

OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO IN VITRO DE EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD CON ESPERMATOZOIDES DE RUMIANTES

M. Florencia Puigvert¹; Macarena Eugui¹; Mauricio Cabrera¹; Jorge Gil¹

1- Cenur Litoral Norte. Sede Paysandú. Universidad de la República.

RESUMEN

El desarrollo de fármacos requiere de estudios preclínicos de toxicidad que implican el uso y eutanasia de animales de experimentación o la utilización de cultivos celulares. Estos métodos tienen muchas desventajas como temas bioéticos y costos elevados, lo cual ha incentivado la búsqueda de materiales biológicos alternos. Los espermatozoides de mamíferos son una buena alternativa. El objetivo del siguiente trabajo fue optimizar un ensayo de citotoxicidad *in vitro* a través de la evaluación de calidad y cinética espermática de semen bovino mediante microscopía y un sistema CASA. Los datos obtenidos fueron comparados con un modelo *in vitro* de citotoxicidad en líneas celulares tumorales (MCF-7; HT-29; NCI-H460; y C6).

SUMMARY

Drug development requires preclinical toxicity studies that involve the use and euthanasia of experimental animals or the use of cell cultures. These methods have disadvantages, such as bioethical issues and high costs, which has encouraged the search for alternative biological materials. Mammalian sperm are an excellent alternative. The following work aimed to optimize an *in vitro* cytotoxicity assay by sperm quality and kinetics evaluated by microscopy and a CASA system. The data obtained were compared with an *in vitro* model of cytotoxicity in tumor cell lines (MCF-7; HT-29; NCI-H460; and C6).

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos fármacos requiere de estudios preclínicos de toxicidad que impli-

can el uso y eutanasia de millones de animales de laboratorio por año. Esto es un tema de debate bioético, por lo que actualmente se buscan alternativas a la utilización de animales de experimentación (Vicente-Carrillo et al., 2015). La utilización de cultivos de células y tejidos de mamíferos *in vitro* para la evaluación de toxicidad de fármacos ha tenido gran desarrollo demostrando ser un sistema efectivo y de uso rutinario (Freshney, 2010), que permiten evaluar el daño celular luego de la exposición a compuestos químicos. Estos modelos tienen como ventaja la posibilidad de utilizar células de diversos orígenes histológicos y diferentes especies, pero implican costos importantes en la compra de líneas celulares comerciales, condiciones de trabajo asépticas, parámetros para el cultivo (temperatura, humedad y atmósfera, medios, suplementos) y sistemas de congelamiento de stocks (Freshney, 2010). Por dicha razón, se buscan otros materiales biológicos alternativos como espermatozoides de mamíferos (Vicente-Carrillo et al., 2015). Los espermatozoides son células capaces de demostrar viabilidad mediante el movimiento progresivo gracias al bateo simétrico del flagelo, dependiente del metabolismo mitocondrial y reservas de ATP (Peña et al., 2009). Los cambios que manifiestan son identificables y cuantificables mediante diferentes técnicas, haciendo a los espermatozoides un modelo adecuado para el estudio de mecanismos de acción de compuestos bioactivos (Vicente-Carrillo, 2018). Para detectar dichos cambios en la cinética se usan sistemas computarizados de análisis de semen (CASA), basándose en la digitalización de imágenes sucesivas de una suspensión de semen en un lapso de tiempo. El objetivo del presente trabajo fue optimizar un ensayo de citotoxicidad *in vitro* con espermatozoides bovinos mediante microscopía y un sistema CASA

(Androvision®, Minitube, Alemania). Los datos obtenidos fueron comparados con el modelo *in vitro* de citotoxicidad en líneas celulares tumorales (MCF-7: cáncer de mama; HT-29: cáncer de colon; NCI-H460: cáncer de pulmón; y C6 (ATCC® CCL-107™) glioma de rata).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron dosis comerciales de semen de un bovino adulto de raza Aberdeen Angus, congeladas en pajuelas de 0,5 mL y almacenadas en N2 líquido (-196°C) de acuerdo a estándares comerciales (Baracaldo et al., 2007). Para cada ensayo, se descongelaron dos pajuelas a 37°C por 40 segundos, y se realizó un pool de ambas en microtubos de 1,5 mL. Se diluyeron en PBS (pH 7 tampón fosfato salino) hasta la concentración estandarizada de análisis (40x10⁶ esp./mL). Se evaluó a 37°C en cámara Makler® (10µL), con microscopía óptica (Olympus BX41, PHnegativo, Tokio, Japón) usando el software AndroVision®. El análisis cinético se realizó previo y posterior a cada paso de dilución e incubación con los compuestos. Se evaluaron 15 compuestos quími-

cos de síntesis desarrollados como potenciales antitumorales y antiparasitarios (Compuestos 1-15) y un ectoparasitocida comercial de uso veterinario (Fipronil). Las soluciones stock de los compuestos seleccionados fueron preparadas en 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mM, y posteriormente se realizaron diluciones hasta alcanzar 100µM 1% DMSO. Se realizaron suspensiones semen-compuesto (50 + 50 µL) y se incubaron en placa de 96 pocillos a 37°C con agitación orbital por un período de 30 minutos, conjuntamente con un control negativo 1% DMSO, todo por duplicado. Luego de la incubación se evaluó la cinética espermática en muestras incubadas con cada compuesto en estudio. Para cada evaluación se tomaron 4 secuencias (60 campos/s). Al final del proceso el software determinó el porcentaje de motilidad progresiva (%PROG) y velocidad promedio de la trayectoria espermática (VAP µm/s).

Las comparaciones de este modelo de citotoxicidad se hicieron con datos de cultivos celulares de cuatro líneas tumorales diferentes: MCF-7: cáncer de mama; HT-29: cáncer

Tabla 1. Tabla comparativa entre indicadores de toxicidad del cultivo de líneas celulares (MCF-7, HT-29 y NCI-H460) medidos por el ensayo de SRB, y el modelo de citotoxicidad de espermatozoides bovinos. La concentración del compuesto testeado es de 100µM 1% DMSO.

COMP.	IC50 (µM)			% PROG	% VAP
	MCF-7	HT-29	NCI-H460	ESPERM.	
1	>100	>100	>100	116,4	98,5
2	>100	>100	>100	107,4	105,0
3	>100	>100	>100	115,6	110,0
4	(59.8 ±7.9)	(47.3±4.9)	(56.4±2.0)	84,7	108,4
5	(17.3±4.1)	(50.7±2.2)	(49.7±2.4)	28,7	162,3
6	>100	>100	>100	87,9	112,7
7	>100	>100	>100	93,6	111,7
8	(47.9 ±6.6)	>100	>100	41,3	104,1
9	(6.40 ±0.9)	(24.3 ±1.4)	(32.4 ±0.9)	64,7	104,0
10	>100	>100	>100	118,1	111,0
11	>100	>100	>100	96,7	111,1
12	>100	>100	>100	106,5	109,9
13	>100	>100	>100	101,3	101,8
14	(2.5 ±0.9)	(6.0 ±0.2)	(3.7±1.1)	8,0	295,5
15	(2.9 ±0.2)	(7.7±0.03)	(2.9 ±0.3)	74,1	101,1

de colon; NCI-H460: cáncer de pulmón; y C6 glioma de rata. El análisis de citotoxicidad que se empleó para los cuatro tipos celulares, fue un ensayo colorimétrico de sulforodamina B (SRB) diseñado por el Instituto Nacional del Cáncer de los EEUU. Paralelamente, se realizó un análisis por medio del método de MTT solamente en la línea C6. La sensibilidad de los ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales se evaluó comparando la concentración inhibitoria media máxima (IC50).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de citotoxicidad espermática expresados como la diferencia porcentual respecto del control (Tabla 1), fueron congruentes con los de los modelos en líneas celulares tumorales.

Los compuestos tóxicos en diferentes cultivos celulares también lo fueron en espermatozoides. El compuesto 8, que había manifestado toxicidad únicamente en una línea celular (MCF-7), también produjo una notoria disminución del %PROG (41,3% respecto al control) revelando la sensibilidad del modelo alternativo. La VAP fue notoriamente mayor respecto del control negativo en los dos compuestos más citotóxicos (C5 y C14), compatible con hiperactivación espermática.

Dentro de las ventajas del uso de semen bovino frente al cultivo de células, se destaca que es una práctica relativamente económica dado que se pueden obtener comercialmente y de una sola vez gran cantidad de células frescas a bajo costo. No se requieren condiciones asépticas, tiempo de preparación pre

y/o post incubación, y los ensayos se realizan en tiempos muy cortos (Freshney, 2010; A. Vicente-Carrillo et al., 2015). Una de las virtudes más importantes de este modelo es que no hay sufrimiento animal ya que la extracción de semen se realiza por métodos para fisiológicos no invasivos (Baracaldo et al., 2007). En la Tabla 2 se presentan los resultados del ensayo colorimétrico de SRB y de MTT sobre el cultivo celular C6 para fipronil comparados con el modelo de citotoxicidad espermática. Los resultados de este último modelo son expresados como la diferencia porcentual respecto del control, pudiendo observarse claramente la disminución de los valores de %PROG luego de ser incubados con la droga, demostrando así toxicidad *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baracaldo, M. I., Barth, A. D., & Bertrand, W. (2007). Pasos para el congelamiento de semen bovino. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*, 12.

Freshney, R. I. (2010). Culture of Animal Cells. In *Journal of Chemical Information and Modeling*.

Peña, F. J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., & Macías García, B. (2009). Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 345–349.

Vicente-Carrillo, A., Edebert, I., Garside, H., Cotgreave, I., Rigler, R., Loitto, V., Magnusson, K. E., & Rodríguez-Martínez, H. (2015). Boar spermatozoa successfully predict mitochondrial modes of toxicity: Implications for drug toxicity testing and the 3R principles. *Toxicology in Vitro*, 29(3), 582–591.

Vicente-Carrillo, Alejandro. (2018). The Usefulness of Sperm Kinematics in Drug-Induced Toxicity Assessment. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 123(1), 3–7.

Tabla 2. Tabla comparativa entre indicadores de toxicidad del cultivo de células tumorales C6 medidos por el ensayo de SRB y de MTT, y el modelo de citotoxicidad de espermatozoides bovinos. La concentración del compuesto testeado es de 100µM 1% DMSO.

	IC50 (µM)		% PROG	% VAP
	SRB	MTT		
Compuesto	C6		ESPERM.	
Fipronil	98.2	77.5	50 %	100 %