

CITOTOXICIDAD DE SUAVIZANTES CATIONICOS SOBRE UNA LINEA CELULAR ESTABLECIDA DE MAMIFERO

M.C.Riva *, D. López**

0.1. Resumen

Este artículo expone de forma detallada el proceso de determinación de la toxicidad de cuatro suavizantes catiónicos de uso textil, mediante técnicas in vitro con cultivos celulares. Se ha utilizado como parámetro de referencia el contenido total de proteínas.

Palabras clave: Citotoxicidad, in vitro, proteínas, cultivo, células.

0.2. Summary. CITOTOXICITY OF CATIONIC SOFTENERS ON THE ESTABLISHED CELL LINE OF MAMMAL.

The determination of the toxicity of four textile cationic softeners are shown in this paper. In vitro technique with mammal cultured cells has been used and the quantity of total proteins has been measured.

Key words: Citotoxicity, in vitro, proteins, culture, cells.

0.3. Résumé. CITOTOXICITE DES TENSOACTIVES CATIONIQUES SUR UN LIGNE CELLULAIRE ETABLIE DE MAMMIFERE

On expose le procédé pour la détermination de la toxicité de quatre tensoactives cationiques usés dans l'industrie textile. On mesure avec techniques in vitro avec cultures cellulaires le niveau de protéines totales.

Mots-clé: Citotoxicité, in vitro, protéines, culture, cellules.

1. INTRODUCCION

En principio, los ensayos de ecotoxicidad pueden ser llevados a cabo a cualquier nivel en la jerarquía biológica, desde moléculas a ecosistemas¹⁾. Bajando esta jerarquía (de ecosistemas a moléculas) los sistemas son más fácilmente controlables y el tiempo de reacción se reduce y así la reproducibilidad, fiabilidad y la repetitividad se incrementan.

Los ensayos de citotoxicidad constituyen un sistema alternativo a la experimentación animal²⁾. Algunas de las ventajas que presentan los ensayos de citotoxicidad in vitro son rapidez, reproducibilidad de las condiciones de ensayo y economía (bajo costo). Un buen sistema de ensayo in vitro tiene que ser capaz de detectar el proceso tóxico que induce un agente, y que sea reproducible, por lo que una de las ventajas que presentan las líneas celulares establecidas, es la utilización de las poblaciones homogéneas con potencial para propagaciones continuas. En la detección de la citotoxicidad in vitro por medio de cultivos celulares, y principalmente con líneas establecidas, se plantea el inconveniente de que este sistema indicador carece de enzimas responsables de la bio-transformación, sin embargo este problema ha podido ser superado, en parte, por la incorporación de sistemas de actuación metabólica de mamíferos.

Con el paso del tiempo los ensayos in vitro se están convirtiendo en una respuesta sólida frente a las pruebas convencionales llevadas a cabo con animales en cualquier otro ámbito de la ciencia. Un progresivo perfeccionamiento de las técnicas nos permite no depender tan directamente de los resultados in vivo como hasta ahora.

Productos químicos de nueva formación o derivados de los ya existentes necesitan pruebas rápidas y fiables para determinar su posible toxicidad antes de ser homologados, ya que la mayoría de ellos tienen un contacto directo o indirecto con el hombre o con biosistemas acuáticos o terrestres.

Las pruebas de toxicidad in vitro con cultivos celulares son una buena alternativa que en los últimos años está experimentando un fuerte auge.

El objetivo del presente trabajo es determinar la citotoxicidad que ejercen distintos suavizantes catiónicos de uso textil valorando, mediante técnicas in vitro, el contenido total de proteínas en una línea celular establecida de mamífero.

*Dra. en Ciencias Biológicas, M^o. Carmen Riva Juan. Investigadora de la Universidad Politécnica de Catalunya. Jefa del Laboratorio de Toxicología Ambiental de INTEXTER.

** Licenciado en Ciencias Biológicas (Bioquímica), David López Ribas. Laboratorio de Toxicología Ambiental de este Instituto.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Compuestos estudiados

Los compuestos utilizados han sido los siguientes suavizantes catiónicos :

DSDMAC: diestearil dimetilamonio cloruro

DSEMAMS: disebo alquil hidroxietilamonio metilsulfato

DSAEMIMS: disebo alquil carboxietil hidroxietil metilamonio metilsulfato

DAAIMS : disebo alquil amino imidazolina metilsulfato.

Se ha estudiado el efecto debido a las formas emulsionada y microemulsionada de cada suavizante, las cuales fueron preparadas en el Laboratorio de Tensioactivos y Detergencia de nuestro Instituto (INTEXTER).

2.2. Línea celular

La línea celular utilizada es la CAPAN-1 : son células de adenocarcinoma pancreático humano suministradas por la ATCC (American Type Culture Colection) N° HBT-79 y cedidas por la unidad de Enzimología del Institut de Biologia Fonamental de la U. A. B., donde se han llevado a cabo los ensayos. Las células son conservadas en nitrógeno líquido a -193°C , en un medio de congelación que contiene DMSO (dimetil sulfóxido).

El medio (DMEN) que se utiliza para este tipo de célula, no aporta por sí solo todos los requerimientos nutricionales necesarios para un óptimo crecimiento, por lo que se combina con BMS, un suero artificial que complementa las deficiencias del medio. La ventaja de utilizar un suero artificial frente a uno natural es que en el caso del segundo, al ser un extracto de un fluido biológico, su composición es variable de una partida a otra³⁾, de manera que no se puede tener un conocimiento exacto de todo el material que entra en contacto con las células.

2.3. Reactivos, medios y complementos

DMEM: (Dubelcco's Modified Eagle's Medium), suministrado en polvo, se disuelve en 10 litros de agua MilliQ, se añade como tampón bicarbonato a razón de 3,7 mg / l y el pH se ajusta a 7,4 con HCl. Al ser un material biológico y no poderse esterilizar por temperatura, se utiliza un sistema de membranas en serie (Millipore) que consta de un prefiltro, un filtro de 1,2 micras, uno de 0,45 micras y un filtro de 0,22 micras, este último corresponde al tamaño de la bacteria más pequeña conocida (B. diminutus). Una vez filtrado el medio se conserva a 4°C.

BMS: (Basal Medium Serum, Seromed/ Biocrom), como ya se ha comentado anteriormente es un complemento nutricional que se añade al medio de cultivo entre un 10% y un 20% .

Gentamicina sódica: es un antibiótico de protección de amplio espectro, activo frente a las mayoría de bacterias, pero no es activo frente a levaduras y otros microorganismos, por lo que las condiciones de esterilidad han de ser muy exigentes. Cualquier descuido en la manipulación del material comporta la contaminación del medio inutilizando por completo el cultivo.

EBSS-EDTA: es una solución salina utilizada para eliminar residuos y limpiar el interior de recipientes en procesos como tripsinización, cambio de medio, etc. Composición:

KCl	0,3 gr
NaCl	6,8 gr
NaHCO ₃	2,2 gr + c . s . p. 1 litro
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,14 gr
D-glucosa	1,0 gr
EDTA	0,2 gr

DMSO (dimetil sulfóxido/ Merck): es utilizado en el proceso de conservación de las células en nitrógeno líquido.

Al disolverse en el citoplasma consigue que se comporte como un gel a bajas temperaturas, impidiendo la formación de cristales de agua que puedan afectar a estructuras internas. A temperatura ambiente es tóxico para las células, por lo que una vez descongeladas ha de ser eliminado rápidamente.

Tripsina: (Difco), se utiliza para desenganchar las células de la base de los recipientes de forma natural, sin afectar a su viabilidad. Es una proteasa gástrica muy activa que hidroliza cualquier tipo de polipéptido, por lo que una vez se ha comprobado que las células han perdido adherencia se ha de inhibir su actividad para evitar que afecte a estructuras de la membrana citoplasmática. Composición :

Tripsina	0,5 gr (polvo)
EDTA	0,2 gr
NaCl	8,0 gr + c . s . p. 1 litro
KCl	0,4 gr
CH ₂ COONa	0,35 gr

Se esteriliza por filtración (filtro 0,22 micras), se alicuota en tubos Eppendorf y se conserva a -20°C para evitar procesos de autodigestión.

Medio de cultivo: es una combinación de varias soluciones mencionadas anteriormente, añadiendo piruvato sódico como fuente de carbono. Composición :

DMEM	90 %
Piruvato sódico	0,005%
BMS	10,0 %
Gentamicina	0,0005 % (aprox.)

2.4. Iniciación del cultivo

Las células se conservan alicuotadas en criotubos a aproximadamente -193°C en nitrógeno líquido. La descongelación se realiza colocando el criotubo directamente en un baño termostatizado a 37°C . Seguidamente el contenido del criotubo es transferido a un tubo de centrifuga y con una pipeta Pasteur se añade gota a gota medio para favorecer el intercambio con el DMSO. Después de la centrifugación a 1500 rpm 10 min a 37°C , se elimina el sobrenadante y se añade medio a 37°C , se homogeneiza con una pipeta Pasteur y se transfiere el contenido a un frasco Roux de 50 ml con 5 ml de medio. Seguidamente el cultivo es colocado en el incubador a 37°C , (95 % humedad y un 10 % de CO_2).

2.5. Mantenimiento del cultivo

A las 24 h. de haber sembrado se comprueba el estado de las células; es el margen de tiempo en el que se considera que cualquier célula viable se habrá fijado al recipiente y el cultivo como tal empezará a crecer. Las células en suspensión, observadas al microscopio, tienen una estructura esférica y de contornos bien definidos, mientras que fijadas a la superficie son aplanadas, fusiformes y presentan proyecciones citoplasmáticas. La propia acción fisiológica de las células crea detritus o compuestos metabolizados que son excretados al exterior, lo cual comporta un empeoramiento de la calidad del medio por lo que es conveniente cambiarlo. También se puede ver al microscopio células muertas flotando, o a simple vista un cambio de color del medio adoptando una tonalidad amarillenta indica que el tampón se está agotando, y como en el caso anterior, hay que reemplazar el medio viejo por nuevo. El inconveniente de cambiar a menudo el medio es que se aumenta el riesgo de contaminación y las células secretan al exterior factores de crecimiento. Esto lleva a intentar encontrar un equilibrio entre los dos criterios.

2.6. Consideraciones básicas

Todo el material que entra en contacto con las células tiene que haber sido esterilizado previamente y se trabaja siempre dentro de una campana de seguridad biológica de flujo vertical. Los reactivos o productos, como medio, EBSS, tripsina,

etc, que se añaden a las células han de estar a temperatura fisiológica de 37°C . El DMEM y los complementos del medio se conservan a 4°C o a -20°C para evitar posibles contaminaciones. Si un recipiente se contamina de levaduras, (se observan como collares de perlas muy pequeños y refringentes), se inviabiliza.

2.7. Procedimiento para el recuento celular

Una vez comprobado por microscopía que el frasco está cerca de la confluencia, se hace un recuento previo para tener una idea aproximada del número de células de que se dispone. Para iniciar el recuento se extrae el medio por aspiración y se lava el cultivo con solución salina EBSS-EDTA para eliminar cualquier residuo que hubiera quedado adherido a la superficie y no hubiera sido eliminado previamente, se extrae el EBSS y se añade 0,5 ml de tripsina. La tripsina al ser un enzima animal muy activo frente a cualquier péptido, permite que las células se desenganchen de la superficie del frasco y se anulen las uniones intercelulares. La naturaleza de la unión de las células a la superficie de los recipientes utilizados no se conoce a fondo, se estipula que intervienen proteínas de membrana, ya que se comprueba que el tratamiento con proteasas comporta una pérdida de adherencia de las células sobre los recipientes. El componente plástico del que están formados dichos recipientes, principalmente poliestireno, es de naturaleza hidrofóbica; mediante procesos físico-químicos se crean cargas eléctricas en la superficie dando al plástico una condición hidrofílica compatible con el uso de extractos biológicos y soluciones acuosas⁴.

Se deja que la tripsina actúe hasta que al microscopio se observa que las células se desenganchan. Para frenar este proceso se añade aproximadamente 1 ml de medio fresco que contiene un inhibidor de la tripsina.

Las células son transferidas a un tubo de 15,3 ml y centrifugadas 10 minutos a 1500 r.p.m. y a 4°C . El sobrenadante se elimina y se dispersa el pelet en seco golpeando suavemente la parte inferior del tubo. Este es un paso importante ya que así se evita la formación de gránulos que pueden alterar el número final de células. Una vez deshecho el pelet se añade 1 ml de medio y se homogeneiza con una pipeta Pasteur.

Finalmente se toman 10 microlitros y se colocan en un Eppendorf que contiene 10 microlitros de solución azul de triptano y se cargan 10 microlitros en el hemocitómetro. El azul de triptano colorea las células inviables quedando refringentes las células viables; el nº de células obtenido se multiplica por un factor de conversión de 2×10^4 , determinado por el hemocitómetro.

2.8. Proceso de sembrado y exposición

Se colocan 2 ml de medio y 60000 cel, que en nuestro caso equivalen a un volumen aproximado de 35 microlitros, en cada placa de 35x10 mm. Las placas se incuban durante 72 horas. A partir de las 24 horas se considera que todas las células viables se han adherido a la superficie del recipiente y el cultivo entra en una fase de crecimiento exponencial.

Después de este periodo se añaden a las placas los productos a estudiar, a concentraciones de 1, 10, 100 microg./ml y se dejan incubar durante 4 horas, se aspira el medio y se limpia con EBSS-EDTA; posteriormente se reponen 2 ml de medio fresco por placa y se deja en incubación 24 horas más⁵⁾.

2.9. Ensayo para la valoración de proteínas totales según método Bradford

Este método permite conocer la cantidad total de proteínas que tiene una muestra. La cantidad total de proteínas se puede equiparar al número de células. Siguiendo una relación inversamente proporcional entre el n° de células y la toxicidad que presenta un producto sobre el cultivo al que se ha tratado o expuesto, se puede establecer que: cuanto más tóxico sea un producto menor cantidad de proteínas se detectarán ya que habrá menos células viables. Como reactivo se utiliza el Coomassie Brilliant Blue G-250 en una preparación que contiene ácido fosfórico, metanol, agua y agentes solubilizantes⁶⁾. Inicialmente tiene un color rojizo que al reaccionar con los grupos amino de las proteínas, en solución acídica, vira a azul⁷⁾. Una vez finalizado el periodo de incubación establecido, el medio es aspirado y limpiado con EBSS-EDTA y se le añade 0,5 ml de NaOH 0,3 M, para desenganchar las células⁵⁾. En este caso no se utiliza tripsina por dos motivos: primero, es una proteína y puede interferir en el resultado si no es eliminada totalmente, segundo y más importante porque no interesa recuperar las células intactas, (a parte el hidróxido sódico ayuda a lissarlas). Posteriormente el contenido de las placas es transferido a tubos de centrifuga de 15,3 ml.

Para poder extraer las proteínas, las células son lisadas por sonicación (LABSONIC U- BRAUN), con impulsos de 0,5 s durante dos minutos. Se colocan 6 microlitros de cada tubo en una placa ELISA (Enzyme-Linked Inmunosorbent Assay) de 96 pocillos, 150 microlitros de agua bidestilada y 150 microlitros de reactivo de Bradford⁶⁾, se deja en reposo durante 5 minutos y se leen las absorbancias a 620 nm en un lector de microplacas ANTHOS 2001. La absorbancia obtenida se relaciona con la concentración según una recta patrón realizada con una proteína estándar, BSA (albúmina de suero bovino). Se prepara una recta por cada ensayo y se leen las absorbancias en la placa correspondiente:

la primera con la recta I y ensayo I y la segunda con la recta II y ensayo II. Las concentraciones estándar de la recta patrón son : 1, 2,5 , 5 , 10 , 15 y 25 microgr./ml. Las muestras cuando se colocan en la placa se diluyen en un factor 1:10 para que la lectura obtenida esté dentro del rango de la recta.

3.0. RESULTADOS Y DISCUSION

Las células oncogénicas presentan la ventaja de que son muy adaptables al crecimiento en cultivo y su condición de transformadas permite que sean menos labiles frente a procesos externos como pipeteos, centrifugación etc. El inconveniente de utilizar este tipo de células es que presentan procesos citológicos alterados, característica que se ha de tener presente en el momento de extrapolar resultados de ensayos realizados sobre ellas, pero consideramos que son correctas para este tipo de prueba ya que a pesar de que no son "comunes", no han de presentar a priori mayor resistencia que cualquier otra línea celular a un agente tóxico.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en relación al contenido total de proteínas, en un cultivo celular de la línea establecida CAPAN-1, expuesto a los tensioactivos catiónicos en forma emulsionada y microemulsionada. La absorbancia observada se relaciona con el contenido en proteínas según las rectas patrón:

$$\text{ensayo I: } \{\text{prot.}\} = 52,76 \times \text{abs.} + 0,115$$

$$\text{ensayo II: } \{\text{prot.}\} = 44,61 \times \text{abs.} + 0,089$$

Se observa una disminución del contenido proteico a medida que aumenta la concentración de producto. Si analizamos esta disminución individualmente para cada suavizante en sus dos formas podemos deducir lo siguiente :

DAAIMS: la forma emulsionada presenta una disminución de la cantidad de proteínas mayor, en todas sus concentraciones que en el caso de la forma microemulsionada.

DSAEMIMS: no se aprecia una clara diferencia entre el efecto de la emulsión y el de la microemulsión, exceptuando la dosis de tratamiento de 1 microgr./ml .

DSDMAC :se observa una mayor diferencia entre las dos presentaciones, sobre todo en las concentraciones inferiores, (de 1 y 10 microgr./ml); la microemulsión tiene un efecto más acentuado .

DSEMAMS: en este caso la emulsión induce una mayor disminución del contenido de proteínas.

En general la toxicidad es independiente de la forma en la que están presentes los suavizantes en la solución. El efecto tóxico viene determinado por las características intrínsecas de cada uno, es decir por su composición química. En la Tabla 2 se presentan los valores de la LC50 (concentración de producto en microgr./ml que provoca una disminución de un 50% en el contenido total de proteínas), para cada suavizante a las 4 horas de exposición. Además se ha observado, mediante microscopía invertida de

contraste de fases, que se produce lisis celular durante el ensayo, y que ésta parece estar relacionada con la toxicidad que presentan estos suavizantes.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en pruebas realizadas en nuestro laboratorio con *Daphnia magna*, *Chorella vulgaris* y *Oncorhynchus mykiss* con estos mismos suavizantes, se comprueba que in vivo existe un mayor efecto tóxico de las microemulsiones frente a las emulsiones⁸⁾.

Quizás esto pueda ser atribuido a los auxiliares (un hidrocarburo de 8 átomos de carbono y un alcohol) que son necesarios en la preparación de las microemulsiones o incluso al tamaño de partícula, diferencia que puede no ser evidente in vitro debido a una mayor sensibilidad de la técnica. Estos dos factores serán tenidos en cuenta en siguientes investigaciones para completar este estudio y corroborar o no la hipótesis, con los

mencionados auxiliares y con distintos tamaños de partícula.

Caballo y colaboradores⁵⁾ valoran la toxicidad de insecticidas piretroides (aletrín, tetrametrín, permetrín, cipermetrín y fenalverato), hallando como en nuestro caso, una disminución del contenido de proteínas a medida que aumenta la concentración del producto a la que es expuesto el cultivo.

Otros compuestos como: paracetamol, cafeína, fenobarbital, etanol, tricloroacético, cloruro de plata, etc, hasta un total de 150 productos de uso farmacéutico, industrial o doméstico, también han sido valorados por la Sociedad INVITTOX⁹⁾, tomando como referencia el contenido de proteínas, parámetro que demuestra ser muy apropiado en los estudios de toxicidad in vitro.

Los resultados expuestos corresponden a la primera parte de un estudio (in vitro) en curso con distintos tipos de líneas celulares, y supone el inicio de una nueva área toxicológica en nuestro centro.

TABLA 1: Contenido proteico tras exposición del cultivo de células CAPAN-1 a suavizantes catiónicos en forma emulsionada (E) y microemulsionada (M).

Producto	concentración microgr./ml	concentración proteína microgr./ml			%disminuc. contenido proteína	
		I	II	M±SD		
BLANCO		176,8	148,6	162,7±14		
DAAIMS	E	1	110,9	153,1	132,0±21	18,3
		10	100,1	138,9	120,0±19	26,4
		100	24,8	30,2	27,5±3	83,9
	M	1	167,0	142,4	154,8±12	5,0
		10	119,3	130,4	144,5±5	11,0
		100	78,1	67,9	73,0±5	55,0
DSAEMMS	E	1	96,1	83,5	89,9±6	44,8
		10	71,8	74,8	73,1±1	55,0
		100	47,0	64,1	55,5±8	65,9
	M	1	139,9	144,1	136,5±2	16,1
		10	59,1	100,8	79,9±20	51,0
		100	53,0	76,0	64,0±11	60,6
DSDMAC	E	1	107,1	118,7	112,9±6	30,6
		10	59,1	91,7	75,4±16	53,7
		100	30,1	47,1	28,6±8	76,3
	M	1	47,0	85,0	66,0±19	59,4
		10	35,9	74,6	54,0±19	66,8
		100	20,2	59,7	39,7±20	75,5
DSEMANS	E	1	95,0	88,6	91,3±3	43,6
		10	44,1	68,0	56,0±12	65,6
		100	27,3	43,8	35,4±8	78,2
	M	1	95,0	99,9	97,5±2	40,1
		10	66,6	84,8	75,2±9	53,4
		100	42,8	70,7	56,7±14	65,1

TABLA 2: Valores calculados de la LC50 (microgr./ml) para cada uno de los productos a las 4 horas.

PRODUCTO	EMULSION	MICROEMULSION
DAAIMS	47,9	89,8
DSAEMIMS	12,23	10,35
DSDMAC	29,74	0,84
DSEMAMS	4,74	25,86

4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este ensayo, se puede deducir que la toxicidad de los productos valorados depende de su composición química (DAAIMS y DSEMAMS presentan mayor toxicidad en la forma emulsionada, mientras que DSAEMIMS y DSMAC presentan mayor efecto tóxico en la forma microemulsionada).

El suavizante DAAIMS es el que presenta un menor grado de toxicidad tanto en la forma emulsionada como en la forma microemulsionada.

No queda claramente demostrada la relación entre toxicidad y forma de presentación del producto estudiado. No se puede diferenciar el efecto entre emulsión y microemulsión de forma categórica a nivel *in vitro* con este tipo celular (CAPAN-1).

La toxicidad que presentan estos suavizantes podría estar relacionada con la lisis celular observada con microscopía invertida de contraste de fases.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) del MEC por su apoyo financiero al proyecto PB90-0607. Quieren agradecer además la colaboración prestada por Carmen Blanco y Esther Fernández, miembros de la Unidad de Enzimología del Institut de Biologia Fonamental de la U.A.B., para la realización de este ensayo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Calow, P. The choice and interpretation of environmental bioassays. *Hidrobiología* 188/189, 61-6 (1989). En *Handbook of Ecotoxicology Vol 1*. Edited by Peter Calow. Blackwell Scientific Publications (1993).
2. Stamnati, A. P.; Silano, V.; Zucco, F. Toxicology investigation with cells cultures systems. *Toxicology*, 20:19 (1981).
3. D. Barnes and G. Sato. Methods for growth of cultured cells serum-free medium. *Analytical Biochemistry* 102, 255-270 (1980).
4. R. Ian Freshney. Culture of animal cells, a manual of basic techniques. cap 3 (1984).
5. C. Caballo y col. Evaluación de la toxicidad de insecticidas piretroides *Rev. Toxicol.* 7, 3:249-262 (1990).
6. Pierce A. »Coomssie protein assays method» Pierce Chemical Company (1991).
7. M. Bradford: »A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle Protein-dye binding» *Analytical Biochemistry*, 248-254, (1976).
8. B. Valles; Riva M.C.; Carrión J.F. Effects of emulsion and microemulsion cationic softeners on aquatic environment. Poster nº248 First SETAC World Congress "Ecotoxicology and Environmental chemistry. A global perspective" (Portugal) (1993).
9. Protocolo nº3b INVITTOX (The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology), 34 Stoney Street, Nottingham (England).

Trabajo recibido en: 1994.01.19

Aceptado en: 1994.02.08