

La exposición in vitro a metamidofos induce citotoxicidad y estrés oxidativo en células mononucleares humanas de sangre periférica

RAMÍREZ-VARGAS, M.A.*†, FLORES-ALFARO, E. †, ROJAS-GARCÍA, A.E. †, HUERTA-BERISTAIN, G. † y MORENO-GODÍNEZ, M.E. †

†Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro., C.P. 39070, México. Dirección de Fortalecimiento de la Investigación, Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic, Nayarit, C.P.63190, México

Recibido Junio 4, 2014; Aceptado Octubre 13, 2014

Resumen

Los plaguicidas organofosforados (OP) son empleados para aumentar la producción agrícola y en el control de enfermedades transmitidas por vectores, este grupo de insecticidas ejercen su acción toxica aguda por la inhibición de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en insectos y mamíferos. La exposición crónica a OP también se ha asociado a efectos tóxicos crónicos, principalmente por el daño que a nivel celular ocasionan, entre los cuales destacan la inducción de estrés oxidativo. Se sugiere que el estrés oxidativo puede generarse debido al aumento en la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO), generadas durante el metabolismo de los OP ó por la intervención de los OP en los ciclos redox de las células; además el OP pudiera disminuir la actividad de las enzimas y compuestos antioxidantes, de manera tal que el desbalance entre los agentes oxidantes y antioxidantes generarían el estrés oxidativo, con el consecuente daño oxidativo a biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos principalmente. (Lukaszewicz-Hussain, 2010).

Metamidofos, células mononucleares, sangre periférica.**Abstract**

Organophosphate pesticides (OP) are used to increase agricultural production and control of vector-borne diseases, this group of acute toxic insecticides exert their action by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase activity in insects and mammals. Chronic exposure to OP has also been associated with chronic toxic effects, mainly for the damage they cause cellular level, among which the induction of oxidative stress. It is suggested that oxidative stress may be generated due to the increased release of reactive oxygen species (ROS) generated during metabolism OP or by the intervention of the OP in redox cycles of cells; OP may also decrease the activity of enzymes and antioxidants, such that the imbalance between oxidants and antioxidants generate oxidative stress, with consequent oxidative damage to biomolecules such as proteins, lipids and nucleic acids mainly. (Lukaszewicz-Hussain, 2010).

Methamidophos, mononuclear cells, peripheral blood.

Citación: RAMÍREZ-VARGAS, M.A., FLORES-ALFARO, E., ROJAS-GARCÍA, A.E., HUERTA-BERISTAIN, G. y MORENO-GODÍNEZ, M.E. La exposición in vitro a metamidofos induce citotoxicidad y estrés oxidativo en células mononucleares humanas de sangre periférica. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 Abril 2014, 1-1: 634-637

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: emoreno20@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

El metamidofos (MET) (O, S-dimetil fosforamidotiodato), es un OP y en México es el segundo plaguicida más utilizado en la agricultura y en el control de vectores (Sánchez-Guerra et al., 2011). El mecanismo de toxicidad inducido por el MET ha sido poco estudiado, en relación al estrés oxidativo. Recientemente se evaluó la inducción de estrés oxidativo en células PC12 post exposición a MET usando las dosis de 20 y 40 mg L-1 encontrando que MET induce el aumento en las EROs totales y de igual manera incrementa la lipoperoxidación (Lu et al., 2012), sin embargo, no se sabe si las células primarias a dosis de relevancia biológica respondan de una manera similar al insulto tóxico.

Objetivos

Determinar el efecto citotóxico del metamidofos en cultivo de células mononucleares y cuantificar los niveles de especies reactivas de oxígeno y malonaldehído en células mononucleares de sangre periférica expuestas a metamidofos.

Metodología**Sujetos de estudio**

Las células mononucleares fueron obtenidas de 11 individuos masculinos aparentemente sanos con un rango de edad de 21 a 25 años, los cuales fueron seleccionados por conveniencia. Todos los sujetos carecían de antecedentes de exposición ocupacional a plaguicidas y estaban clínicamente sanos. Los sujetos firmaron el consentimiento informado y los datos se trataron con la confidencialidad que marca el tratado de Helsinki.

Cultivo celular y tratamiento

Las células mononucleares humanas de sangre periférica (CMSP) fueron extraídas por el método de Ficoll Hypaque (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Posteriormente las células mononucleares se sembraron en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco®) suplementado con 5% suero bovino fetal, 1% L-glutamina, y 1% antibiótico/antimicótico en placas de 96 y 24 pozos. Las células se incubaron a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂. Después de la extracción las células se dejaron estabilizar por 24 h y el tratamiento fue agregado en un volumen total de 202 µL. Se utilizó el MET grado técnico (pureza del 97.9%), el cual se diluyó en DMSO en menos del 1%.

Citotoxicidad inducida por el MET

La viabilidad celular se determinó utilizando un ensayo colorimétrico cuantitativo de rojo neutro. Se sembraron 50,000 cél/pozo las cuales fueron expuestas a diferentes dosis de MET: 0, 3, 5, 10, 15, 20, 40, 60 y 80 mg/L. Posterior al tiempo de exposición (24 h) el medio fue removido, y se agregaron 200 µL de rojo neutro 40 µg/mL-1 diluido en RPMI-1640 durante 2 h. Se realizaron 3 lavados con PBS, y se adicionó 100 µL de solución solubilizadora (50% de etanol al 96%, 49% de agua desionizada, 1% de Ácido acético glacial). La placa se mantuvo en movimiento a temperatura ambiente durante 10 min. La Abs fue medida a 545 nm utilizando el equipo Statfax 2100. Fueron consideradas como dosis citotóxicas aquellas concentraciones en las que la viabilidad era menor o igual al 80% respecto al control de vehículo (DMSO). Para evidenciar si el vehículo era el inductor de la muerte celular se incluyó un control basal (células cultivadas sin vehículo ni MET) en cada corrida. Cada condición fue realizada por sextuplicado en dos momentos independiente.

Determinación de especies reactivas del oxígeno intracelulares

La generación intracelular de especies reactivas del oxígeno fueron determinadas usando CellROX® Green (in vitro gen) la cual es una sonda fluorogénica que al ser oxidada por alguna ERO emite fluorescencia.

La técnica se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante. Se sembraron un total de 250, 000 cel/pozo y las células fueron tratadas con el MET durante 6 hrs de incubación. Se agregaron 5 μ M CellROX y se incubó durante 30 min en condiciones estándares de cultivo. Se realizaron tres lavados con PBS, las células fueron resuspendidas en 3 mL de PBS. La fluorescencia fue determinada a 485/520 nm utilizando el citómetro de flujo FACS-Canto II (BD). Se determinaron 100 000 eventos por condición ensayada. Cada condición fue ensayada por duplicado en dos momentos independientes.

Lipoperoxidación

El daño lipoperoxidativo fue evaluado por ello se cuantificaron los niveles de malonaldehído (MAD). Se utilizó el kit "LOP-FR 12 de Oxford Biomedical Research". Este ensayo se basa en la reacción del reactivo cromogénico N-metil-2-fenilindol con el MAD a 45°C: una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas del N-metil-2-fenilindol formando un cromóforo estable, el cual tiene una absorbancia máxima a 586 nm. Para ello una densidad de 6 000 000 cél/pozo fue expuesta por 24 h a diferentes concentraciones del MET, posteriormente el medio fue removido y se realizaron lavados con PBS, las células fueron colocadas en tubos eppendorf y se adicionó 20 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, seguidas de 5 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido/baño maría a 45 °C, seguido de la adición de 15 μ L de N-metil-2-fenilindol y 15 μ L de ácido clorhídrico al 12 N. Esta mezcla fue incubada por 1 h a 45°C por 1 h. Los tubos fueron centrifugados a 14 000 r.p.m. por 15 min, el sobrenadante fue recuperado y la absorbancia fue determinada a 586 nm en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 c, las concentraciones de MAD generado fueron calculados en base a una curva de estándares.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico STATA v.s. 12.0 (College Station, Texas, USA). Las variables fueron representadas como medias y errores estándar. La prueba de ANOVA ó Kruskal-Wallis con prueba Dunnett's post hoc test, fue utilizado para evaluar el efecto de las diferentes dosis del MET sobre la reducción de la viabilidad celular, inducción de EROS y generación de MAD, se consideró como estadísticamente significativos valores de $p < 0.05$.

Resultados

Las dosis de 40, 60 y 80 mg /L se consideraron como citotóxicas por reducir en más del 20% la viabilidad celular y ser significativamente diferentes del control de vehículo. El MET incrementó las ERO a las concentraciones de 3, 10 y 20 mg/L. El incremento con respecto al control de vehículo fue de la siguiente manera 3, 4.9 y 8.6 veces más para las dosis de 3, 10 y 20 mg/L respectivamente (Ver figura 1). El MET aumentó los niveles de MAD 6.2 veces más en comparación con el control de vehículo cuando las células fueron expuestas a 3 mg/L-1 y aumento 15 y 29 veces más cuando se expusieron a 10 y 20 mg/L-1, respectivamente (Ver figura 2).

Discusión

El efecto citotóxico inducido por la exposición a OP, se ha relacionado con la inducción de estrés oxidativo que genera la disfunción mitocondrial y la subsecuente activación de vías de muerte celular (Lukaszewicz-Hussain, 2010). En el modelo de estudio analizado el incremento en ERO y MAD en forma dosis dependiente sugiere que uno de los mecanismos de toxicidad inducida por la exposición a MET es la inducción de estrés oxidativo, estos datos concuerdan con los reportados en células PC12 expuestas al mismo plaguicida (Lu et al., 2012).

Sin embargo el daño oxidativo fue mayor en las células mononucleares humanas que el reportado para las células PC12.

Conclusión

El metamidofos induce efectos citotóxico y estrés oxidativo como mecanismos de toxicidad en células mononucleares humanas

Referencias

Lu, X.T., Ma, Y., Wang, C., Zhang, X.F., Jin, D.Q., Huang, C.J., 2012. Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E. *J. Environ. Sci. Health B* 47, 445–454.

Lukaszewicz-Hussain, A., 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 145–150.

Sánchez-Guerra, M., Pérez-Herrera, N., Quintanilla-Vega, B., 2011. Organophosphorous pesticides research in Mexico: epidemiological and experimental approaches. *Toxicol. Mech. Methods* 21, 681–691.

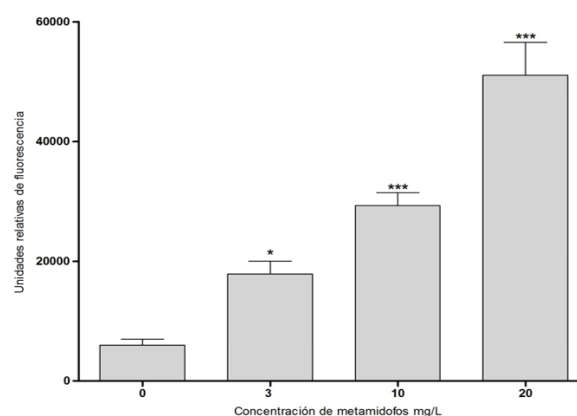


Figura 1 Efecto del MET sobre la inducción de ERO. CMSP fueron expuestas a diferentes concentraciones de MET por 6 h. * diferencia significativa entre el control de vehículo “DMSO” ($p < 0.05$) y las células tratadas. *** diferencia significativa entre el control de vehículo “DMSO” ($p < 0.0001$) y las células tratadas.

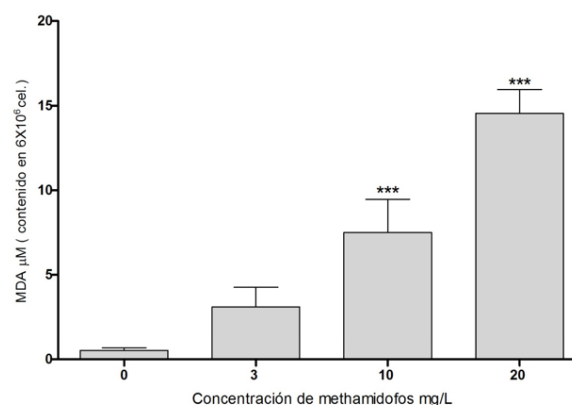


Figura 2 Efecto del MET sobre la inducción de MAD. CMSP fueron expuestas a diferentes concentraciones de MET por 24 hrs. *** diferencia significativa entre el control de vehículo “DMSO” ($p < 0.0001$) y las células tratadas.