

Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola ^{1*}, Luis Alfredo Rosario Fernández ^{2*},
Dayisell Lazara Curveco Sánchez ^{3**}.

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia

²Licenciado en Microbiología

³Técnico Medio en Farmacia.

*Centro de Química Farmacéutica (CQF), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa,

Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

**Centro de Productos Naturales (CPN, CNIC), Calle 198 e/19 y 21, Atabey, Playa,

Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. Diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. El objetivo de este trabajo es dar una visión panorámica sobre los principales ensayos usados para determinar el efecto citotóxico de una sustancia, y realizar algunas consideraciones para cada uno de los ensayos y su utilidad. Se tuvieron en cuenta los ensayos clásicos para determinar citotoxicidad, tales como el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el de reducción del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT). Este trabajo analiza las ventajas y desventajas de cada método desde nuestra experiencia teórico-práctica en el tema, considerando que puede ser de utilidad para investigadores que trabajan en esta rama de la toxicología experimental *in Vitro*.

Palabras clave: Citotoxicidad, captación del rojo neutro, azul de kenacid, MTT, *in vitro*.

Abstract

Principal assays that to determine the citotoxicity of a substance, some considerations and their utility.

The cellular citotoxicity is defined like an alteration of the cellular basic functions, that it bears to a damage that can be detected. Different authors have developed batteries of *in vitro* tests to predict the toxic effects of some drugs and chemical compounds, using as experimental models the primary cultivations and isolated organs as established cellular lines. The aim of this work is to give a panoramic on the main assays used to determine the citotoxic effect of a substance, as well as some considerations to be carried out each one of the assays and their utility. They were kept in mind the classic assays to determine citotoxicity, such as neutral red release assay, to

tie the kenacid blue assay and lastly the reduction of Bromide of dimetil-difenil-tetrazolium assay (MTT). This paper discusses the advantages and disadvantages of each method from our theoretical and practical experience in the issue, believing that it can be useful for researchers working in this branch of experimental in vitro toxicology.

Key words: Citotoxicity, neutral red release, blue of kenacid, MTT, *in vitro*.

Introducción

El término "alternativa a la experimentación animal" puede llevar a confusión y sugerir que se refiere sólo a aquellos métodos que los sustituyen en la investigación, como, por ejemplo, los métodos *in vitro*. En realidad, se consideran bajo este concepto todos aquellos que cumplen con alguno de los postulados del principio de las tres R.¹ Este principio surgió en 1959, cuando Russell y Burch publicaron el libro "*The Principles of Humane Experimental Technique*". Las tres R se refieren a *reemplazar* los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, *reducir* su número cuando sea necesario utilizarlos y *refinar* las técnicas para aminorar su sufrimiento. Según dichos autores, lo ideal es reemplazar los animales por otros métodos, aunque, en muchos casos, por la necesidad de experimentar con ellos, sólo se pueda aspirar a la reducción y el refinamiento.²

En la actualidad, la toxicología alcanza enorme trascendencia social debido al importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental. Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos: es el caso de la llamada "toxicología reguladora", rama dentro de la toxicología que se dedica a la legalización y armonización de todos los protocolos e informes de sustancias tóxicas a partir de normativas legales, disposiciones ministeriales por propia iniciativa o como cumplimiento de recomendaciones o directrices de organismos internacionales los cuales producen un extenso cuerpo legal de raíz toxicológica, ampliamente conocidas.

Como justificación de la toxicología alternativa, se suele dar el alto costo de los estudios *in vitro* y la presión de las sociedades de protección de los animales de experimentación.³

Dentro de la batería de ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular.⁴

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado.⁴ A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).⁵

El objetivo de este trabajo es dar una visión panorámica sobre los principales ensayos usados para determinar el efecto citotóxico de una sustancia, y realizar algunas consideraciones para cada uno de los ensayos y su utilidad. Se tuvieron en cuenta para cada uno de los ensayos las ventajas y desventajas desde nuestra experiencia teórico-práctica en el tema, considerando que puede ser de utilidad para investigadores que trabajan en esta rama de la toxicología experimental *in vitro*

Desarrollo

1. Ensayo de captación del rojo neutro.

Esta prueba es una medida de la toxicidad de un compuesto a corto o largo término, determinado por la liberación de un colorante (rojo neutro) debido a la pérdida de la viabilidad celular.

Este trabajo está basado en el hecho de considerar que un compuesto es citotóxico independientemente de su mecanismo de acción, si interfiere en el proceso de división y multiplicación celular. Ello conlleva a una reducción de la velocidad de crecimiento celular reflejándose en el número de células presentes en el cultivo. El grado de inhibición del crecimiento relacionado con la concentración del compuesto que se evalúa es un índice de toxicidad.⁶

El rojo neutro es captado por las células (específicamente por los lisosomas y endosomas) y en la medida que la célula pierda viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa se libera al medio el colorante pues solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior. Seguidamente se determina la cantidad de rojo neutro que permanece después de la exposición dentro de la célula y calculada la concentración que produce la inhibición del 50 % del crecimiento celular.⁷

Las células deben ser conservadas en condiciones de esterilidad en N₂ líquido (-190 °C), al usarlas deben ser sembradas en frascos de 75 cm² y recuperadas de la exposición a la tripsina. En todo el procedimiento por lo general se realiza la lectura en la absorbancia de cada pozo a 540 nm.⁸ Los valores de absorbancia deben oscilar en un rango de 0.2 - 1.0 para dar una correlación adecuada entre el número de células presentes y la densidad óptica observada.⁹ La mayoría de los autores plantean que se deben evaluar hasta 6 concentraciones del compuesto, alcanzando una concentración de 1 000 µg/mL ó hasta el límite máximo de solubilidad del producto en el medio. Si es alcanzada esta concentración y no se observa toxicidad, entonces resulta necesario aumentar el rango de concentraciones hasta 100 000 µg/mL o hasta la máxima concentración soluble del compuesto en el medio.¹⁰ Es necesario tener en cuenta que si

el producto que se evalúa precipita en el medio de cultivo, estos resultados deben ser descartados. Debe utilizarse en el ensayo un control de medio, un control de solvente y es recomendable un control positivo.

Bajo condiciones controladas debe asumirse que no hay salida de rojo neutro. La densidad óptica (D.O) obtenida se toma como índice de la cantidad original de rojo neutro presente en el cultivo. El cálculo del porcentaje (%) de inhibición del crecimiento celular se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (D.O (t)/D.O (c) \times 100)$$

Donde:

- D.O (t) es la densidad óptica del cultivo después de la exposición a una concentración de la sustancia que se evalúa.

- D.O (c) es la densidad óptica del cultivo control, en el cual no debe haber salida de rojo neutro.

Para presentar los resultados se realiza por lo general un gráfico donde se exponen las concentraciones evaluadas y el porcentaje de inhibición del crecimiento celular. A partir de este gráfico serán calculadas las concentraciones que producen el 50% de la inhibición del crecimiento celular CI_{50} .¹¹ Estas concentraciones serán expresadas en $\mu\text{g/mL}$. Además debe realizar un análisis estadístico de los resultados comparándose los resultados con el control de medio.

Consideraciones a tener en cuenta.

- 1- Cuando se utilizan detergentes en el medio de cultivo, los mismos pueden causar interferencias y determinar falsos positivos. Debido a esto, si resulta necesario utilizar estas sustancias deben controlarse las condiciones de su empleo.
- 2- Si el compuesto que se evalúa requiere de activación metabólica previa para ser tóxico, esta prueba no da la información adecuada.
- 3- Cuando se evalúan períodos cortos de exposición, la información que se obtiene resulta en un índice de toxicidad en ojos o piel, por el estado en que se encuentran las células. Por lo que se debe complementar este resultado con períodos largos de exposición.

- 4- Células confluentes que han sido abandonadas por varios días no deben utilizarse para realizar la prueba de exposición por un tiempo corto.
- 5- El rojo neutro tiende a precipitar irreversiblemente formando cristales. Esto podría causar interferencias.
- 6- Se debe tener en cuenta la naturaleza del compuesto a probar.

2. Ensayo de enlazamiento al azul de kenacid.

Mediante este ensayo es medido el cambio en el contenido de proteínas totales, lo cual constituye un reflejo de la proliferación celular.¹² Si un compuesto es citotóxico a la célula debe afectar al menos uno o más procesos implicados en la proliferación celular como son: la síntesis del ADN, el adecuado funcionamiento de las organelas como mitocondrias, lisosomas, o producir una afectación de la integridad de la membrana o en la síntesis de proteínas.¹³ Al encontrarse afectado el crecimiento celular debe reducirse el número de células presentes en el cultivo tratado con respecto al control, por lo que la medida de la concentración de proteínas presentes en el cultivo constituye un índice de toxicidad. Por lo general se exponen las células al producto que se evalúa durante un tiempo o período de 72 horas y seguidamente se retira el producto y se exponen las células al colorante, el cual enlaza a las proteínas celulares. Por último se determina la cantidad de azul de kenacid retenido por las células y se cuantifica el porcentaje de inhibición del crecimiento celular.¹⁴

Las células deben ser conservadas en condiciones de esterilidad en N₂ líquido (-190 °C). El período de exposición de la sustancia de ensayo varía entre 24 -72 horas. Puede leer la D.O a 570 nm, utilizando un filtro de referencia de 404 nm. Es posible leer a 600 nm sin usar blanco de referencia.

Se deben evaluar hasta 6 concentraciones del compuesto, alcanzando una concentración de 1000 µg/mL o hasta el límite máximo de solubilidad del producto en el medio.

Si es alcanzada esta concentración y no se observa toxicidad, entonces resulta necesario aumentar el rango de concentraciones hasta 100 000 µg/mL o hasta la máxima concentración soluble del compuesto en el medio.

Es necesario tener en cuenta que si el producto que se evalúa precipita en el medio de cultivo, estos resultados deben ser descartados. Deben utilizarse en el ensayo un control de medio, un control de solvente y un control positivo.

El cálculo del porcentaje (%) de inhibición del crecimiento celular se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - (D.O.(t)/D.O.(c) \times 100)$$

Donde:

- D.O (t) es la densidad óptica del cultivo después de la exposición a una concentración de la sustancia que se evalúa.

- D.O(c) es la densidad óptica del cultivo control, en el cual no debe haber salida de colorante.

Para el análisis de los resultados se confeccionará un gráfico donde se expongan las concentraciones evaluadas y el porcentaje de inhibición del crecimiento celular. A partir de este gráfico serán calculadas: la concentración que produce el 50 % de la inhibición del crecimiento celular (CI₅₀).¹¹ Estas concentraciones serán expresadas en µg/mL. Además debe realizar un análisis estadístico de los resultados comparándose los resultados con el control de medio.

Consideraciones a tener en cuenta.

En el análisis de los datos se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

1. Una distribución irregular de las células en los pozos afecta los resultados. Ello puede deberse a la presencia de gran cantidad de agregados celulares en la suspensión de células original por errores cometidos en la homogenización.
2. Distribución irregular de las células entre las réplicas determina errores en los resultados.

3. Variaciones en los resultados pueden deberse a propiedades del compuesto que se evalúa o al medio de cultivo utilizado en el ensayo. Estas variaciones pueden estar relacionadas con: ¹⁵
- a) Efectos tóxicos del compuesto relacionados con acidez o alcalinidad que podrían ocultarse debido a que el medio neutraliza el pH por su capacidad neutralizante.
 - b) Variaciones en el pH del medio durante la preparación de las diluciones del compuesto y en el pH del medio durante la exposición al compuesto.
 - c) Enlazamiento del compuesto a componentes del medio de cultivo, tales como proteínas lo que ocasionaría variaciones en los resultados debido a diferencias en los componentes del medio de un lote a otro.
 - d) La estabilidad del compuesto puede influir en los resultados.
 - e) La volatilidad del compuesto es otra de las propiedades a tener en cuenta.
 - f) Un compuesto que produzca un efecto tóxico en alguna de las fases del ciclo celular podría mostrar una toxicidad variable en dependencia de la fase del ciclo en que se encuentren las células durante la exposición.
 - g) Pueden introducirse errores durante la pesada del compuesto a la hora de preparar las diluciones, sobre todo en compuestos muy tóxicos que actúan a muy bajas concentraciones.
 - h) Problemas de solubilidad pueden aparecer en compuestos de baja toxicidad debido a las altas concentraciones que resultaría necesario preparar para demostrar algún efecto tóxico.

3. Ensayo de reducción del MTT

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables.¹⁶ El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. El producto de la reacción, el formazan queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización

de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul.¹⁷

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.¹⁸

Las células deben ser conservadas en condiciones de esterilidad en N₂ líquido (-190 °C). El período de exposición de la sustancia de ensayo varia puede ser durante períodos cortos (1-2 h de tratamiento), o largos de 24 ó 72 h. La D.O debe medirla al concluir el tiempo de incubación 550 nm utilizando un filtro de 620 nm como referencia.¹⁹ Por lo general se deben realizar al menos 8 réplicas de cada concentración que se evalúa. Se deben evaluar hasta 6 concentraciones del compuesto, alcanzando una concentración de 1000 µg/mL o hasta el límite máximo de solubilidad del producto en el medio.

Si es alcanzada esta concentración y no se observa toxicidad, entonces resulta necesario aumentar el rango de concentraciones hasta 100 000 µg/mL o hasta la máxima concentración soluble del compuesto en el medio. Es necesario tener en cuenta que si el producto que se evalúa precipita en el medio de cultivo, estos resultados deben ser descartados. Debe utilizarse en el ensayo un control de medio, un control de solvente y es recomendable un control positivo.

Análisis de los resultados.

Los resultados se expresarán como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación:

$$\% = \frac{\text{D.O de las células tratadas}}{\text{D.O de las células controles}} \times 100$$

D.O de las células controles

La curva dosis respuesta debe ser calculada teniendo en cuenta el rango de concentración utilizado y el porcentaje de reducción del crecimiento celular

correspondiente. A partir de ello se calcula la concentración que produce la reducción de la viabilidad celular en un 50 %.

Referencias Bibliográficas

- 1- Halder M, Balls M. Implementation of three Rs alternatives in regulatory testing: possibilities and obstacles-the view of the validator. *Developmental Biology* (Basel) 2002; 111:199-206.
- 2- Huggins J. Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. *Alternatives to Animal Experimentation* 2003; 20:3-61.
- 3- Combs R.D. The ECVAM workshops: a critical assessment of their impact on the development, validation and acceptance of alternative methods. *Alternatives to Laboratory Animals* 2002; 30:151-165.
- 4- Repetto, M. *Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición; 2002. p.303-305.
- 5- Fentem J.H. The use of human tissues in in vitro toxicology, Summary of general discussions. *Human Experimental Toxicology* 1994; 13 (2):445-449.
- 6- Reinecke S.A, Helling B. Lysosomal response of earthworm (*Eisenia foetida*), coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameters. *Environmental Toxicology Chemistry* 2002; 21:1026-1031.
- 7- Norton F. Dye exclusion viability assays using a hemacytometer. *Tech Note: Nalge Nunc International Corp.* 2000; vol 3 (25).p.67-68.
- 8- Giron M.E, Aguilar I, Romero L, Sanchez E.E, Perez J.C, Rodriguez A. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005; 47(3):147-152.

- 9- Doillon C.J, Gagnon E, Paradis R, Koutsilieris M. Three-dimensional culture system as a model for studying cancer cell invasion capacity and anticancer drug sensitivity. *Anticancer Res* 2004;24(4):2169-2177.
- 10- Zuang V. The neutral red release assay: a review. *Alternatives to Laboratory Animals* 2001; 29:575-599.
- 11- Vinardell M.P. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual. *Acta Bioética* 2007; 13(1):5-6.
- 12- Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biología Celular y Molecular*. 4th Ed. New York: Freeman and Company eds; 2002. p. 595-597.
- 13- INVITTOX. Protocolo: The FRAME cytotoxicity test (kenacid blue). Number 3b: INVITTOX edition; 1996.p.13-16.
- 14- Vanesa U. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis en opción de grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona, España, ISBN B.21912-2009 / 978-84-692-2226-3; 2009.p.54-55.
- 15- Freshney R.I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York: Allan R. Liss, Inc Edition. Third Edition; 1994.p.135-141.
- 16- Shayne G.C. Alternatives to in vivo studies in toxicology. In: Balantyne B, Marrs T, Syversen T. *General and applied toxicology*, vol 1. USA: Grove's dictionaries Inc; 1999. p.178-182.
- 17- Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer B.J, Boobis A. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(2):193-236.
- 18- Jiménez N, González M, Fernández C, López J. Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina. *Biomecánica* 2007; 15 (1):63-71.
- 19- Pareja A, García C, Abad P.J, Márquez M.E. Estudio in vitro de la citotoxicidad y genotoxicidad de los productos liberados del acero inoxidable 316L con recubrimientos cerámicos bioactivos. *IATREIA* 2007; 20(1):12-20.

Recibido: 21/08/09

Aprobado: 31/08/09