

# DESARROLLO DE MÉTODO DE EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD UTILIZANDO CÉLULAS DE MAMÍFERO

Sara Reidel, Martín Blasco, María Laura Matos  
 Centro de Investigación y Desarrollo en Biotecnología Industrial-INTI  
 sreidel@inti.gov.ar

## Introducción

El ensayo de citotoxicidad forma parte de un conjunto de ensayos utilizados en el estudio del efecto de materiales y/o compuesto sobre el crecimiento, duplicación y morfología de células con el objetivo de definir su inocuidad para el epitelio humano.

La evaluación de la citotoxicidad mediante observación de morfología y cuantificación de actividad biológica ofrece una alternativa simple, rápida y de alta sensibilidad. Además es una de las técnicas propuestas para disminuir el uso de animales en pruebas toxicológicas.

La *International Standard Organization* (ISO) en su norma 10993-5 propone tres variantes de ensayos para evaluar la citotoxicidad; utilizando extractos, mediante contacto directo o contacto indirecto con el material. En estas tres variantes, la evaluación de la viabilidad celular se realiza utilizando un indicador de la actividad deshidrogenasa mitocondrial, el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y un acoplante de la transferencia de electrones, el 5-metilsulfato de metilfenazinio (PMS)<sup>1</sup>.

Como compuestos modelo de citotoxicidad la norma propone el dodecilsulfato de sodio (SDS) como compuesto citotóxico soluble, mientras que sugiere el látex como material conteniendo lixiviables citotóxicos, para ensayos de citotoxicidad precedidos de extracción<sup>2</sup>.

En el presente artículo se presenta la puesta a punto del ensayo de evaluación de la citotoxicidad mediante MTS-PMS y observación microscópica de los cultivos.

El comportamiento típico de un material citotóxico en un ensayo de este tipo es la disminución de la viabilidad celular del 30 % respecto de un control sin tratamiento (Figura 1).

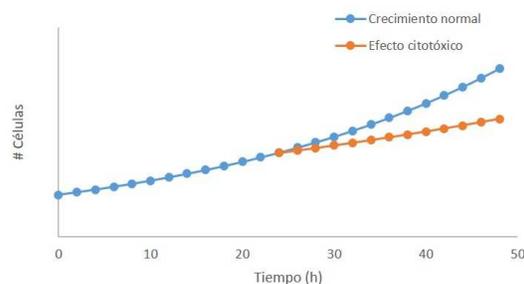


Figura 1: Perfil de respuesta esperado para el crecimiento de células (serie azul) y el tratamiento con un agente citotóxico a partir de las 24 h de cultivo (serie naranja).

## Objetivo

Validación y puesta a punto de un ensayo simple y rápido que permita evaluar la citotoxicidad de elementos y compuestos para aplicaciones susceptibles a compuestos citotóxicos (por ej. elementos en contacto con alimentos, tejidos, células).

## Descripción

El estudio del ensayo se realizó mediante un diseño factorial de tres factores y cuatro niveles, los factores fueron: número de células iniciales (5000, 10000, 15000, 20000), concentración del MTS-PMS (0,25; 0,5; 0,75; 1X) y horas de incubación (1; 2; 3; 4 h). Adicionalmente se evaluaron tiempos intermedios (1,5; 2,5 h).

### Cultivo de células (viabilidad control)

Las células VERO se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con antibiótico, antimicótico y 10% de suero fetal bovino (DMEM-C-SFB). En la primera etapa (G1), las células se sembraron a razón de  $5 \times 10^4$  células/pocillo en placa de 96 pozos (p96) y se cultivaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$   $24 \pm 2$  hs. En una segunda etapa (G2), se reemplazó el medio y se incubaron por  $24 \pm 2$  hs. Finalmente se evaluó la morfología al microscopio y la viabilidad mediante MTS-PMS.

### Método de detección

El MTS reducido por las deshidrogenasas de las células metabólicamente activas produce un formazan detectable a  $490 \text{ nm}^1$ . Se optimizaron las condiciones del ensayo evaluando la correlación y sensibilidad entre el número de células y la respuesta (Abs  $490 \text{ nm}$ ). Adicionalmente, se evaluó el resultado obtenido con el valor esperado, de los puntos críticos en el ensayo de citotoxicidad.

### Desarrollo del ensayo

Como control positivo del ensayo se utilizaron diluciones de dodecilsulfato sódico (SDS; Grado electroforesis, Bio Rad) de modo de determinar la concentración inhibitoria 50 (CI50).

Para el control negativo (VC) las células se trataron con DMEM-C-SFB fresco.

El blanco consistió en DMEM-C-SFB incubado en pocillos sin células siguiendo el esquema del ensayo (G1 y G2).

Para ambos controles, se utilizará el intervalo de confianza 95 (IC95) como criterio de aceptación del ensayo.

Para evaluar compuestos de contacto directo, se prepararon diluciones con DMEM-C-SFB y se aplicaron en la etapa G2.

#### Extracción y ensayo de lixiviables

Los extractos se obtuvieron poniendo en contacto dentro de un contenedor no citotóxico 1,0 ml de DMEM-C-SFB con el material a estudiar a 37°C, con agitación lineal (2 hz) durante por 24 ± 2 hs.

Los extractos y sus diluciones seriadas al medio en DMEM-SFB se utilizaron como medio en la etapa G2.

El control positivo para la extracción de lixiviables del material citotóxico se realizó con discos de 6 cm<sup>2</sup> de guantes de látex (Coronet® Seiseme S.A.). En este ensayo, la norma indica que la dilución al medio del extracto debe arrojar una viabilidad mayor o igual a la del extracto original<sup>2</sup>.

#### Cálculo de la viabilidad celular

La "viabilidad relativa" porcentual a las células creciendo en DMEM-C-SFB, rotuladas como "Control negativo" (VC), se calculó según la ec. 1.

$$VR = \frac{a-b}{c-b} \times 100 \text{ (Ec. 1)}$$

Donde,

a es absorbancia de la muestra

b es absorbancia del blanco

c es absorbancia del control negativo.

El control negativo se realizó 12 veces por ensayo. Los ensayos de las muestras se realizan por triplicado, utilizándose el promedio para los cálculos.

## Resultados

### Método de detección

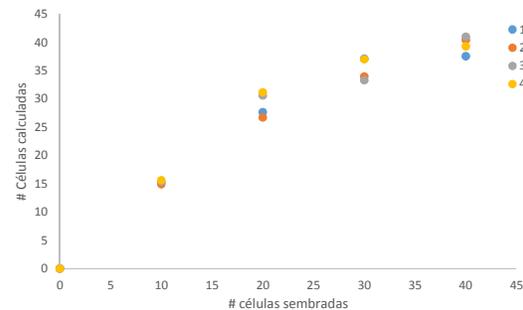


Figura 2: Perfil de respuesta para número final de células sembradas a partir de recuento y posterior dilución (revelado con MTS 1X). Cada serie representa un tiempo de incubación en horas.

La respuesta del método al número de células (Figura 2) indica que en la medida que aumenta

el número de células la sensibilidad analítica (pendiente) disminuye. Esto impone una restricción al número de células al momento de definir las condiciones óptimas del ensayo. Es Entre 10000 y 20000 células la sensibilidad resulta máxima, mientras que incubando dos horas se obtiene la dispersión mínima del número de células calculado (resultados no mostrados). Por otro lado, en estas condiciones se observa mayor exactitud en la relación de número de células calculadas y el número de células sembradas. El efecto de la disminución de la concentración de MTS produjo una disminución en la sensibilidad analítica y un aumento en la dispersión (resultados no mostrados).

#### Control de calidad del ensayo

El IC95 del control negativo resultó en el rango 1,17-1,32 (unidades de absorbancia). Mientras que para la CI50 del control positivo (SDS) dicho intervalo resultó 0,144- 0,159 (mg/ml).

#### Control de extracción

La evaluación de la citotoxicidad de los lixiviables del latex indica que las diluciones 1/16 y 1/32 serían adecuadas para el control del ensayo (figura 3).

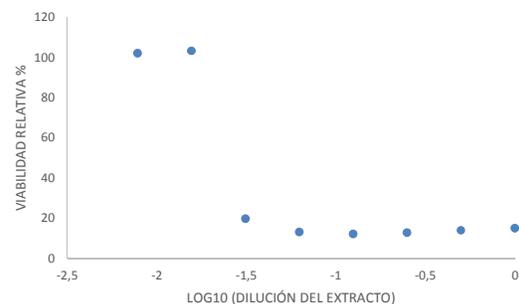


Figura 3: Perfil representativo de la viabilidad relativa porcentual en función del log<sub>10</sub> de la dilución del extracto del látex.

## Conclusiones

Teniendo en cuenta la respuesta, dispersión y exactitud de los resultados, las condiciones del ensayo se definieron en: 5000 células iniciales, 2 horas de incubación, MTS 1X.

Se desarrolló un método de cuantificación de citotoxicidad para materiales y compuestos ampliando la oferta tecnológica del Centro de Biotecnología Industrial y potenciando las capacidades del INTI en el desarrollo de soluciones tecnológicas integrales para aplicaciones en humanos y otros animales.

## Bibliografía

1. Barltrop, J.A. et al. (1991) Bioorg. Med. Chem. Lett.1, 611-4.
2. ISO 10993:2009-5; ISO 10993:2004-12