ✓ Compartimentación - multiplexado
- ✓ Protección contra contaminación
- ✓ Flujo laminar
- ✓ Difusión de moléculas y mezclado rápido
- ✓ Microambientes controlables y dinámicos
- ✓ Cultivos estáticos o con perfusión
- ✓ Cultivos 2D y 3D
- ✓ Automatización

Dispositivos microfluidicos



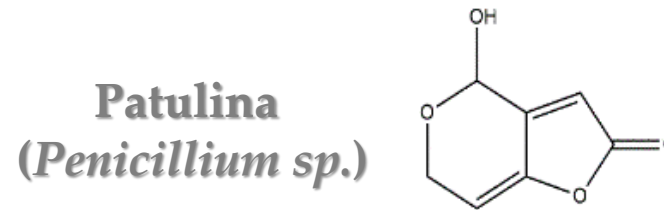
Cultivos estáticos



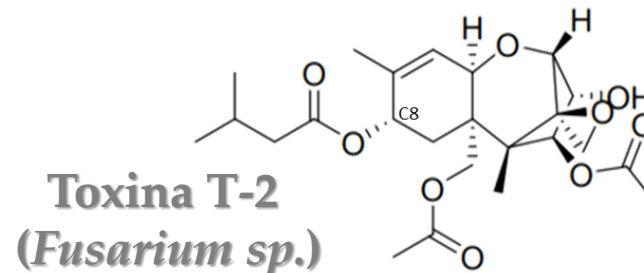
Cultivos estáticos y con perfusión (dinámicos)

El influencia del sistema de cultivo celular en la evaluación toxicológica de dos micotoxinas, la patulina (*Penicillium sp.*) y Toxina T-2 (*Fusarium sp.*)

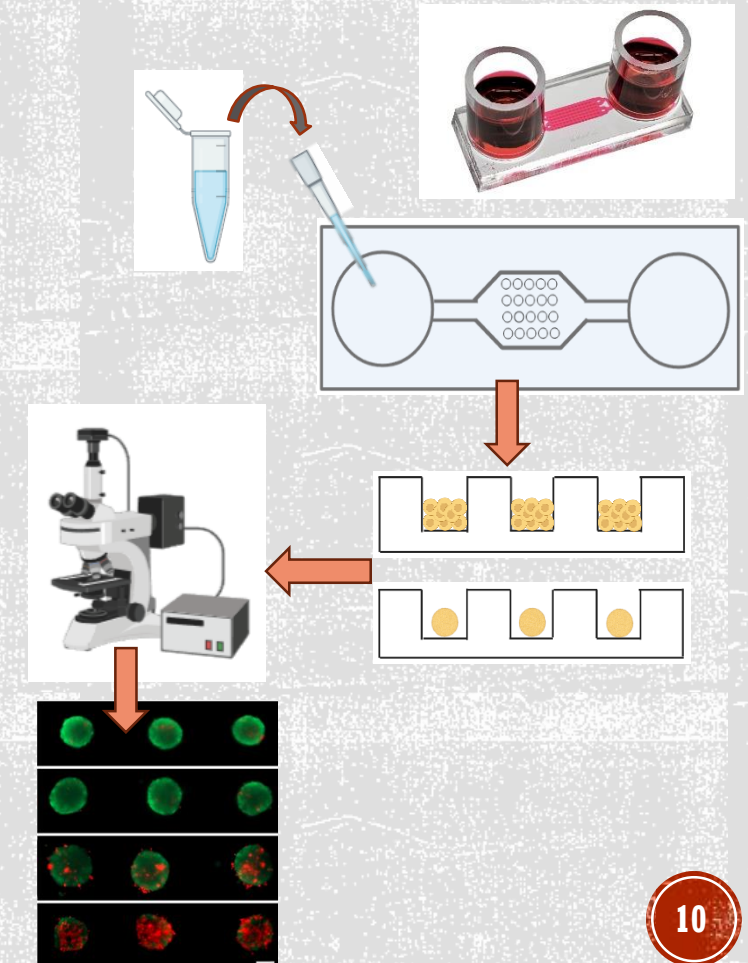
- 1. **Estudio de la patulina:** Comparar la citotoxicidad de la patulina en cultivos celulares en monocapa (2D), esferoides (3D) y dispositivos microfluídicos estáticos y dinámicos.



- 2. **Estudio de la toxina T-2:** Comparar la citotoxicidad de la toxina T-2 en esferoides de células HepG2 y esferoides en co-cultivo de células HepG2 y LX2 en dispositivos microfluídicos estáticos.

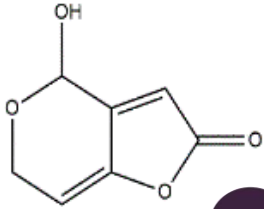


ESTUDIOS EXPERIMENTALES



Estudio:

• Patulina:



✓ Líneas celulares:

- *Células madre mesenquimales de médula ósea: BM-MSC*
 - *Células endoteliales de la vena umbilical, HUVECs*
- Líneas celulares no tumorales
- *Células de neuroblastoma humano: SH-SY5Y*
 - *Células epiteliales de cáncer de mama: MDA-MB-231*
- Líneas celulares tumorales

✓ Modelos celulares:

- 2D células en monocapa
- 3D esferoides

✓ Condiciones de exposición en dispositivo microfluídico

- Estático
- Dinámico

Resultados Patulina: 2D vs 3D

Línea celular	IC ₅₀ (μM)					
	2D			3D		
	Tiempo de exposición 24 h	48 h	72 h	Tiempo de exposición 24 h	48 h	72 h
BM-MSCs	29.09	13.38	5.43	9.52	8.40	9.98
HUVECs	19.99	1.49	0.45	2.32	5.76	3.52
MDA-MB-231	2.31	0.61	0.42	>25 *	7.30	2.73
SH-SY5Y	0.45	0.52	0.28	4.93	3.44	2.77

* Concentración máxima ensayada

Modelos 2D:

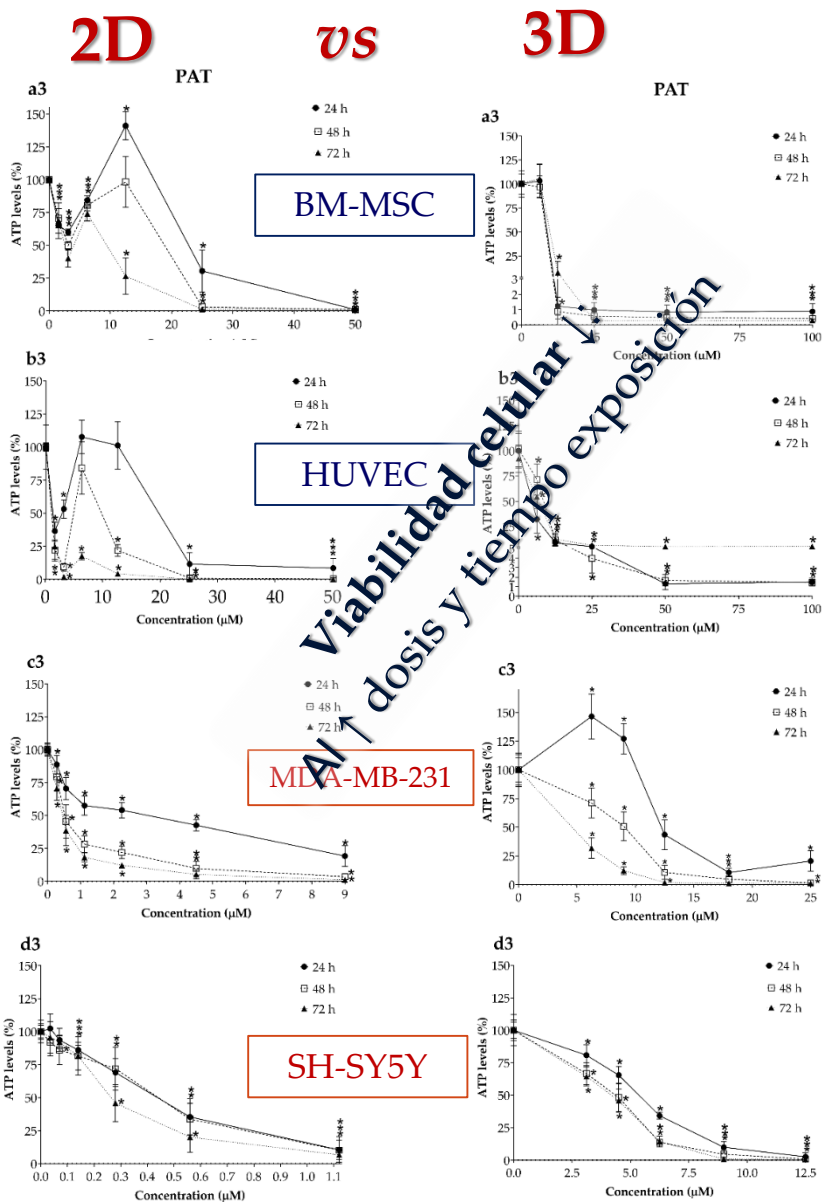
Las líneas tumorales más sensibles.

Línea SH-SY5Y la más sensible.

Modelos 3D:

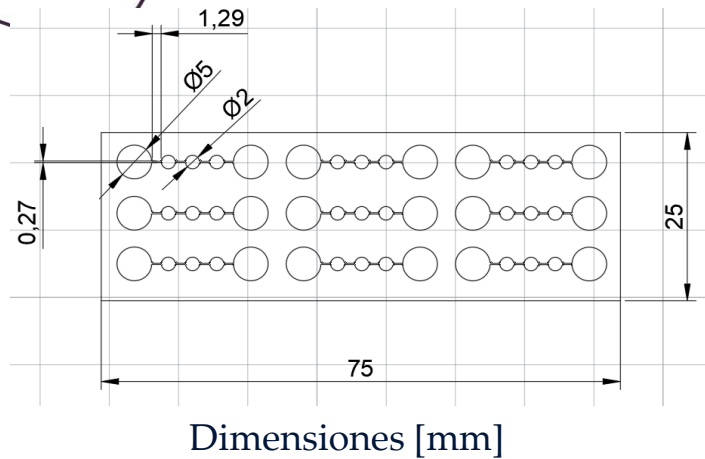
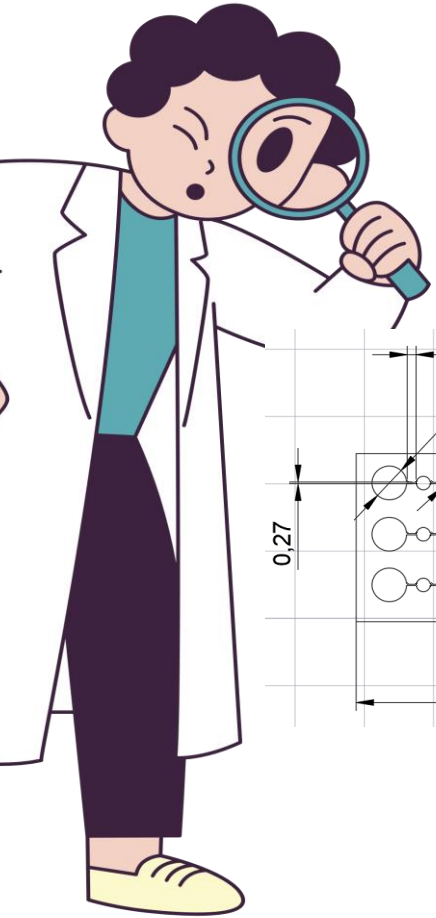
Resultados similares en todas las líneas celulares.

Variación de los resultados

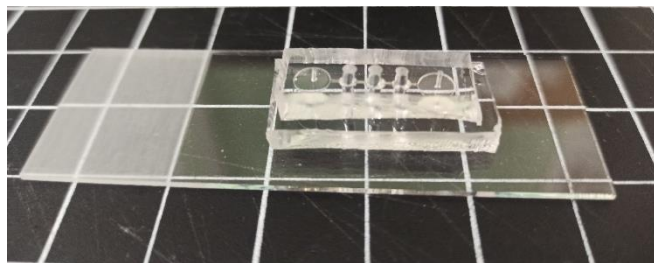


BM-MSC (Células madre mesenquimales de médula ósea), HUVECs (Células endoteliales de la vena umbilical), MDA-MB-231 (células epiteliales de cáncer de mama), SH-SY5Y (cells de neuroblastoma humano)

Patulina: estático *vs* dinámico



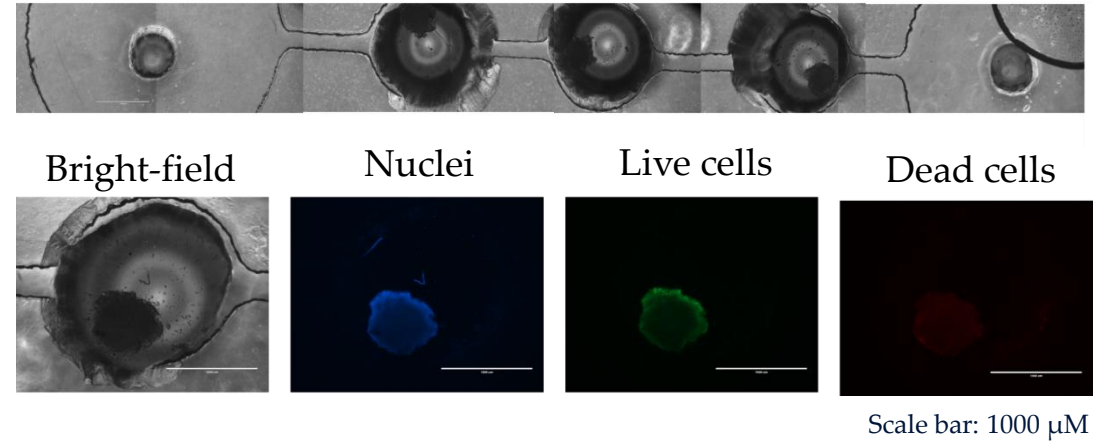
↓
Doble capa
Pretratamiento con plurónico



Ensayo Live/Dead

Esferoides de células SH-SY5Y

✓ Validación biológica

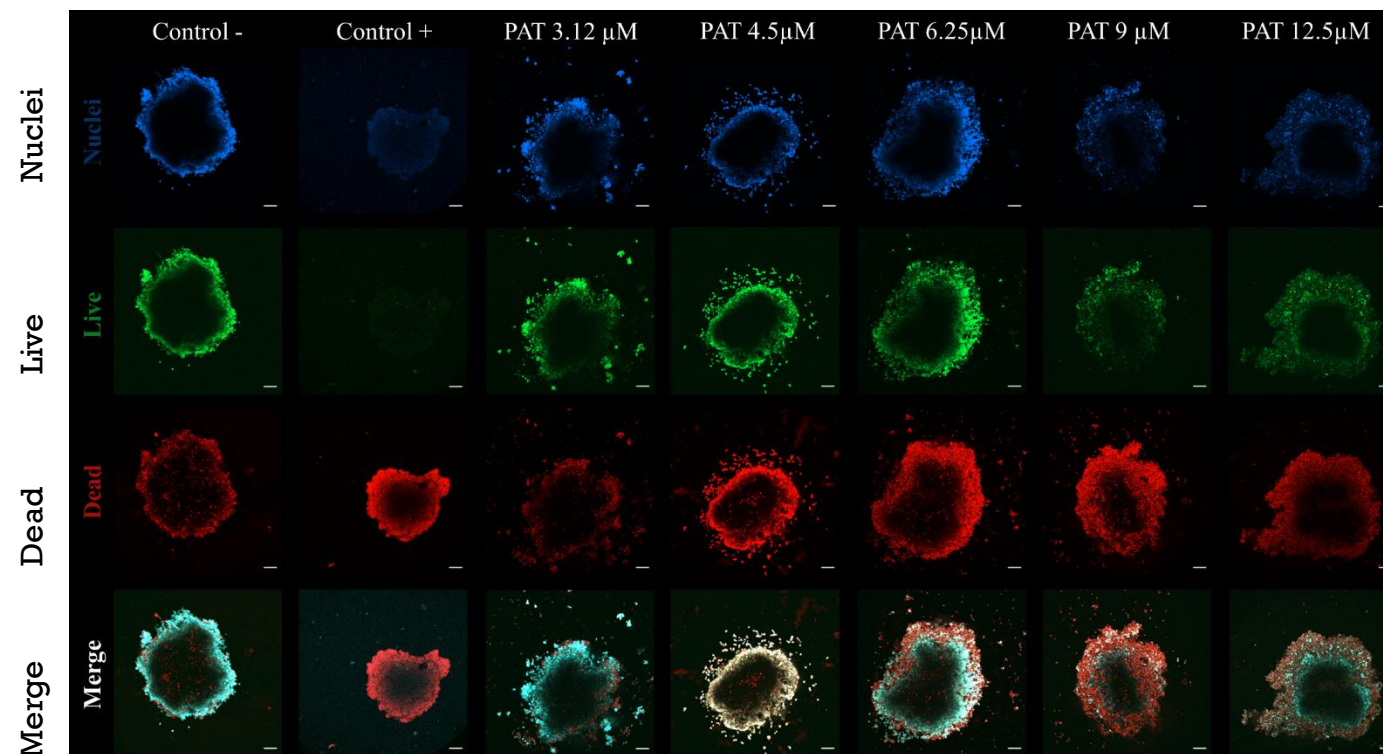


✓ Validación del dispositivo de microfluídica dinámico

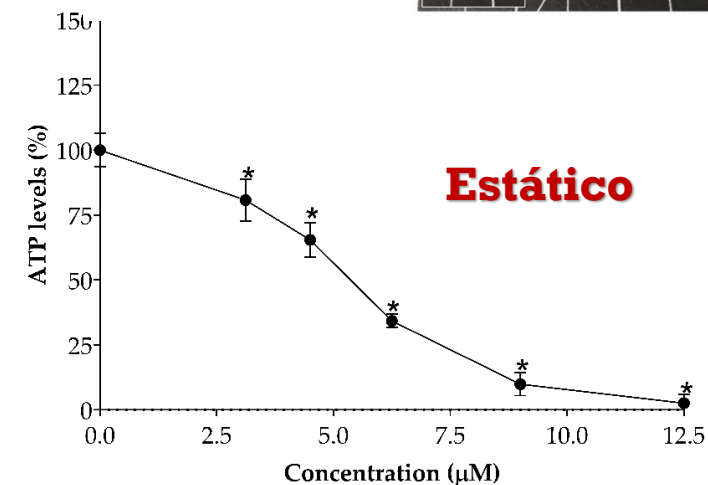
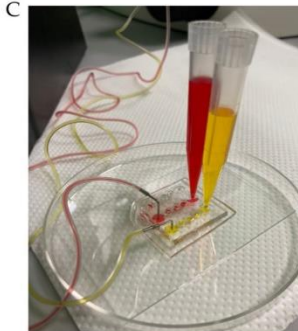
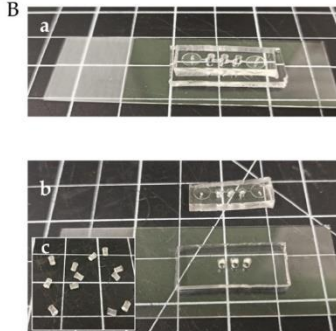
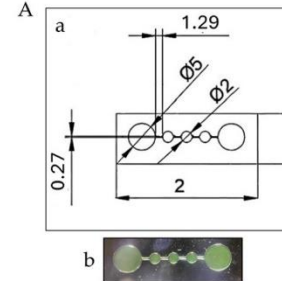


Velocidad fluido: 1 μ l/min

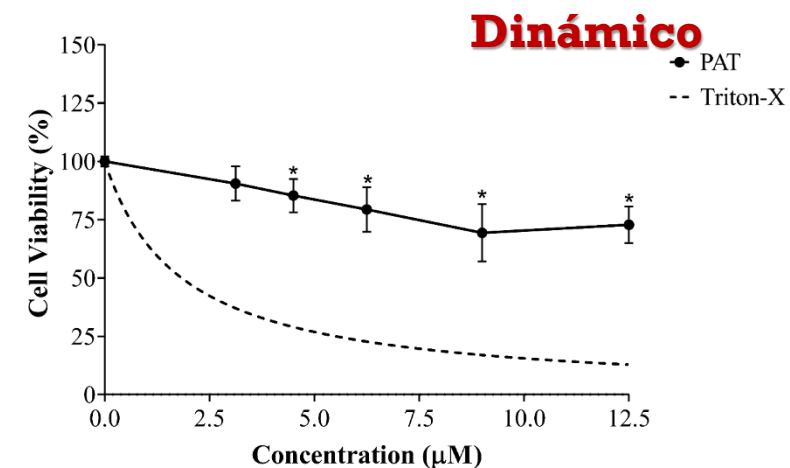
Resultados Patulina: estático vs dinámico



Los esferoides en sistema microfluídico estático son más sensibles a la patulina



$IC_{50} = 4,93 \mu$ M



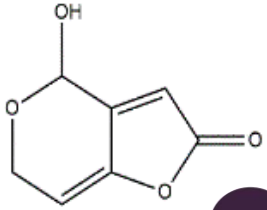
$[C_{50} > 12,5 \mu$ M

CONCLUSIONES PATULINA

- Los efectos observados en modelos en monocapa no son reproducibles en esferoides, además de diferir dependiendo de la líneas celulares.
- La ausencia de una organización tridimensional en sistemas 2D puede conducir a una sobreestimación de la toxicidad celular
- Las líneas celulares no tumoral mostraron mayor efecto citotóxico, lo que sugiere que estas células subestiman la toxicidad de la patulina.
- La toxicidad de las micotoxinas no puede predecirse únicamente sobre los efectos observados en un modelo unicelular.

Estudio:

- **Toxina T-2:**



- ✓ Líneas celulares:
 - *Células de hepatocarcinoma humano, HepG2*
 - *Células Lieming Xu-2, LX2*
- ✓ Modelos celulares: 3D esferoides
 - Monocultivo
 - Co-cultivo
- ✓ Condiciones de exposición en dispositivo microfluídico
 - Estático

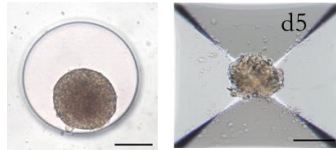
Estudio:

• Toxina T-2:



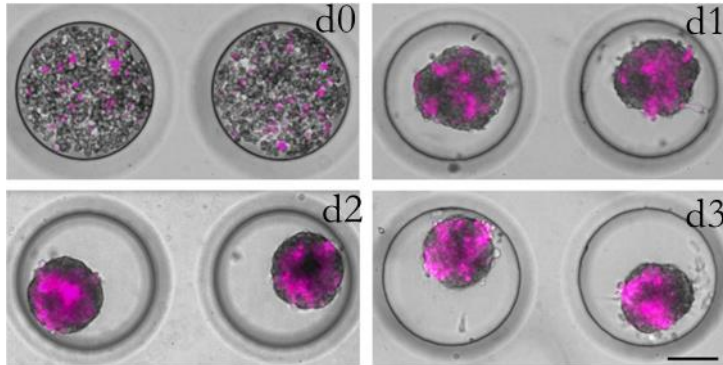
HepG2

Monocultivo



HepG2-LX2
(85%-15%)

Co-cultivo



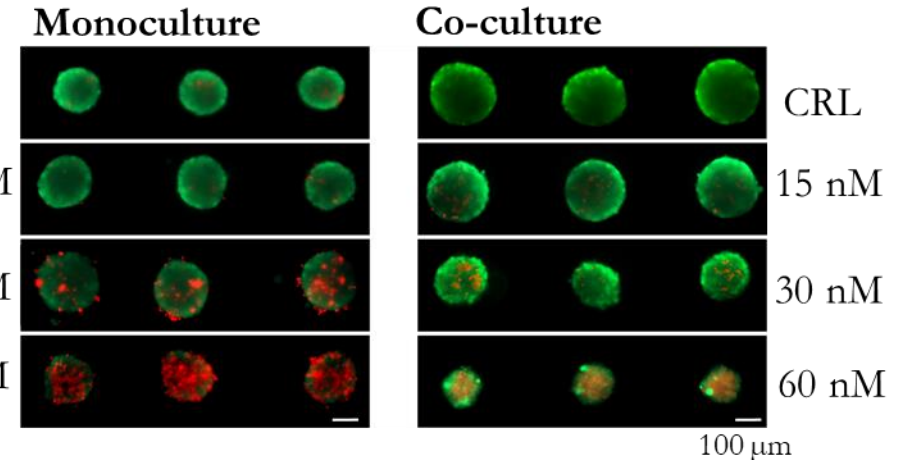
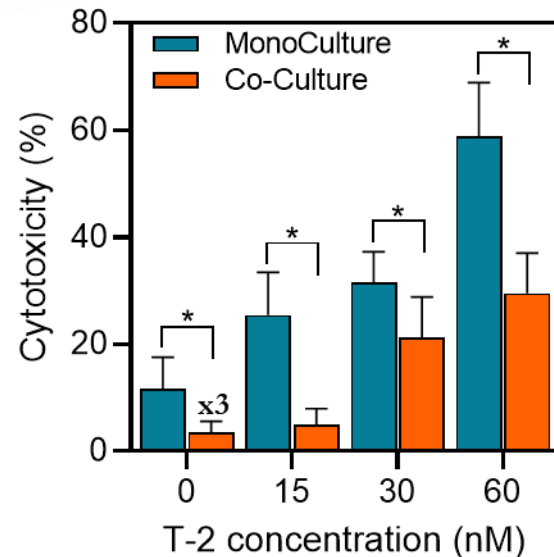
LX2 → Vybrant DiD

100 μm

Resultados Toxina T-2 en esferoides: monocultivo vs co-cultivo

Ensayo Live/Dead

Citotoxicidad celular:
↑ con la dosis



$$\text{Cytotoxicity \%} = 100 \times \frac{A_{\text{red}}}{(A_{\text{green}} + A_{\text{red}})}$$

MATLAB

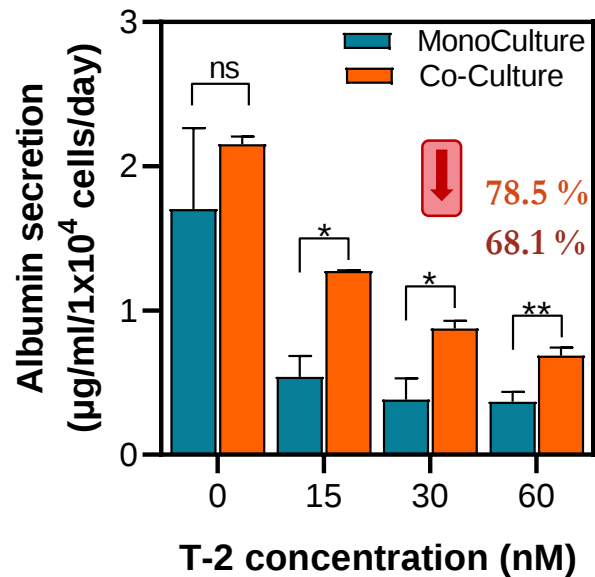
**Co-cultivo menor
efecto tóxico.
Las células LX2
mejoran fenotipo y
funciones hepáticas:
viabilidad celular**

Estudio:

- Toxina T-2:

Ensayo de albumina

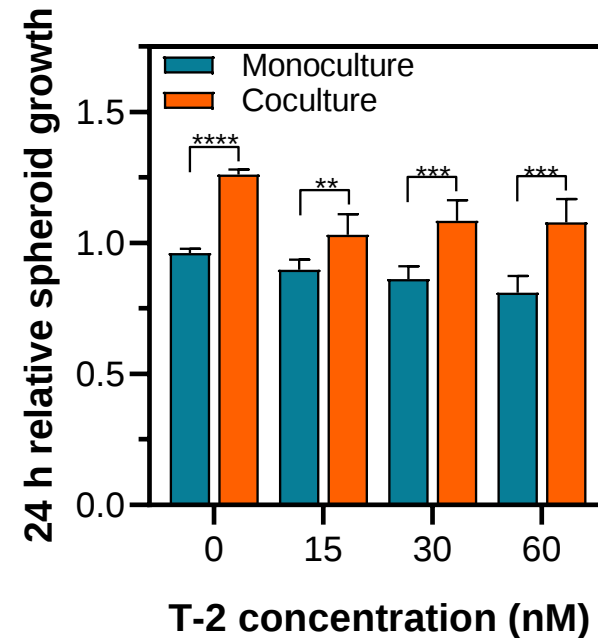
ELISA kit



Los esferoides en co-cultivos son más funcionales

Resultados Toxina T-2 en esferoides: monocultivo vs co-cultivo

Análisis de crecimiento de los esferoides



ImageJ

Mayor disminución del crecimiento del esferoides en monocultivo

* $p < 0.05$, *** $p\text{-value} < 0.001$, **** $p\text{-value} < 0.0001$.

CONCLUSIONES TOXINA T-2

- Los estudios con esferoides en co-cultivos en dispositivos microfluidicos estáticos incorporan un sistema más avanzado y complejo que representa mejor la funcionalidad de los tejidos y órganos hepáticos.
- Este modelo permite obtener una mejor comprensión de la respuesta hepatotóxica celular de la toxina T-2.

CONCLUSIONES FINALES

- Nuestros estudios demuestran el papel clave y la influencia de los modelos de cultivo celulares en el campo de la toxicología *in vitro*.
- La evaluación de la citotoxicidad en modelos avanzados *in vitro* como los esferoides en dispositivos microfluidicos y esferoides en co-cultivo permiten una mejor reproducción de la fisiología de los tejidos y órganos, así como estimar con mayor precisión el efecto tóxico por exposición a las micotoxinas.

LIMITACIONES

- Falta de mayor complejidad.
- Dificultades de normalización, control de calidad y validación.
- Extrapolación *in vitro-in vivo*.

FINANCIACIÓN Y COLABORACIONES



Grant PID2020-11587RB-100



Dr. J.M. de Hoyos Vega
Department of Physiology
and Biomedical Engineering
Mayo Clinic (Rochester,
Minnesota)



Facultat de Farmàcia i
Ciències de l'Alimentació



Grant APOSTD/2022;
Ref.CIAPOS/2021/228



Financiado por la
Unión Europea
NextGenerationEU



European Research Council
Established by the European Commission

Starting Grant – MICRONEX UER17_01



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
INDUSTRIALE



Miembros del grupo RiskTox

- ***Dra. Veronica Zingales***
- ***Dra. Mercedes Taroncher***
- Dña. Carmen Martínez
- D. Felipe Franco
- Dra. Mónica Fernandez-Franzón
- Dra. Houda Berrada Ramdani
- Dr. Yelko Rodríguez-Carrasco
- Dra. Josefa Tolosa Chelós
- Dra. Cristina Fuentes
- Dña. Martina Sánchez Contreras



Nuevas perspectivas de los modelos de cultivo celular
en la evaluación tóxica de las micotoxinas: de los
modelos 2D a los 3D y los dispositivos microfluídicos

Dra. María José Ruiz
Grupo RiskTox - UV

¡Muchas Gracias!

