

Relación entre la concentración citotóxica 50 y la reparación de ADN expuestas a plomo

Minerva Martínez-Alfaro², Yolanda Alcaraz-Contreras², Roberto Carlos Gutiérrez-Hernández¹, Karla Jaime-Rodríguez¹, Mauricio Alejandro García-Castillo¹, Ana Yadhira González-Chávez¹, Ana Fernanda Hernández Mora¹,

¹Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato

²Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. alfarom@ugto.mx², yolaalca@ugto.mx²

Resumen

Los medicamentos, cosméticos, alimentos y las sustancias que entran en contacto directo con el cuerpo deben ser evaluadas para determinar si pueden causar efectos nocivos en humanos. Esta evaluación comienza con estudios en células en cultivo. Las sustancias tóxicas alteran el metabolismo celular y reducen la capacidad de reproducción de las células. La dosis que reduce en un 50% la población de las células se denomina dosis citotóxica 50 (Adan et al., 2016). Otro parámetro que se evalúa en las células en cultivo es la capacidad de inducir daño al ADN. Esta propiedad está directamente relacionada con la actividad mutagénica de las sustancias y por lo tanto con la posibilidad de inducir cáncer en humanos (Kirkland et al., 2019). El plomo es una sustancia probablemente carcinógena y está presente en las pinturas, baterías, tintes y barro vidriado. En este trabajo evaluamos la dosis citotóxica 50 en 2 líneas celulares: neuroblastos y fibroblastos. Nuestros resultados demostraron que los neuroblastos son más sensibles que los fibroblastos, a la exposición durante 24 horas de plomo, y explica los efectos neurotóxicos del plomo. Sin embargo, nuestros experimentos no pueden explicar la causa de esta mayor sensibilidad.

Palabras clave: Citotoxicidad, plomo, neuroblasto, fibroblasto, IC50

Introducción

La evaluación de las sustancias comienza con estudios en líneas celulares. En estos estudios se evalúa la capacidad de las sustancias de reducir la capacidad de reproducción de las células. Esta propiedad se determina haciendo crecer las células en presencia de la sustancia a evaluar. Si la presencia de la sustancia reduce la capacidad de reproducción de las células, es probable que pueda causar efectos adversos en las personas. La dosis que reduce en un 50% la capacidad de reproducción de las células se denomina dosis citotóxica 50 (Adan et al., 2016).

Otro parámetro que se evalúa en las células en cultivo es la capacidad de inducir daño al ADN. Esta propiedad está directamente relacionada con la actividad mutagénica de las sustancias y por lo tanto con la posibilidad de inducir cáncer en humanos (Kirkland et al., 2019).

La concentración citotóxica 50 es la concentración de una sustancia que reduce la viabilidad de las células expuestas al 50% en comparación con células no expuestas a esta sustancia. La evaluación de la concentración citotóxica es uno de los parámetros de evaluación toxicológica que nos permite determinar si una sustancia es adecuada para su uso en humanos. Las sustancias muy tóxicas tienen concentraciones citotóxicas muy pequeñas del orden de los micromoles.

Otro de los parámetros evaluados es la genotoxicidad de las sustancias. Este parámetro evalúa la capacidad de dañar al ADN de las células. El daño al ADN puede desencadenar cáncer.

Estos dos parámetros se evalúan de manera rutinaria para determinar la toxicidad de sustancias como medicamentos, alimentos o insecticidas que estarán en contacto con humanos. En este trabajo evaluaremos si la dosis citotóxica es diferente entre 2 líneas celulares.

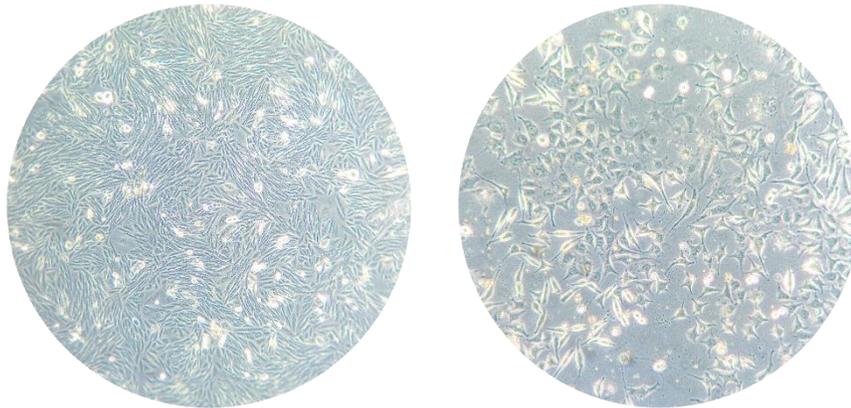


Figura 1. *Imágenes microscópicas de células SH-SY5Y neuroblastos (izquierda) y L929 fibroblastos (derecha) cultivadas en condiciones normales. SH-SY5Y muestran una morfología característica con cuerpos celulares redondeados y prolongaciones neuronales. L929 presentan una forma más alargada y adherente.*

Metodología

Se utilizaron células de la línea SH-SY5Y y L929, medio de cultivo medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich: R8758) adicionado con rojo de fenol suplementado con suero bovino fetal al 10 %, acetato de plomo trihidratado (Sigma-Aldrich: 915440), kit CyQUANT™ XTT Cell Viability Assay Invitrogen™ (X12223).

Preparación de las Soluciones de Plomo

Un stock de acetato de plomo de 100 mM se preparó disolviendo la cantidad adecuada del compuesto en agua destilada estéril. Para generar la serie de concentraciones utilizadas en los experimentos, se preparó una solución intermedia de 5 mM disolviendo un volumen específico del stock de 100 mM con medio de cultivo. A partir de esta solución de 5 mM, se realizaron diluciones seriadas para obtener las concentraciones finales de 4, 3, 2.25, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 y 0.125 mM. Todas las soluciones se prepararon y almacenaron bajo condiciones estériles para evitar la contaminación.

Siembra y exposición a plomo

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se sembró en medio de cultivo completo y mantenidos a una temperatura de 37 °C bajo una atmósfera humidificada de 95 % aire y 5% CO₂ [5]. Mantener y cultivar las células SH-SY5Y y L929 en sus respectivos medios de cultivo hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Tripsinizar y contar las células utilizando un hemocitómetro para tener una suspensión celular con concentración de 100,000 células/mL. Sembrar 100 µL de suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos. Incubar las placas durante 24 horas para permitir la adherencia y el crecimiento de las células. La exposición a plomo se realiza retirando el medio de cultivo a las células y añadiendo medio de cultivo con distintas concentraciones de plomo. Se incubaron las células con las soluciones de plomo durante 24 horas en la incubadora de CO₂.

Ensayo de viabilidad celular

Se preparo el reactivo de trabajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, añadiendo 70 µL a toda la placa. Se incubaron las placas durante 4 horas en la incubadora de CO₂. Se midió la absorbancia a 450 nm y 660 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas.

Resultados

En este estudio, se evaluó la citotoxicidad del plomo en dos líneas celulares distintas: SH-SY5Y (neuroblastoma humano) y L929 (fibroblasto de ratón). Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de plomo para determinar su viabilidad celular utilizando el ensayo CyQUANT™ XTT. Este ensayo mide la actividad metabólica celular, permitiendo calcular la concentración inhibitoria media (IC50) de plomo para cada línea celular. A continuación, se presentan los resultados obtenidos del espectrofotómetro, los cuales proporcionan información crucial sobre la dosis citotóxica del plomo en ambas líneas celulares.

Se realizó el cálculo de la absorbancia específica mediante la resta de la lectura a 660 nm a la de 450 nm. Con la absorbancia específica, se determinó el promedio de las absorbancias y la desviación estándar. Posteriormente, los resultados se graficaron para visualizar la relación entre la concentración de plomo y la viabilidad celular en ambas líneas celulares.

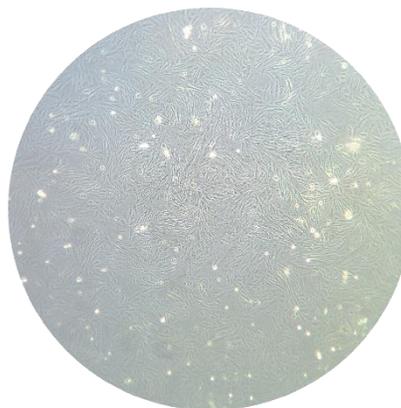
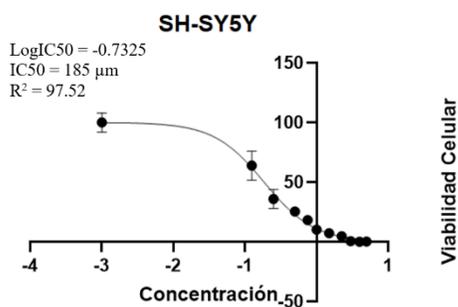


Figura 2. IC50 de neuroblastos. Gráfica que muestra la relación entre la viabilidad celular y la concentración de plomo. Se ilustra cómo la viabilidad celular disminuye con el incremento de la concentración de plomo, reflejando el impacto del plomo en la actividad mitocondrial y la salud celular.

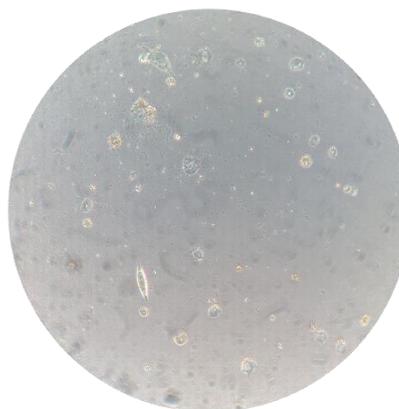
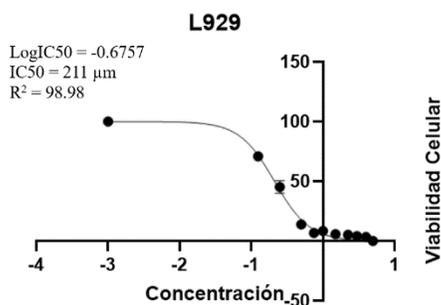


Figura 2. IC50 Fibroblastos. Gráfica que muestra la relación entre la viabilidad celular y la concentración de plomo en células L929. A diferencia de las células SH-SY5Y, las células L929 muestran una menor disminución en la viabilidad celular con el aumento de la concentración de plomo, reflejando su mayor resistencia al estrés inducido por plomo.

Discusión

El órgano más afectado por la exposición a plomo en los humanos es el cerebro. En nuestros experimentos hemos demostrado que uno de los factores es una mayor susceptibilidad de los neuroblastos a los efectos tóxicos del plomo, al presentar una IC50 menor que la de fibroblastos. La dosis citotóxica 50 encontrada es aproximada a otra encontrada en neuroblastos de ratón de 50 μM en 24 hrs (Choi et al., 2011). El plomo está clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer como probable carcinogénico. En uno de nuestros trabajos anteriores demostramos que el plomo es capaz de inducir ruptura del ADN en ratas expuestas a plomo (Alcaraz-Contreras et al., 2016; Martínez-Alfaro et al., 2012). Se sabe que el plomo tiene varios mecanismos de toxicidad los más documentados son la producción de estrés oxidativo, el desplazamiento de metales endógenos y la producción de inflamación. Se piensa que el desplazamiento de metales endógenos es el responsable de la disminución de la capacidad de reparación del ADN lo que resulta en un daño al ADN que observamos en otro trabajo de nuestro grupo. También se tienen evidencias de que uno de los mecanismos de toxicidad mitocondrial produce estrés oxidativo, esto se debe a que el plomo desplaza el calcio de la mitocondria (Han et al., 2021). Al ser el plomo considerado actualmente entre los 10 tóxicos más peligrosos por sus efectos a la salud (WHO, 2019). Consideramos necesario la realización de un manual y un cartel que puedan difundir a la comunidad los efectos de la exposición a este metal.

El plomo es conocido por inducir estrés oxidativo, un proceso que puede alterar la función mitocondrial. La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a la exposición al plomo puede llevar a la disfunción mitocondrial, afectando la capacidad de las mitocondrias para reducir el XTT. Esto podría resultar en una subestimación de la viabilidad celular si las células expuestas al plomo están vivas, pero tienen una actividad mitocondrial comprometida. Por lo tanto, es crucial considerar que la reducción del XTT mide principalmente la actividad mitocondrial y no necesariamente la viabilidad celular en su totalidad. De esta forma, la interferencia de otros factores, como el estado redox de la célula y la presencia de compuestos reductores u oxidantes, puede influir en los resultados del ensayo. En el contexto de estrés oxidativo inducido por plomo, se podría observar una disminución en la señal del XTT no por muerte celular, sino por una reducción en la actividad mitocondrial que podría ser reversible si el estrés es removido o mitigado.

Sin embargo, el estrés oxidativo también puede afectar la reproducción celular, resultando en una menor tasa de crecimiento y confluencia celular. La técnica del ensayo de viabilidad, como el XTT, se limita a medir la viabilidad celular basada en la actividad mitocondrial, sin proporcionar información sobre la cantidad total de células presentes. Por lo tanto, una reducción en la actividad mitocondrial observada en el ensayo de XTT podría reflejar una disminución en la proliferación celular y la confluencia, en lugar de una simple disminución en la viabilidad celular.

El estrés oxidativo inducido por plomo podría alterar el equilibrio redox de la célula y afectar la presencia de compuestos reductores u oxidantes, influenciando así los resultados del ensayo de XTT. Es fundamental considerar que una reducción en la actividad mitocondrial no siempre equivale a una disminución de la viabilidad celular. Las células expuestas al plomo podrían aún estar vivas, pero con una función mitocondrial comprometida. Este compromiso podría ser reversible si se eliminan o mitigan las condiciones estresantes, sugiriendo que las observaciones de viabilidad celular deben interpretarse con cautela en el contexto de la actividad mitocondrial y el estrés oxidativo.

Bibliografía/Referencias

- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol*, 17(14), 1213-1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- Alcaraz-Contreras, Y., Mendoza-Lozano, R. P., Martinez-Alcaraz, E. R., Martinez-Alfaro, M., Gallegos-Corona, M. A., Ramirez-Morales, M. A., & Vazquez-Guevara, M. A. (2016). Silymarin and dimercaptosuccinic acid ameliorate lead-induced nephrotoxicity and genotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol*, 35(4), 398-403. <https://doi.org/10.1177/0960327115591373>
- Choi, W. S., Kim, S. J., & Kim, J. S. (2011). Inorganic lead (Pb)- and mercury (Hg)-induced neuronal cell death involves cytoskeletal reorganization. *Lab Anim Res*, 27(3), 219-225. <https://doi.org/10.5625/lar.2011.27.3.219>
- Han, Q., Zhang, W., Guo, J., Zhu, Q., Chen, H., Xia, Y., & Zhu, G. (2021). Mitochondrion: a sensitive target for Pb exposure. *J Toxicol Sci*, 46(8), 345-358. <https://doi.org/10.2131/jts.46.345>
- Kirkland, D., Uno, Y., Luijten, M., Beevers, C., van Benthem, J., Burlinson, B., Dertinger, S., Douglas, G. R., Hamada, S., Horibata, K., Lovell, D. P., Manjanatha, M., Martus, H. J., Mei, N., Morita, T., Ohyama, W., & Williams, A. (2019). In vivo genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International workshop on genotoxicity testing (IWGT). *Mutat Res*, 847, 403035. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.03.008>
- Martinez-Alfaro, M., Hernandez-Cortes, D., Wrobel, K., Cruz-Jimenez, G., Rivera-Leyva, J. C., Pina-Zentella, R. M., & Carabez Trejo, A. (2012). Effect of melatonin administration on DNA damage and repair responses in lymphocytes of rats subchronically exposed to lead. *Mutat Res*, 742(1-2), 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.011>
- WHO. (2019). *Lead poisoning and health*. World Health Organization. Retrieved 28 april from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>