UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

# "Estandarización del Ensayo Clonogénico en el Centro de Biología Celular y Molecular utilizando como control positivo de citotoxicidad Doxorrubicina, en las líneas celulares tumorales: MCF- 7 y SK-LU-1".

*Tesis previa a la obtención del título de:*

Bioquímico-Farmacéutico

**Autor:**

Gabriela Elizabeth Parra Celi

**Directora:**

Dra. Natalia Bailon Moscoso

*Loja – Ecuador*

*2009*

**CERTIFICACIÓN**

Dra.

Natalia Bailon Moscoso

**DIRECTORA DE TESIS**

**CERTIFICA:**

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por la Srta. Gabriela Elizabeth Parra Celi, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Abril 2009

Dra. Natalia Bailon Moscoso

**DIRECTORA**

## AUTORÍA

Los conceptos, ideas, metodologías, recursos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de absoluta responsabilidad de su autor.

Gabriela Elizabeth Parra Celi

## DEDICATORIA

Quiero dedicar el presente trabajo primeramente a Dios, por haberme otorgado la sabiduría necesaria, para culminar con éxito el presente trabajo y de esta manera darme la oportunidad de hacer realidad mis sueños mas anhelados.

A mis padres Lilia y Alberto quienes han sido un pilar fundamental en mi formación como persona, por confiar en mis capacidades como hija y mujer, gracias a ellos puede con perseverancia y ahincó enfrentar mis más duros retos tanto en mi vida personal como profesional.

A mis hermanos y amigos por ser mi apoyo incondicional y mi horizonte en esta larga travesía.

Gabriela Elizabeth Parra Celi

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en las persona del Ph. Dr. Luís Miguel Romero Fernández, por los agigantados pasos de superación que hizo brotar en mí, no solo por permitirme culminar mis estudios universitarios sino por las grandes enseñanzas impartidas.

A la Dra. Natalia Bailón Moscoso, por su infinita bondad, al dejarme haber llegado a formar parte del Centro de Biología Celular y Molecular, y de esta manera aplicar mis conocimientos, destrezas y explotarlos al máximo. Gracias por su paciencia y dedicación.

Al Bq. Alex Gabriel Astudillo, quien gracias a su exigencia constante y su dedicación me ayudo a formarme como una persona paciente y decidida a la hora de asesorar mi trabajo e investigación, haciendo explotar en mis cualidades escondidas. Gracias por tu comprensión y tu amistad.

A mi Madre quien a pesar de su distancia estuvo apoyándome continuamente y a mi Padre por ser mi capitán de lucha y animarme a culminar con éxitos este trabajo. A mi familia por su constante preocupación y su apoyo infinito.

A mis amigos y compañeros de Genética Toxicológica quienes me enseñaron a trabajar en equipo. Además por estar siempre pendientes de mi superación, brindándome su amistad incondicional.

A compañeros y amigos de aula por haber depositado su confianza en mi e incentivarme el deseo de triunfar y ser competitiva.

Gabriela Elizabeth Parra Celi

## CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

Yo, Gabriela Elizabeth Parra Celi, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forma parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

| | |
|---|---|
| Gabriela Elizabeth Parra Celi | Dra. Natalia Bailon Moscoso |
| **Tesista** | **Director de Tesis** |

# ÍNDICE

## Índice de Contenidos .....Pág.

Certificación.....ii

Autoría .....iii

Dedicatoria .....iv

Agradecimiento.....v

Contrato de Cesión de Derechos de Grado .....vi

Índice .....vii

Resumen .....viii

Abstract .....ix

Objetivos .....xvi

**1. INTRODUCCIÓN ..... 1**

1.1 CULTIVOS CELULARES ..... 1

1.2 CONDICIONES Y MANTENIMIENTO PARA LOS CULTIVOS CELULARES ..... 1

1.3 UTILIDAD DE LOS CULTIVOS CELULARES ..... 4

1.3.1 Sistemas Modelo..... 4

1.3.2 Ensayos Tóxicos..... 4

1.3.3 Investigación sobre Cáncer ..... 4

1.3.4 Investigación y desarrollo de fármacos: ..... 5

1.4 CUILTIVOS CELULARES Y CANCER_..... 5

1.5 CITOTOXICIDAD ..... 8

1.5.1 Viabilidad ..... 8

1.5.2 Supervivencia ..... 9

1.5.3 Metabólicos ..... 9

1.5.4 Transformación ..... 9
1.5.5 Irritabilidad ..... 10
1.6 ENSAYO CLONOGÉNICO ..... 11

**2. MATERIALES Y MÉTODOS: ..... 16**
2.1 LÍNEAS CELULARES ..... 16
2.2 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LINEAS CELULARES ..... 17
2.3 CRIOPRESERVACION DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS ..... 19
2.4 REALIZACIÓN DEL ENSAYO CLONOGÉNICO ..... 19
2.4.1 ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO CON LAS LINEAS CELULARES MCF-7 Y SK-LU-1: ..... 19
2.4.1.1 Siembra Celular ..... 19
2.4.1.2 Fijación y tinción de colonias ..... 20
2.4.1.3 Conteo de las colonias ..... 21
2.4.1.4 Análisis estadístico ..... 21
2.4.1.5 Tratamiento con Doxorrubicina ..... 23

**3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ..... 27**
3.1 Determinación de la dosis de doxorrubicina como Control Positivo de Citotoxicidad. ..... 33

**4. CONCLUSIONES: ..... 38**

**5. BIBLIOGRAFÍA: ..... 39**

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Índice de Contenidos .....Pág.**

***Figura 2.1*** *Diagrama para estandarización densidad y tiempos de incubación* .....22

***Figura 2.2*** *Diagrama para la aplicabilidad del tratamiento con DOX* .....25

# ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

## Índice de Contenidos ..... Pag

***Fotografía 2.****1 Células de adenocarcinoma de mama* .....16

***Fotografía 2.2****. Células de adenocarcinoma de pulmón* .....17

***Fotografía 3.1****.Vista macroscópica de colonias de células tumorales humanas de adenocarcinoma de glándula mamaria (MCF-7)* .....29

***Fotografía 3.2****.Vista macroscópica de colonias de células tumorales humanas de adenocarcinoma de pulmón (SK-LU-1)* .....31

# ÍNDICE DE GRÁFICOS

## Índice de Contenidos ..... Pág.

***Gráfico 3.1***.*Porcentaje de supervivencia celular de células tumorales humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7)* .....28

***Grafico 3.2***.*Porcentaje de supervivencia celular de células tumorales humanas de adenocarcinoma de pulmón (SK-LU-1.* .....30

***Grafico 3.3***. *Estandarización de la dosis de Doxorrubicina como control positivo en células MCF-7 (Cáncer de mama).* .....34

***Gráfico 3.4*** *Estandarización de la dosis de Doxorrubicina como control positivo en células SK-LU-1 (Cáncer de pulmón)*.....35

## ÍNDICE DE TABLAS

**Índice de Contenidos ..... Pág.**

***Tabla 2.1***. *Esquema para estandarizar tiempos de incubación y densidades celulares, pre-tratamiento.* .....19

***Tabla 2.2***. *Esquema para el tratamiento con doxorrubicina.* .....21

**6. ANEXOS: .....46**

6.1 Puntos Críticos para la realización del Ensayo Clonogénico. .....46

**Resumen:**

La valoración de la citotoxicidad *in vitro,* permite la selección de compuestos promisorios para la búsqueda de nuevas moléculas con potencial actividad anticancerígena a partir de productos naturales; para dar solidez a dicha valoración es necesario disponer de líneas celulares tumorales humanas y conocer su sensibilidad a agentes de acción citotóxica demostrada. (León *et al,* 2006).

La prueba que nos permite medir la citotoxicidad en modelos celulares es el Ensayo Clonogénico, que estima la supervivencia celular, en base a la capacidad de regeneración luego haber sido expuesto a un agente tóxico. (Brown 1999; Franken et al,. 2006. En este contexto, el objetivo del presente trabajo de investigación estuvo dirigido hacia la Estandarización del Ensayo Clonogénico en el Centro de Biología Celular y Molecular en las líneas celulares tumorales: MCF- 7 y SK-LU-1; para el desarrollo de estudios posteriores de citotoxicidad encaminados al descubrimiento de potenciales fuentes de agentes antitumorales.

Para ello, inicialmente se determinaron el mejor tiempo de incubación y la mejor densidad celular para establecer el Ensayo Clonogénico, los cuales fueron 10 días y 200 células/caja respectivamente. También se usó como control positivo de citotoxicidad el fármaco antineoplásico Doxorrubicina, con cinco concentraciones diferentes (0.05, 0.1, 0.5, 5, 10 ug/ml). Al analizar los resultados se demostró que el porcentaje de supervivencia fue disminuyendo al incrementar la dosis, pudiéndose determinar la dosis letal cincuenta ($DL_{50}$) en

cada línea celular, cuyo valor es cercano a la $DL_{50}$ reportada en otros estudios con este tipo de ensayo.

**Palabras clave**: Ensayo clonogénico, Citotoxicidad, doxorrubicina.

**Abstract:**

The *in-vitro* cytotoxicity evaluation is a valid and useful tool in the selection of promising compounds in order to seek new molecules with potential anticancer activity in natural products. In order for this evaluation to be convicing, it is necessary to have human tumor cell lines with the purpose of determining their sensitivity to cytotoxic activity agents. (León *et al,* 2006).

The test that allows us to measure cytotoxicity in cellular models is the Clonogenic assay, which estimates cell survival based on the regeneration capacity after the exposition to a toxic agent. Brown 1999; Franken et al,. 2006). In this context, the objetive of this research was directed towards the Standardization of the Clonogenic Assay at the Molecular and Cell Biology Center in the tumor cell lines MCF-7 and SK - LU-1, thus, enabling the development of subsequent cytotoxicity studies which are intended to discover potential sources of antitumor agents.

For this purpose, the best incubation time and cell density, which were 10 days and 200 cells/plate respectively, were initially identified in order to establish the Clonogenic Assay. An antineoplastic drug called Dopxorubicin was also used as a positive control of cytotoxicity with five different concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.5 5, 10 ug/ml). The results showed that the percentage of survival decreased as the dose increased. In addition, the lethal dose 50 ($LD_{50}$) could be determined in each cell line. This value is close to the $LD_{50}$ reported in other studies with this type of test.

**Keywords:** Clonogenic assay, Citotoxicity, Doxorubicin

# OBJETIVOS:

## General:

- Estandarización del Ensayo Clonogénico en el Centro de Biología Celular y Molecular utilizando como control positivo de citotoxicidad Doxorrubicina, en las líneas celulares tumorales: MCF- 7 y SK-LU-1.

## Específicos:

- Establecer la densidad celular adecuada para el Ensayo Clonogénico, en MCF-7 y SK-LU-1

- Establecer el tiempo de incubación adecuado post-tratamiento para el ensayo clonogénico en ambas líneas celulares tumorales humanas utilizadas.

- Establecer mediante curvas dosis-respuesta, las concentraciones más efectivas a ser usadas como controles positivos en el Ensayo Clonogénico.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares es un procedimiento tecnológico de mantenimiento y estudio de células vivas en un medio artificial que permite reproducir de forma bastante fiable las condiciones biológicas a las células se desarrollan. Las áreas de aplicación potencial de los cultivos celulares se han ido ampliando de forma progresiva, por lo que constituyen ya una técnica habitual en muchos procedimientos de investigación (Kawada *et al*,. 2002). El cultivo de células aisladas es un sistema biológico que logra subsistir fuera del organismo, además son capaces de dividirse y mantener sus funciones *in vitro*.

## 1.2. CONDICIONES Y MANTENIMIENTO PARA LOS CULTIVOS CELULARES

Las células deben mantenerse en condiciones microambientales y nutritivas aptas para su subsistencia. Los medios de cultivo son enriquecidos con suero fetal bovino con el objeto de mejorar sus características citodinámicas. Además en el medio de cultivo, existen diversos aditivos como son los extractos embrionarios, hormonas (corticoides, insulina) y factores de crecimiento que pueden ayudar a modificar las características de la dinámica de reproducción y diferenciación de las células en cultivo. (Segretín, 2002)

En la realización de cultivos, un factor importante a considerar es el recipiente del cultivo. Este debe ser de tamaño adecuado al número de células sembradas y debe disponer de una superficie apropiada que facilite la adherencia celular y su posterior diferenciación. Todo el sistema de cultivo debe mantenerse a su vez en condiciones óptimas de temperatura y oxigenación, preservándolo de una posible contaminación. Para ello se utilizan las estufas de cultivo que mantienen unas

condiciones ambientales de temperatura, humedad y oxigenación constantes. (Hambueger *et al*,. 1977).

Para garantizar la estabilidad del pH celular, se adicionan a los medios de cultivo tampones biológicos (CO3H-, PO4H-HEPES), junto con un indicador (rojo fenol) que nos marcará cualquier cambio del mismo. El mantenimiento de unas condiciones estrictas de esterilidad es una premisa básica para la supervivencia y la potencial utilización de los cultivos para estudio. Durante la revisión diaria se debe proveer al cultivo de nutrimentos básicos, evitando contaminaciones, ya que esto nos permite garantizar el desarrollo normal de un cultivo bajo condiciones *in vitro*. (Hahn *et al*,. 2001).

Para prevenir la contaminación bacteriana se adiciona antibióticos como penicilina y, gentamicina y para la contaminación fúngica generalmente anfotericina B. Lo menos controlable es la infección por virus y micoplasmas, que son organismos habitualmente intracelulares y que presentan una gran capacidad de supervivencia en cultivo. Para evitarlos se debe mantener una estricta técnica aséptica. (Frías, 2005).

Para la realización de subcultivos es necesario desprender las células de su monocapa habitual, para lo cual generalmente se usa tripsina que permite romper los enlaces celulares entre ellas. El cultivo debe mantener las condiciones óptimas de forma semejante al cultivo inicial, es por ello que el fenómeno de senescencia celular se mantiene viable a nivel de los cultivos secundarios. (Pauweis *et al*,. 2003).

El mantenimiento de un ambiente aséptico no se limita a los medios y frascos de cultivo sino que debe extenderse a la manipulación durante la realización de cada uno de los pasos para su mantenimiento, por lo que se debe considerar trabajar en lugares aislados del exterior, evitando corrientes de aire y el acceso de partículas de polvo mediante la instalación de

aireación controlada y filtrada, con un flujo vertical descendente. (Ocaña, 2007).

Una vez que hemos conseguido el ambiente necesario se debe realizar una valoración diaria de su desarrollo y metabolismo tratando en lo posible de mantener la condiciones necesarias para el desarrollo celular, trabajando con una temperatura constante de 37°C y a una atmosfera de $CO_2$ al 5%. Permitiendo determinar que las células puedan alcanzar el volumen y confluencia requerida. La capacidad de reproducción celular se puede valorar mediante el tiempo de duplicación y recuento celular del número total de células existentes. (Chiapa et al, 1994)

Las células se criopreservan para poder mantener sus características durante un periodo largo de tiempo a partir de cualquier momento de ciclo celular dado que las características de un modelo de cultivo a otro son diferentes. De esta manera se puede mantener cultivos patrones para elaborar ensayos con una misma progenie celular. Y así mantener un equilibrio durante la obtención de resultados. (Hammamieh *et al.*, 2006).

## 1.3. UTILIDAD DE LOS CULTIVOS CELULARES

Dada a su versatilidad y manejo han llegado ha ser uno de los modelos biológicos más utilizados, es así que pueden ser empleados en (Ryan, 2006):

**1.3.1. Sistemas Modelo:** Las células en cultivo nos proveen de un buen sistema modelo para el estudio de: 1) biología celular básica y bioquímica, 2) Las interacciones entre agentes causantes de enfermedad y las células, 3) efectos de fármacos sobre las células, 4) proceso de envejecimento y 5) estudios nutricionales.

**1.3.2. <u>Ensayos Tóxicos:</u>** Los cultivos de células son usados, solos o en conjunto con pruebas animales para estudiar los efectos de nuevas fármacos, cosméticos y químicos sobre la supervivencia y crecimiento de una amplia variedad de tipos celulares.

**1.3.3. <u>Investigación sobre Cáncer:</u>** Ya que tanto las células normales y células de cáncer pueden crecer en cultivo, las diferencias básicas entre ellas pude ser profundamente estudiadas. Además, es posible, que con el uso de químicos, virus o radiaciones; convertir una célula normal en una célula transformada o causante de cáncer. Debido a que ciertos mecanismos que causan el cambio pueden ser valorados y estudiados. Las células cancerosas en cultivo sirven como un sistema de prueba en la determinación de fármacos y métodos disponibles para la destrucción selectiva de varios tipos de cáncer.

**1.3.4. <u>Investigación y desarrollo de fármacos:</u>** Los ensayos a base de células han llegado a ser cada vez más importantes dentro de la industria farmacéutica, no solo en las pruebas de citoxicicidad sino también para el screening a gran escala de compuestos que puede tener un uso potencial como fármacos.

Muchos experimentos realizados *in vitro* tienen el único propósito de determinar el potencial citotóxico de ciertos componentes que vienen siendo utilizados como medicamentos o cosméticos (los cuales obviamente no deberían ser tóxicos); o como agentes anticancerígenos (cuya presencia de citotoxicidad debería ser crucial para su acción). Dentro del campo de la Oncología, se han utilizado cultivos celulares para estudiar tanto los potenciales efectos de carcinógenos sobre células normales como las características biológicas de las células tumorales en cultivo. (Wong, 2002).

## 1.4. CULTIVOS CELULARES Y CÁNCER

Las enfermedades neoplasicas, así como el pronóstico de un posible control tumoral o complicaciones después del tratamiento, se basan en técnicas de diagnostico poco fiables o imperfectas; es por ello, que al no poder establecer un pronostico exacto para cada individuo, la investigación se ve orientada aun campo de enorme interés, la utilización de cultivos celulares con diversos modelos biológicos dentro del estudio del cáncer. Tomando como referencia su frecuencia, gravedad, y los efectos adversos producidos en el organismo. (Núñez, 2008).

El Cáncer es una de las ocho causas de muerte a nivel mundial es el cáncer, en países desarrollados representa la segunda causa de muerte (seguida de las enfermedades cardiovasculares) y la tercera causa de muerte en países subdesarrollados (seguido de enfermedades diarreicas y del corazón). Se estima que las muertes totales provocadas debido al cáncer en el 2007 a nivel mundial fueron de alrededor de 7.6 millones de muertes (aproximadamente 20,000 muertes diarias), 2.9 millones en países desarrollados y 4,7 millones en países subdesarrollados. Por otro lado hubieron alrededor de 12 millones de casos nuevos en ese mismo año, a nivel de los países desarrollados provocó alrededor de 5.4 millones y en países subdesarrollados fue de

6.7 millones (Global Cancer, 2007). Se espera que el reporte global crezca a unos 27 millones de nuevos casos de cáncer y de 17.5 millones de muertes hasta el 2050 debido al aumento en el envejecimiento de la población (WHO, 2006).

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación descontrolada de células que invaden y dañan tejidos u órganos, provocando la muerte del organismo (Global Cancer, 2007). Es el resultado de dos procesos consecutivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células y la posterior adquisición de la capacidad invasiva que le permite escapar de un tejido de origen, colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos (Segretín, 2002).

Esta enfermedad puede ser causada por factores externos (tabaco, productos químicos, radiaciones y organismos infecciosos) e internos (mutaciones hereditarias, hormonas, condiciones inmunes y mutaciones que ocurren durante el metabolismo). Dichos factores causales pueden actuar de manera conjunta o en secuencia para promover el desarrollo de la carcinogénesis. El desarrollo del cáncer requiere de múltiples pasos que se dan durante varios años. (Lodish, 2005)

Es así, que cuando la diseminación de ciertos tumores (metástasis) hace imposible acudir a la cirugía o la radioterapia; la quimioterapia se convierte en una de las alternativas más útiles para el tratamiento del cáncer. La quimioterapia se basa en el uso de antineoplásicos con varios mecanismos de acción que eliminan a las células cancerosas, sin embargo, se pueden producir cambios que desencadenan una resistencia farmacológica por parte del tumor, y además se pueden presentar varios efectos secundarios debido a que el fármaco funciona de manera no selectiva afectando a células sanas y cancerosas (León *et al*,. 2006). Por lo que actualmente, la investigación se ve orientada al descubrimiento y desarrollo de nuevos principios activos con propiedades antineoplásicas

pero que actúen de manera más específica a nivel de células tumorales, tratando de reducir en lo posible los efectos secundarios presentados, para brindar una supervivencia mayor y una posible cura. (Weisenthal *et al*,. 1983).

Desde hace varias décadas el uso de cultivos de células tumorales han permitido evaluar una gran cantidad de sustancias con propiedades citotóxicas, es así que los antineoplásicos que hoy en día están disponibles para el tratamiento farmacológico en la fase inicial de su desarrollo demostraron un efecto citotóxico en varias líneas tumorales, para posteriormente pasar a los modelos animales, para finalmente ser evaluados en humanos, de tal manera, que se pueda predecir las dosis citotóxicas a las cuales aparecerán consecuencias adversas derivadas del tratamiento en estudios con cultivos celulares. (Pauwels, 2003)

## 1.5. CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad celular se ve reflejada en la alteración o cambio en el metabolismo por algún tipo de sustancia, demostrando de esta manera el límite de toxicidad o la acción citotóxica que esta induce. Debido a estas razones se han introducido líneas celulares especializadas, cultivos organotípicos y el continuo uso de células, tratando de medir la complejidad del daño. En el caso especifico de los agentes anticancerígenos los cuales deben inducir citotoxicidad, de tal manera, que se pueda evaluar sustancias que requirieran de un análisis más complejo como pequeños cambios metabólicos, alteración de la señalización intercelular o una respuesta inflamatoria o alérgica (Yanagisawa *et al*,.1998).

La mayoría de los ensayos que miden citotoxicidad tienen la ventaja de ser baratos, fáciles, cuantificables y reproducibles; siendo estas razones validas para que sean ampliamente utilizados. Aunque necesitan cada vez más ser mejorados poniendo mayor énfasis en la especificidad molecular y

regulación metabólica. (Yanfei *et al*,.2007). La elección de uno u otro ensayo de citotoxicidad dependen del tipo de agente a estudiar, de la naturaleza de la respuesta y de la célula diana en particular. Dichos ensayos pueden ser clasificados dentro de los siguientes tipos (Freshney, 2000):

**1.5.1.** **Viabilidad.-**Miden una respuesta inmediata o a corto plazo por ejemplo una alteración en la permeabilidad de la membrana o una perturbación de una ruta metabólica particular.

**1.5.2.** **Supervivencia.-**Aquellos que miden la retención a largo plazo de la capacidad de auto- renovación (5 a 10 generaciones más).

**1.5.3.** **Metabólicos.-** son ensayos de duración intermedia que pueden medir tanto una respuesta metabólica (Ejm: deshidrogenasa, síntesis de DNA, RNA o proteína) al tiempo de la exposición o un poco después; o medir el mismo parámetro dos o tres duplicaciones poblacionales después de la exposición cuando se quiere reflejar mejor el potencial de crecimiento celular y la supervivencia.

**1.5.4.** **Transformación.-** miden la supervivencia en un estado alterado (Ejm: una mutación genética o una transformación maligna).

**1.5.5.** **Irritabilidad.-** miden las repuestas análogas a la inflamación, alergia o irritación *in vivo*; aunque todavía son difíciles de efectuar *in vitro*, se lo puede hacer monitoreando la emisión de citoquinas en cultivos organotípicos.

A partir de esta clasificación de los diferentes tipos de ensayos de citotoxicidad, hemos creído conveniente para nuestro estudio la implementación de una técnica que sea más sensible,

que nos permita la valoración de células regeneradas al finalizar una exposición frente a un agente ya que las células sometidas a un tratamiento tóxico muestran efectos a largo plazo, es decir por varias horas o incluso días después. (Franken, 2006). Dichas técnicas que evalúan específicamente la sensibilidad celular frente a un tipo de agente tóxico, se dividen en dos grupos: por un lado los que miden la citotoxicidad y por otro lado los que miden la supervivencia celular. La diferencia entre estos dos tipos es el fundamento de sus métodos por ejemplo el azul de tripano o ensayo de exclusión de colorante (FDA) se vincula con el acceso a la integridad estructural y función metabólica luego de que las células que fueran expuestas al agente toxico, es así que al contrastarlo con ensayos de supervivencia celular su valoración en cambio se la hace al medir el efecto sea a partir de células muertas o regeneradas (Brown, 1999).

Debido a que muchas de las veces el daño puede ser irreversible para ciertos casos (Kawada et al,. 2002). Se valoro un ensayo que nos permite estimar la habilidad individual de las células al proliferar por largos periodos de crecimiento luego de la exposición al agente, el tiempo de recuperación es comparado con el tiempo que toma para formar colonias denominándose ensayo clonogénico.

## 1.6. ENSAYO CLONOGÉNICO

Es una prueba que nos permite medir la supervivencia, es decir, la capacidad que tienen las células de mantener su capacidad regenerativa y proliferar, se denomina Ensayo clonogénico, prueba conocida también como Supervivencia de Clones o Toxicidad de Clones Supervivientes. Esté ensayo se basa en la formación de colonias a una baja densidad celular siendo el método preferido para el análisis de la proliferación y supervivencia celular. Dicho ensayo nos permite revelar las diferencias en la tasa de crecimiento de una población celular ayudándonos a diferenciar entre alteraciones de la tasa de

crecimiento (tamaño de la colonia) y la supervivencia celular (número de colonias) (Akman *et al*,. 1990).

Cuando las células se siembran a bajas densidades (20 a 200), cada una crece formando una colonia discreta (generalmente una colonia se toma como válida cuando tiene más de 50 células). El porcentaje de células que forman colonias es una medida de la supervivencia, mientras que el tamaño de la colonia es una medida de la tasa de crecimiento. (Puck, 1956; Franken, 2006; Freshney, 2001). El número de estas colonias formadas se puede expresar como eficiencia en placa, calculada con la siguiente fórmula:

$$\%\,\boldsymbol{Supervivencia} = \frac{\text{N° Colonias formadas}}{\text{N° de colonias Sembras}} X\ 100$$

Este ensayo ha permitido tener un acceso a la valoración de toxicidad de agentes anticancerígenos desde hace 50 años seguidamente de la observación de los efectos antineoplásicos. (Brown, 1999). La cuantificación de los efectos en el tratamiento durante el ensayo clonogénico esta basado en la habilidad visual y el conteo preciso.

El ensayo clonogénico usualmente considerado como la "prueba de oro" a nivel de ensayos de los sensibilidad celular, se origina a partir del año de 1956, por los radiobiologisistas Puck y Marcus quienes destacaron en una publicación la valoración del clon y la habilidad de formar de colonias a nivel de platos de cultivo con el medo conveniente. Dicho medio contenía adecuados nutrientes para el desarrollo de las células y sus clones, además su microambiente fue condicionado a factores de radiación para probar que hasta el más pequeño número de células formara clones. Los autores llevaron a cabo sus primeros experimentos obteniendo la primera curva de supervivencia radiación-dosis en células Hela sometidas a radiación de rayos X, con ello demostraron que las células de mamífero eran muy radiosensible, asumiendo

que la dosis letal estaba en un rango de 1 a 2 Gy, obteniendo un porcentaje de supervivencia menor al 1%. Comprobando de esta manera el gran valor del ensayo. (Franken *et al*,. 2006). A través de este ensayo se han realizado muchos estudios con varios tipos de células, es por ello que este ensayo nos permite demostrar las células que han retenido la capacidad de originar una gran descendencia luego de tratamientos que puedan causar muerte celular como resultado de daño a nivel de cromosomas, apoptosis, etc. (Brown, 1999).

Esta técnica es considerada una herramienta de gran utilidad por sus ventajas de bajo costo, reproducibilidad, sencillez, y rapidez para la selección de nuevos agentes quimioterapeuticos; además demuestra una buena correlación con ensayos de viabilidad como el de MTT. (Guda et al,. 2007).

Su utilidad a mediados del siglo XX, fue demostrada al determinar el clonaje y formación de colonias de células madre y de varios tejidos en ensayos in vivo, como por ejemplo: en células madre de la médula del hueso de ratón, donde se mostro un crecimiento y reproducción de las células del bazo, luego de haber sido expuestas a radiaciones durante su valoración en el desarrollo de nuevos tumores en ratas de laboratorio, donde se pudo incrementar la aparición de los mismos y de esta manera proporciona una información sobre la efectividad de los tratamientos *in vivo*. Muchos de estos estudios realizados han proporcionado una información valiosa sobre la diferencia de sensibilidad presentada frente a la radiación o agentes quimioterápicos entre tumores y tejidos normales, determinando así, el posible tratamiento a varias condiciones y modos de aplicación. (Hammamieh *et al*,. 2007).

El ensayo clonogénico a sido usado por varias décadas y en la actualidad, para evaluar efectos de agentes antineoplaasicos como de radiación, quimioterapia, como para el desarrollo de

drogas, tamizaje de drogas, toxicología y en farmacología donde actúa como un método selectivo que determina una muerte de células en reproducción; presenta diversas variaciones en su técnica (crecimiento sobre agar suave, superficies sólidas como cajas de Petri, o en matrices semisólidas de metil celulosa), pero su objeto sigue siendo el mismo, el de evaluar si una célula es capaz de dividirse y formar una colonia, luego de haber sido expuesta a un tratamiento. (Franken,. et al 2006).

Estudios recientes han demostrado aplicabilidad de la prueba para determinación de su eficiencia, al obtener un acercamiento experimental de los efectos de fármacos en el crecimiento y proliferación de células in vitro. (Guda, 2007), al comparar el grado de tinción con azul metileno y bromuro de etidium, en células de cáncer de colon cuyo crecimiento se lo realizo en plástico y colágeno, de tal manera, que se pudo valorar el crecimiento, fijar el tiempo de tinción con ambos colorantes, determinando la posible pérdida de colonias celulares en el lavado, o si bajo estas condiciones el tipo de colonia formada presentaba alguna variación al ser visualizadamediante luz UV.

Estudios que miden una posible resistencia a un fármaco antineoplásico variando un factor de crecimiento para determinar una posible resistencia al condicionar el crecimiento celular antes de la exposición al agentedonde se aumento la cantidad de suero a nivel del medio que sustentaba a los cultivos, de tal manera que se pudo apreciar posteriormente, la posible resistencia mediante el ensayo clonogénico en base al porcentaje de colonias formadas tomando en cuenta la recuperación celular otorgada por la variabilidad del porcentaje de suero. (Hammamieh R, et al,. 2007),

Estudios de la valoración de la sensibilidad y resistencia que producen determinadas sustancias a nivel celular (Muscella A,. et al 2007). Es asi, que en base a estos estudios se puede

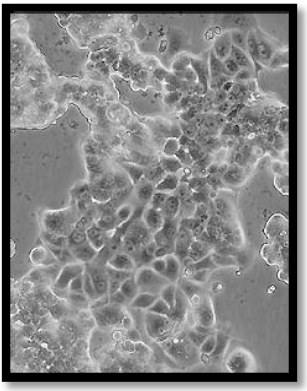
comprobar la gran utilidad del ensayo clonogénico como la prueba de oro, ya que nos permite dar una posible solución a la terapéutica actual ayudándonos a tener un posible control en el tratamiento de la enfermedad. (Nuñez *et al*,. 2008).

# 2. MATERIALES Y METODOS

## 2.1. LÍNEAS CELULARES

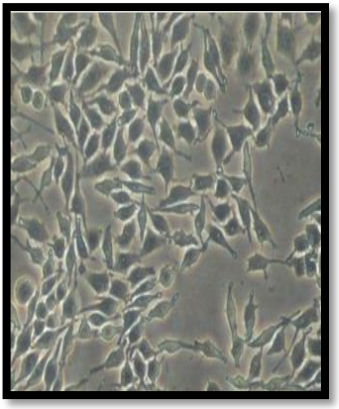
En el presente estudio se utilizaron dos líneas celulares tumorales:

**2.1.1. MCF-7.-** Dicha línea celular tumoral fue extraída de un adenocarcinoma de seno de una mujer caucásica de 69 años de edad. Son células epiteliales pertenecientes al epitelio mamario (Fotografía 1).



***Fotografía 2.1***. *Células de adenocarcinoma Mamario*

**2.1.2. SK-LU-1:** Dicha línea celular tumoral fue extraída de un adenocarcinoma de pulmón de una mujer caucásica de 60 años de edad. Son células epiteliales pertenecientes al epitelio pulmonar (Fotografía 2).



***Fotografía 2**.2 Células de adenocarcinoma de pulmón*

## 2.2. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LINEAS CELULARES

Las líneas celulares tumorales humanas MCF-7 y SK-LU-1 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con Suero Fetal Bovino (10%), L-Glutamina (2 mM). Aminoácidos no esenciales (1%), Antibiótico-Antimicótico (100 UI/ml Penicilina, 100 UI/ml Estreptomicina y 0.25 ug/ml Anfotericina B) y Bicarbonato de Sodio (0.2%); y mantenidas en condiciones estándares de temperatura (37°C) y una atmosfera con 5% de $CO_2$.

Así mismo se criopreservó las células a fin de mantener la morfología y características similares a nivel de las tres repeticiones de tal manera que los resultados puedan ser contrastables a iguales condiciones.

## 2.3. CRIOPRESERVACION DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS

a) Se determinó la ausencia de contaminación, una morfología característica, el estado de confluencia (entre el 70 y 90%).

b) Se descartó el medio de cultivo, se lavó una vez el frasco de células con 5 ml de PBS.
c) Se colocaron 2,5 ml de tripsina al 0.25%, se incubó por un tiempo 2 minutos, luego se resuspendió.
d) Se colocaron 5 ml de medio de cultivo, se resuspendió para centrifugar por 10 min.
e) Se descartó el sobrenadante y al botón celular, se resuspendió con 1 ml de suero fetal bovino.
f) Al obtener una suspensión celular, se colocó una alícuota de 20uL, se mezcló con 900 ul de PBS y 80 de azul de tripano, lo que nos permitió al contar en el hemocitómetro para determinar la densidad celular se realizaron las diluciones posteriores con suero fetal bovino, para obtener en promedio unos 2 a 3 millones de células en un criovial.
g) Los viales se alicuotaron las células en volúmenes de 1000 uL (950 ul de suspensión celular en SFB y 50uL de DMSO).
h) Finalmente se colocaron los crioviales en un contenedor plástico, luego fueron llevados a un congelador de -80°C por 12 horas, y finalmente se conservaron sumergidos a -197 C en un tanque de nitrógeno líquido.

## 2.4. REALIZACIÓN DEL ENSAYO CLONOGÉNICO

### 2.4.1. ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO CON LAS LINEAS CELULARES MCF-7 Y SK-LU-1:

Para la realización del ensayo clonogénico inicialmente se considero dos tipos de variables: los tiempos de incubación y densidad celular apropiados en base a la literatura. Cada uno

de los ensayos se los hizo por triplicado para ello se escogieron 3 tiempos de incubación y 3 diferentes densidades celulares para lo cual se realizaron diferentes combinaciones entre ellos como se detalla en la siguiente tabla 2.1:

***Tabla 2.1**. Esquema de trabajo para estandarizar tiempos de incubación y densidades celulares, pre-tratamiento.*

| **Tiempos de Incubación** | **7 días** | **10 días** | **13 días** |
|---|---|---|---|
| **Densidad celular** | (**100 células**) 3 cajas (**200 células**) (**300 células**) | (**100 células**) 3 cajas (**200 células**) (**300 células**) | (**100 células**) 3 cajas (**200 células**) (**300 células**) |
| **N° de cajas a incubar** | 9 cajas | 9 cajas | 9 cajas |
| | | **TOTAL POR ENSAYO** | 27 cajas x 3 (triplicado) |
| | | **VALORACIÓN DE RESULTADOS** | Total 81 cajas es por cada línea celular |

#### 2.4.1.1. <u>Siembra Celular</u>

a) Las células previamente descongeladas se las coloco en un frasco de 50 cm2 el mismo que tenia que presentar una confluencia de 70 al 80 %.
b) Se lavarón una sola vez con 5 ml de PBS, luego se adiciono 2.5 de tripsina al 0.25% al cultivo celular y se incubó por aproximadamente de 1-2 minutos a 37 °C.
c) Se colocaron 5 ml de medio de cultivo, se resuspendió para luego ser centrifugado por 10 min.
d) Se descartó el sobrenadante y al botón celular se lo resuspendió con 1 ml de medio de cultivo.
e) Se sembró por ensayo prueba 100, 200 y 300 células/caja por triplicado, obteniendo nueve combinaciones por cada día de incubación (7, 10 y 13

días respectivamente). Con un total de 27 cajas por ensayo.

#### 2.4.1.2. Fijación y tinción de colonias

Una vez cumplidos los días de incubación previamente estipulado se procede a realizar lo siguiente:

f) Se descartó el medio de cultivo de cada una de las cajas y se lavó con 3ml de PBS.
g) Luego se colocaron 3ml de metanol se dejó actuar por 10 minutos para dejan secar a temperatura ambiente.
h) La tinción se la realizó con violeta cristal al 0.1% (3ml por caja), se dejo actuar por 10 minutos para luego descartarlo (el mismo puede ser reutilizado) y se lavaron sumergiéndolas, en una tina con agua corriente; finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente para poder iniciar el conteo.

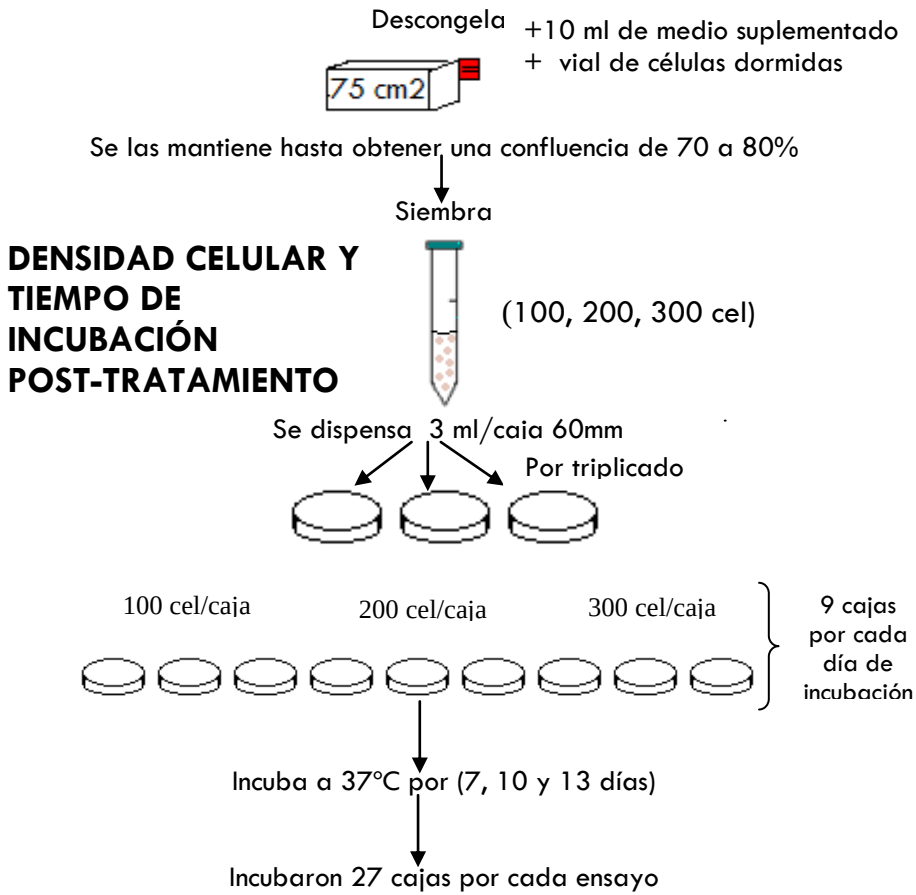
#### 2.4.1.3. Conteo de las colonias

Las colonias formadas se contaron siguiendo una secuencia de escalera, con el fin de recorrer toda la superficie de crecimiento en la caja. Una colonia se tomó como tal si estaba conformada de más de 50 células.Con los datos obtenidos se calculo la supervivencia celular en cada una de las dosis probadas.

#### 2.4.1.4. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizo el programa estadístico GraphPad Prisma, las pruebas de ANOVA, Fisher y Tukey se las utilizó para realizar la valoración de la densidad celular frente a los días de incubación.

**DIAGRAMA PARA LA APLICABILIDAD DEL ENSAYO CLONOGÉNICO EN CÉLULAS MCF-7 Y SK-LU-1(figura 5.2)**



### 2.4.1.5. Tratamiento con Doxorrubicina

Para determinar la dosis mas adecuada como control positivo se trabajo con un fármaco antineoplásico de la familia de las antraciclinas.

**DOXORUBICINA.-** es un antibiótico de amplio espectro, el cual posee una actividad en neoplasias del ser humano, incluso en tumores sólidos, en especial el cáncer de mama y en el cáncer de células pequeñas del pulmón. La dosis total del fármaco suele causar daños irreversibles. (Goodman, 2004). Pertenece al grupo de las antraciclinas; a nivel celular inhibe la síntesis del DNA y RNA o produce rupturas de los mismos y genera radicales libres por acción a nivel de la topoisomerasa II, sin embargo debido a su acción altamente toxica se ve limitada su utilidad clínica. (Gómez *et al*,.2006).

Ya que los agentes antineoplásicos son utilizados en la quimioterapia del cáncer, son tomados en cuenta como un punto de referencia para controles positivos de citotoxicidad *in vitro* en estudios de sustancias con potencial actividad anticancerígena. (Fumihiko *et al*,.2004).

Actualmente para el proceso de búsqueda de sustancias potencialmente efectivas, en base a controles de fármacos antineoplásicos utilizados en quimioterapia en screning *in vitro*, para comprobar su efectividad terapéutica y conocer la dosis mas efectiva, donde se pudo determinar según estudios ya realizados que a nivel del fármaco doxorrubicina (DOX) su DL50 corresponde al 5ug/ml perteneciendo a su dosis potencialmente toxica. (Kugaw *et al*,. 2004).

Para la aplicabilidad de nuestro ensayo se utilizo la doxorrubicina en las líneas celulares tumorales MCF-7 y SK-LU-1. La siembra se la trabajo de manera similar a lo ya estipulado en la sección 2.4.1.1 con la diferencia de que se realizo dos siembras una de 50000 células (para valorar su

adaptabilidad por 24 horas) y otra de 200 células (para valorar su tratamiento con DOXpor 2 horas de exposición) para obtener las diferentes combinaciones entre ellos, así mismo fue por triplicado, dicho tratamiento se lo hizo como se lo explica en la tabla 2.2.

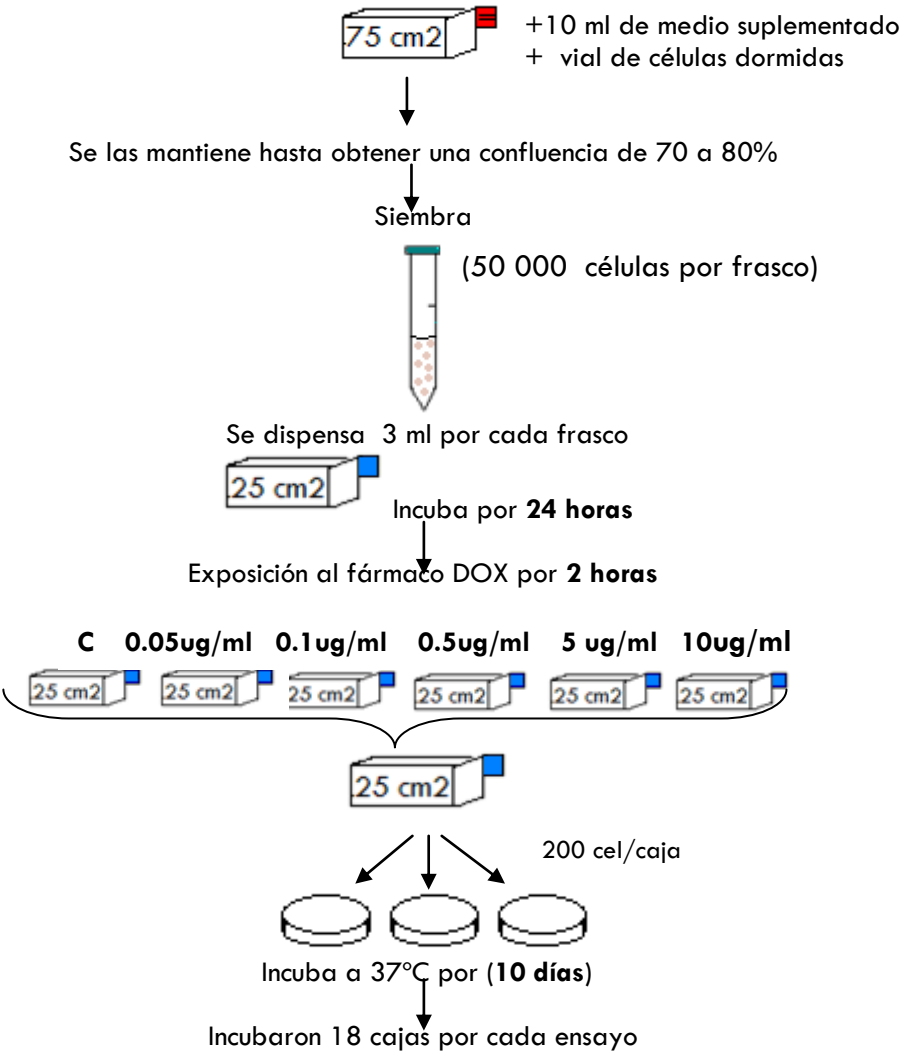
***Tabla 2.2****. Esquema de trabajo para el tratamiento con doxorrubicina para determinar la posible dosis como control positivo post-tratamiento.*

| **Tratamiento con doxorrubicina** | **Tiempos de Incubación final/ Densidad celular** 10 días/200 células/caja | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Control** | **0.05 ug/ml** | **0.5 ug/ml** | **0.1 ug/ml** | **5 ug/ml** | **10 ug/ml** |
| | 3 cajas | 3 cajas | 3 cajas | 3 cajas | 3 cajas | 3 cajas |
| **N° de cajas a incubar** | 18 cajas X 3(triplicado)= 54 cajas x cada línea celular | | | | | |

a) En frascos de 12,5 $cm^2$, cada uno con 5 x $10^4$ células se sembró uno para el control y cinco para cada una de las dosis del fármaco a probar. Del frasco inicial de 75 $cm^2$.
b) Fueron incubados por 24 horas antes del tratamiento toxico.
c) Las células fueron lavadas con 3 ml de PBS, se adiciona las dosis del fármaco se probó por triplicado, cada frasco debía contener 3ml (300 ul del fármaco a probar en concentraciones de 10; 5; 0.5; 0.1; 0.05 ug/ml y 2,7OO ul de medio de cultivo). Los mismos que se incubaron por 2 horas.
d) Finalmente a partir de los frascos probados anteriormente con diferentes dosis, se sembraron 200 células por caja de 60 mm de diámetro (por triplicado), y finalmente fueron incubadas por 10 días.

e) La fijación, tinción, y conteo fue similar a lo ya especificado en las secciones 2.4.1.3 y 2.4.1.4 excepto el análisis estadístico.
f) Para el análisis de los resultados se utilizo el programa estadístico GraphPad Prisma, las pruebas de ANOVA, Dunnet las mismas que fueron utilizadas para la determinación de la dosis frente al control para determinar nuestro posible control positivo.

**DIAGRAMA TRATAMIENTO CON DOXORRUBICINA**
**(Figura 2.4):**



## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los métodos más empleados, desde mediados del siglo XX y hasta la actualidad para determinar la citotoxicidad en modelos celulares es el ensayo clonogénico, debido a que es una prueba a largo plazo que nos permite estimar la supervivencia celular, a partir de la capacidad que tiene la célula de regenerarse luego haber sido expuesta a un agente tóxico, de tal manera que la evaluación *in vitro,* nos permite estimar el posible tipo de respuesta del agente a nivel *in vivo*. (Brown 1999; Franken et al,. 2006).

Dada la importancia de este ensayo, en el Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM) de la UTPL, se decidió implementarlo, para su estandarización, utilizamos dos variables: el tiempo de incubación y la densidad celular post-tratamiento.

Para que las células proliferen formando colonias discretas, se deben cultivar a bajas densidades, generalmente de 2 a 50 células/$cm^2$ (Freshney, 2000), en nuestro caso trabajamos con 4, 7 y 11 células/$cm^2$, que corresponden a las densidades de 100, 200 y 300 células/caja respectivamente, las mismas que fueron incubadas en diversos tiempos. El tiempo de incubación post-tratamiento, dependerá del tamaño macroscópico de las colonias celulares formadas, y que estás a su vez no se sobreponga. Los tiempo de incubación recomendados son de 1 a 3 semanas (Freshney, 2000; Franken *et al,*. 2006), la gran parte de los estudios realizados, se llevan a cabo con tiempos de incubación de una a dos semanas (7 y 14 días) (Weisenthal *et al,* 1983; Akman *et al,*. 1990; Foulke *et al,*. 1990; Goldsmith *et al,*. 1991; Yanagisawa *et al,*. 1998; Kawada *et al,*. 2002), en el presente estudio decidimos probar 3 tiempos diferentes de incubación: 7, 10 y 13 días.

El número de colonias formadas en cada línea celular puede variar dependiendo de la línea, en el caso de las líneas tumorales se espera que gran parte de las células sean capaces de formar colonias a gran escala.

En el caso de la línea celular MCF-7, como se puede observar en el Gráfico 4.1, en la densidad de 100 células/caja obtuvimos una variabilidad de la supervivencia celular dependiendo del tiempo de incubación, la más alta supervivencia se alcanzó a los 13 días de incubación siendo del 88%. Mientras que cuando sembramos 300 células/caja obtuvimos las mas bajas supervivencias a los 7 y 10 días (45 y 46% respectivamente). Donde no existió una variabilidad dependiente de los días de incubación fue en aquellas en las que sembramos 200 células/caja.

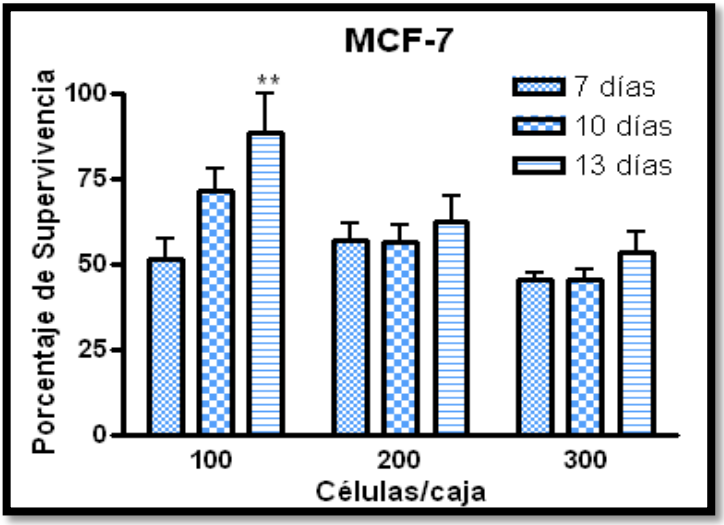
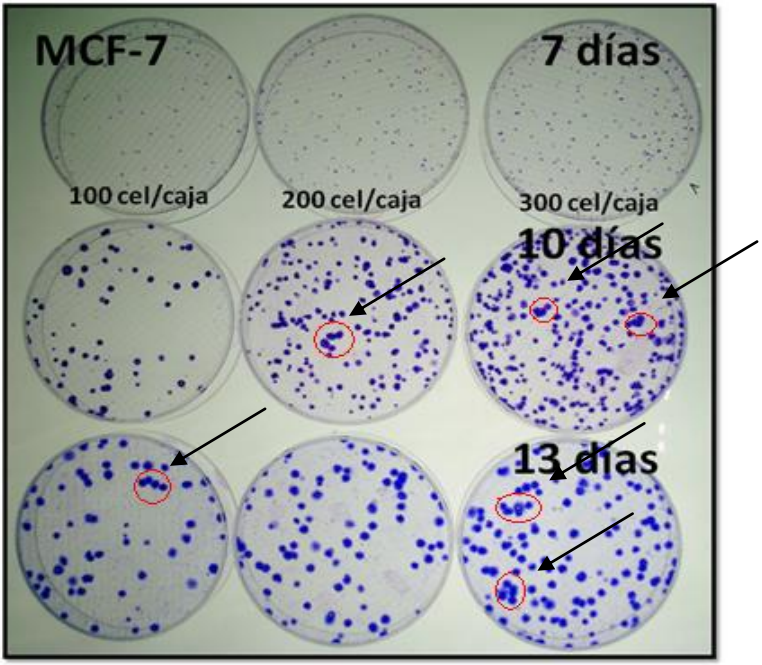



***Gráfico 3.1****.Porcentaje de supervivencia celular de células tumorales humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) a diferentes densidades y tiempos de incubación post-tratamiento. Cada barra representa la media ± la desviación estándar del promedio de tres experimentos por triplicado. **(P>0.01)*

Probablemente la baja recuperación de las colonias a los siete días de incubación, es debido a que las colonias son pequeñas y muy pocas llegan a estar conformadas por el número de células establecidas. (Fotografía 3.1). Además, cuando sembramos 300 células/caja, las colonias al crecer (mientras proliferan las células) terminan contactándose entre ellas, lo que incide en una disminución de la supervivencia celular. Al parecer la incubación durante 13 días es demasiada extensa ya que se observa una migración celular, lo que conlleva a la formación de nuevas colonias, incrementándose el porcentaje de supervivencia, este efecto fue más marcado en la densidad de 100 células/caja. (Fotografía 3.1).




***Fotografía 3.1****.Vista macroscópica de colonias de células tumorales humanas de adenocarcinoma de glándula mamaria (MCF-7) a diferentes densidades y tiempos de incubación post-tratamiento.*

En la línea celular SK-LU-1 como observamos en el grafio 3.2 que las diferencias significativas en la supervivencia celular en los diferentes tiempos de incubación, ni tampoco entre las densidades celulares. Al igual que en las células MCF-7 presentaron fenómenos en la formación de las colonias en los diferentes tiempos de incubación (10 y 13 días).

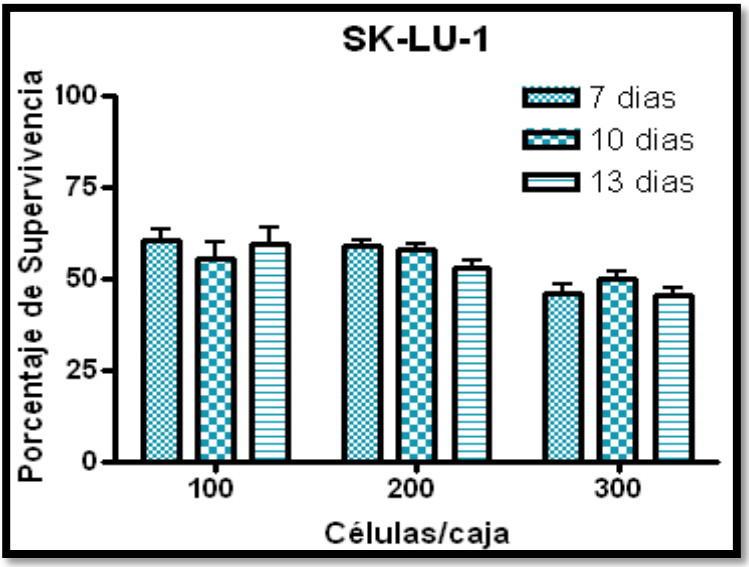
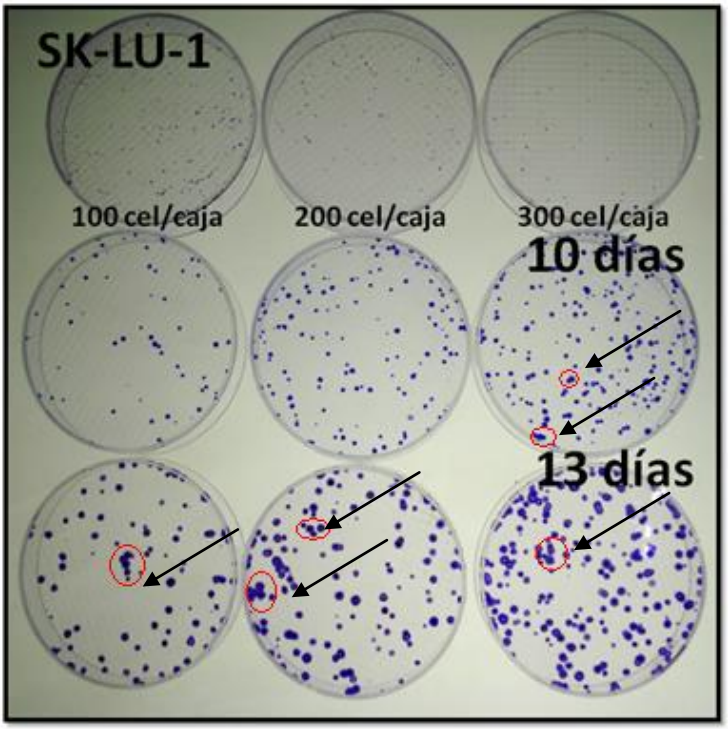



***Grafico 3.2.****Porcentaje de supervivencia celular de células tumorales humanas de adenocarcinoma de pulmón (SK-LU-1) a diferentes densidades y tiempos de incubación post-tratamiento. Cada barra representa la media ± la desviación estándar del promedio de tres experimentos por triplicado.*

Las colonias formadas a los 7 días de incubación al igual que en las MCF-7 fueron bastante pequeñas, en relación a los 10 y 13 días de incubación. (Fotografía 3.2).




***Fotografía 3.2.****Vista macroscópica de colonias de células tumorales humanas de adenocarcinoma de pulmón (SK-LU-1) a diferentes densidades y tiempos de incubación post-tratamiento.*

Para aplicabilidad de nuestro ensayo, en el caso de la densidad celular, se valoro que las células, a altas concentraciones pueden compensar el efecto toxico otorgado por el agente durante la exposición, y en el caso de bajas concentraciones la supervivencia y la baja significancia estadística, decidimos que las condiciones para trabajar seria la densidad de 200 células/caja, aunque no hubo una diferencia significativa en la supervivencia celular entre las densidades de 100 y 300 células/caja; nuestra opción elegida nos permite mejorar la sensibilidad de la prueba al

incrementar el número de colonias que se pudieran formar luego de un tratamiento tóxico (Freshney, 2000).

Así mismo, se valoro que el tiempo de incubación más apropiado pudiera ser el de 10 días ya que por una parte, el tamaño de las colonias es el óptimo para realizar el conteo microscópico y además podríamos discernir efectos sobre el crecimiento tomando en cuenta el número de células por colonia.

### 3.1. Determinación de la dosis de doxorrubicina como Control Positivo de Citotoxicidad.

La valoración de la citotoxicidad *in vitro* sigue siendo una herramienta válida y útil en las primeras etapas de la selección de compuestos promisorios, para la búsqueda de nuevas moléculas con potencial actividad anticancerígena; para dar solidez a dicha valoración es necesario disponer de líneas celulares tumorales humanas y conocer su sensibilidad a agentes de acción citotóxica demostrada (León *et al,* 2006) generalmente al evaluar un evento mediante cualquier biomarcador, es necesario contar con un control positivo.

Un buen control positivo para la determinación de la citotoxicidad es aquel que demuestra su efectividad al dar una confirmación de su toxicidad anticipadamente dentro de la prueba (por ejemplo para un fármaco citotóxico) el cual requiere de un ensayo conservativo, con una mínima exposición al fármaco comparada con la exposición *in vivo*, antes de aplicar el clonaje de células (Freshney, 2000; León *et al,* 2006; Hamburguer *et al*,. 1977) o subcultivo, a bajas densidades celulares. Para nuestra estandarización utilizamos la Doxorrubicina, es uno de los fármacos más utilizado para la quimioterapia de tumores sólidos, además de ser utilizado como control en ensayos *in Vitro de citotoxicidad,* como de inhibición del y ensayos de inducción de apoptosis. Utilizamos 5 concentraciones logarítmicas (0,05; 0,1; 0,5; 5 y 10 ug/ml)

de doxorrubicina para establecer que dosis podrían ser la más adecuada para utilizarla como control positivo en ensayos posteriores. (Weisenthal *et al,*. 1983; León *et al,*. 2000; y Kawada *et al,*. 2002).

Al momento de aplicar un tratamiento tóxico, se sabe que las células a altas concentraciones, pueden soportar mejor el efecto inducido por un agente durante la exposición, por lo que el resultado podría ser un falso negativo, y en el caso de concentraciones muy bajas la supervivencia y las pruebas estadísticas serían poco confiables y pueden dar falsos positivos, en base a esto se decidió someter 50 000 células/frasco a 24 horas de incubación antes del tratamiento con doxorrubicina, debido a que a esta concentración inicial representa luego una población en etapa de crecimiento exponencial.

En las dos líneas celulares, se pudo determinar que conforme aumenta la dosis del fármaco el porcentaje de supervivencia disminuye y la capacidad total menos abatida, en el caso de las células MCF-7 con las dosis de 0.5, 5, 10 ug/ml y en células SK-LU-1 con las dosis de 5 y 10 ug/ml.

Según se puede observar (Gráfico 3.3) para las células MCF-7, con la dosis de 0.05 ug/ml obtuvimos un porcentaje de supervivencia del 67% ($p < 0.05$), y con la dosis de 0.1 ug/ml del 39% ($p < 0.01$).Una vez obtenidas los porcentajes de inhibición se determinó la dosis letal cincuenta ($DL_{50}$) la cual fue de 0.078ug/ml. En el estudio realizado por León C. y colaboradores en el 2006, encaminado a la optimización de un Ensayo Citotóxico basado en MTT utilizando un panel de 7 líneas tumorales celulares, determinaron que la $DL_{50}$ de la doxorrubicina en MCF-7 obtenida fue de 0,095ug/ml, cercana a la nuestra.

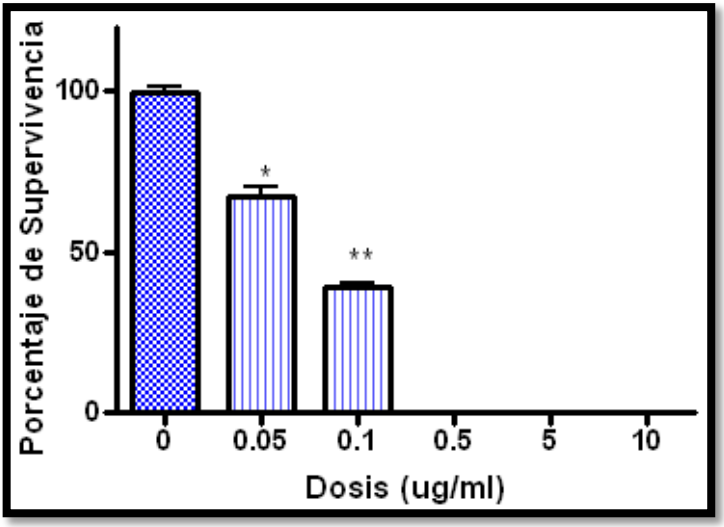



***Grafico 3.3.*** *Estandarización de la dosis de Doxorrubicina como control positivo en células MCF-7 (Cáncer de mama). Cada barra representa la media ± la desviación estándar del promedio de tres experimentos por triplicado. Se indica el error estándar en cada caso. *(P<0.05) **(P<0.01)*

Es así, que para el desarrollo de Ensayos Clonogénicos posteriores, se decidió en el caso de la línea celular MCF-7 0.1 ug/ml pudiera ser la mas conveniente como control positivo, debido a que fue estadísticamente más significativa y su porcentaje de supervivencia presento cercanía con la $IC_{50}$ (0.078ug/ml).

Según se puede observar (Gráficos 3.4) para las células SK-LU-1, con la dosis de 0.05 ug/ml obtuvimos un porcentaje de supervivencia del 53% (p <0.01), y con la dosis de 0.1 ug/ml del 30% (p<0.001). Una vez obtenidas los porcentajes de inhibición se determinó la dosis letal cincuenta ($DL_{50}$.) la cual fue de 0.059ug/ml. En el estudio realizado por Kawada y colaboradores en el 2002, en una importante correlación encontrada entre el ensayo Clonogénico y MTT, en células de adenocarcinoma de pulmón (ABC-1) al momento de comparar efectos citotóxicos inducidos por antraciclinas determinaron

que la $DL_{70}$ fue de 0,022 ug/ml, al comparar con nuestro ensayo se obtuvo un valor cercano al obtenido en la línea SK-LU-1 (también derivadas de adenocarcinoma de pulmón).

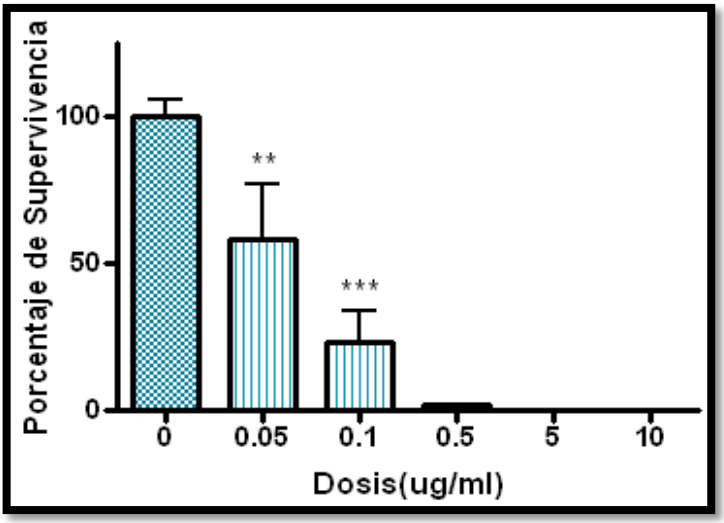



***Gráfico 3.4****Estandarización de la dosis de Doxorrubicina como control positivo en células SK-LU-1 (Cáncer de pulmón). Cada barra representa la media ± la desviación estándar del promedio de tres experimentos por triplicado. Se indica el error estándar en cada caso.**(P>0.01) *** (P<0.001).*

Es así, que la dosis mas conveniente como control positivo pudiese ser aquella que este comprendida entre 0.05 y 0.1 ug/ml, debido a que se indujo una disminución cercana al 70% de la población celular, quizás porque la exposición fue de 1 hora, en el estudio anteriormente mencionado.

De esta manera se puede confirmar la efectividad de nuestra prueba ya que nos permitió hacer una valoración concreta del agente la doxorrubicina, en dos líneas celulares MCF-7 y SK-LU-1, demostrando como un buen control positivo para posteriores ensayos donde se pueda evaluar sustancias con posibles características antineoplásicas.

## 4. CONCLUSIONES

**4.1** Al establecer la densidad celular en las líneas celulares tumorales MCF-7 y SK-LU-1 para la aplicación del ensayo clonogénico, se determino que la densidad más adecuada sea 200 células/caja

**4.2** Se determinó que el tiempo mas apropiado para la aplicabilidad de nuestro ensayo para ambas líneas celulares fuera 10 días de incubación.

**4.3** En nuestro ensayo se comprobó que las dosis elegidas como control estarían entre (0,05 y 0.1ug/ml) para las células SK-LU-1 y para la línea MCF-7 la dosis 0.1ug/ml.

## 5. BIBLIOGRAFIA:


- Astudillo, A. (2006). Estudio citotóxico de plantas medicinales de la región Sur del Ecuador: Baccharis Latifolia, Callisia repens, Crotalaria ssp, Gynoxis Verrucosa, Luchvigia Peruviana, Piper Barbatum y Tagetes Filifolia, en la línea celular CHO – K1. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.

- Akman S, Forrest G, Fong-Fong Chu, Esworthy S, and Doroshow J (1990). Antioxidant and Xenobiotic-metabolizing Enzyme gene Expression in Doxorubicin-resistant MCF-7 Breast cancer Cells, Cancer Research 50, págs. 1397-1402.

- Brown R, and Boger U, (1999). Cytotoxic Drug Resistance Mechanisms, Methods in molecular medicine, Humana Press Inc, Edition N°2, págs. 35-40.

- Cabané T. P, *et al,*. (2007). Optimización de cultivos de hepatocitos humanos para estudios de citotoxicidad, Revista Chilena de Cirugía, Vol 59-N2, págs. 116-121.

- Ching Y, *et al,*. (2005). Molecular epidemiology of cancer. CA Cancer J Clin American Cáncer Society, Inc., 2005, Vol 1, *55*, págs: 45-54

- Cofán M, Fernández-Solá J, (1991).Cultivos celulares: Utilidad en investigación biomédica, Medicina Clínica VOL. 98 NÚM. 20, págs.: 782-789.

- Fellows M. *et al*,.(2007). Cytotoxicity in cultured mammalian cells is a function of the method used to estimate it.

- Franken N, et al (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. Nature protocols Vol1 N°5, págs: 2315- 2319.

- Freshney R., (2000) Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique. Cuarte Edition, Editorial Wiley-Liss Cap. 20 – 21 p. 319-343.

- Frías González S. E. Zentella Dehesa A, (2005). Caracterización de la Adhesión de Células Metastásicas Humanas a cultivos endoteliales humanos activados por factores derivados de células tumorales. Memorias del XIV Congreso deBioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C, Oaxaca.

- Foulke R, *et al*,. (1990). In vitro assessment of the effects of granulocyte- Macrophage Colony-stimulating Factor on primary Human Tumors and derived Lines, Cancer Research 50, págs: 6264-6267.

- FumihikoKugawa, Akemichi Ueno, Miho Kawasaki and Masatada Aoki.Evaluation of Cell Death Caused By CDF(Cyclophosphamide, Doxorubicin, 5-Fluorouracil) Multi-drug Administration in the human Breast Cancer Cell Line MCF-7, Vol 27, págs:

- Garrido H, Yunga E. Incidencia de Câncer em Loja. Registro de Tumores Solca-Loja 1997-2003

- Graham *et al*,.(2006). Epidemiology- Identifying the causes and preventability of cancer. Revision Perspectives.

- Goodman y Hilman. (2002). Bases Farmacológicas de la Terapéutica Actual, Decima Edición, págs.: 1456-1469.

- Goldsmith K, Catherine M, Listinky T and Garver R (1991). Serum response heterogeneity among Nonsmall cell Lung cancer Cell lines, American journl of pathology, Vol 139 N° 4, págs 939-947.

- Guda K, Leanna N, Sanford D. (2007) An improved method for staining cell colonies in clonogénico assays, Springer, Cytotechnology 54, págs:85-88.

- Hahm H, Dunn V et al,. (2001) Combination of standard cytotoxic agents with polyamine analogues in the treatment of breast cancer cell lines, Clinical Cancer Reasearch, Vol 7, págs: 391-399.

- Hambueger A, Salmon S. (1977) Primary Bioassay of human Myeloma Stem Cells, The journal of clinical Investigation, Volume 60, págs: 846-854.

- Hanahan D. Weinberg R, (2000). The Hallmarks of Cancer. Cell, vol. 100, págs: 57-70. .

- Hanada K, *et al*,. (1998). Mammalian Cell Mutants Resistant to a Sphingomyelin-directed Cytoiysin.

- Highiey M. *et al,*.(2006). The Pharmacokinetics of Mitomicyn C in the Mitomicyn C, Ifosfamide and Cisplatin (MIC) Regimen. International Journal of Pharmacology, págs. 293-297.

- Kaoru S. *et al,*. (2003). Effect of *in vitro* exposure time on comet assay results. Environ Mutagen Res. 25, pags 83-86.

- Kawada K, Yonei T, Ueoka H, *et al,*.(2002). Comparison of Chemosensitivy Tests: Clonogenic Assay versus MTT Assay, Actamedica Okayama, Vol 56, N° 3, págs: 129-134.

- Kishore G, Leanna N, Sanford M (2007). An improved method for staining cell colonies in clonogenic assays, Springer, Cytotechnology 54, págs: 85-88.

- Kugaw F. *et al,*.(2004). Evaluation of Cell Death Caused by CDF (Cyciophosphamide, Doxorubicin, 5-FluorouracíÍ) Multi-drug Administration in the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. Published online, Vol. 27, N° 3.

- Kuo-Wei Tai, *et al.,*. (1998). Cytotoxic effect of pingyangmycin on cultured KB cells. Elsevier Science, Oral Oncology 34, págs: 219-223,

- Lodish *et al,*. 2000. Biología Celular y Molecular. Editorial Canadá, págs: 345-378.

- León C, et al,. (2006) Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad in vitro, Grupo de Farmacogenética del cáncer, Bogotá- Colombia, Biomédica, Vol. 26, págs: 161-168.

- López J, et al,. (2000) Efecto en el ciclo celular de líneas de adenocarcinoma pulmonar por cumarina 7-hidroxicumarina, Rev Inst Nal Enf Resp Mex, Trabajo de CONACYT, Volumen 13, N° 4, págs 192-197.

- Martin M, Casado A, Llorente L, *et al,*. (1997). Quimioterapia intensiva con cuatro fármacos y trasplante autogénico de células progenitoras de sangre periférica en el cáncer diseminado de mama, Med Clin Barc, Vol. 109 págs: 775-781.

- Lieberman M, Patterson G, Moore R., (2001). *In vitro* bioassays for anticancer drug screning: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity, Elsevier,

- National home office: American Cancer Society, Inc, 250 Williams St, Nw, Atlanta, GA, Vol. 404 págs: 3320-3333.

- Pauweis B, *et al,*.(2003). Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for *in vitro*, Cancer Chemother Pharmacol, Vol. 5, págs: 221-226.

- Paz y Miño C, Creus A, Cabre O, Leone P.(2002).Genética Toxicologica y Carcinogenesis, PUCE, Quito - Ecuador.

- Poliseno A. et al, (2002). Bcl2-negative MCF7 cells overexpress p53 implications for the cell cycle and sensitivity to cytotoxic drugs. Cancer ChemotherPharmacol, Vol. 50, págs: 127-130.

- Puck t. & Markus p. (1956). Clonal growth of mammalian cells in vitro, págs: 273–284.

- Ravid A. *et al,*. (1999). 1, 25- Dihydroxyvitamin D3 Enhances the Susceptibly of breast cancer cells to Doxorubicin-induced oxidative damage, Cancer Research, Vol. 59, págs: 862-867.

- Requena, L. (2006) Estudio Citotóxico de extractos de plantas medicinales del Sur del Ecuador mediante ensayo de MTS en líneas celulares carcinogénicas. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja- Ecuador.

- Ryan J, (2006). Introduction to Animal Cell Culture, Technical Bulletin, Corning Incorporated Life Sciencies, 900 Chelmsford St Lowell, MA 01851.

- Segretin M. (2002). Los cultivos celulares y su importancia,. Review ArgenBio.

- Weisenthal L *et al,*.(1983). Comparison of dye exclusion assays with a clonogénico assay in the

determination of drug- induced cytotoxicity, Cancer Research Vol. 43, págs: 258-564.

- Wong P,. (2002). Cytostatic potential of novel agents that inhibit the regulation of intracellular pH, British Journal of Cancer, Vol. 87, págs:238 – 245

- Yanagisawa T. *et al,*.(1998). Isolation and characterization of radioresistant human KB carcinoma cells *in vitro*. Elsevier Science, Oral Oncology 34, Vol. 22, págs:30-38.

- Yanfei Z, Xinbin G,Ebrabim A, Zhang R, Sridhar R,. (2007). Nicotine decreases the Cytotoxicity of Doxorubicin towards MCF-7 and KB-3.1 Human cancer Cells in Culture, Vol. 99.

- Yépez J, 2006. Instituto Nacional de Tumores. Quito – Ecuador. www.Hoyonline.com Junio 2007

# 6. ANEXOS:

## ANEXO 6.1 PUNTOS CRITICOS PARA LA REALIZACIÓN DEL ENSAYO CLONOGÉNICO

Durante la realización de nuestro ensayo es conveniente tomar en cuenta los diversos puntos críticos al iniciar cada una de las diferentes etapas valorada en lo siguiente:

6.1 Al inicial el ensayo clonogénico es conveniente toma en cuenta lo siguiente:

**Puntos críticos**

- Las células debieron estar libres de cualquier tipo de contaminación sea de bacterias o levaduras.
- Se debe asegurar que las células estén en etapa exponencial de crecimiento.
- Es importante que el número de células sea el correcto para poder determinar un dato certero de la eficiencia en placa.
- La dilución celular a partir de la suspensión celular total debe ser la correcta para efectuar la siembra.

6.2 Durante la fijación y tinción luego de tratamiento es conveniente tomar en cuenta lo siguiente:

**Puntos críticos**

- Es conveniente realizar el lavado de las cajas despacio para evitar el levantamiento de las colonias que se hayan formado.
- Los tiempos de cada una de las sustancias utilizadas deben ser exactos para evitar una mala fijación en el caso de metanol, o una mala tinción en el caso del violeta cristal.
- Se debe dejar secar las cajas completamente antes de la fijación y tinción.