

ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR EN DISTINTAS LINEAS TUMORALES EXPUESTAS A TINTURA DE BASQUADÉ.

OBJETIVO

Se evaluó el efecto citotóxico de la tintura de Basquädé *in vitro* sobre las siguientes líneas tumorales: Neuroblastoma (SK-N-SH; ATCC-HTB-11), Cáncer de cuello uterino (HeLa; ATCC-CCL-2), Cáncer mamario (MDA-MB-231; ATCC-HTB-26) y Cáncer de pulmón (A549; ATCC-CRM-CCL-185). Como células control se utilizó una línea primaria normal no tumoral; Wi-38 (ATCC-CCL-75).

Para la evaluación de la viabilidad se utilizó la técnica de cristal violeta. El cristal violeta solamente penetra en las células vivas que fueron fijadas a la placa de cultivo con paraformaldehído, por lo que es una técnica simple que permite determinar viabilidad celular al medir la absorbancia retenida del colorante, la cual es proporcional al número de células viables.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Sobre placas estériles de 96 pocillos se sembraron las diferentes líneas celulares a una concentración de $8 \cdot 10^3$ células/pocillo. Luego de permitir su adherencia por 4 horas a 37°C y una atmósfera de 5% CO₂, se procedió al agregado del producto o del solvente como grupo control. En todos los casos se realizaron diluciones seriadas por triplicado tanto de la tintura como del solvente control para cada una de las líneas celulares a testear. La viabilidad celular se determina al cabo de 72 horas post sembrado en presencia de la tintura o el solvente.

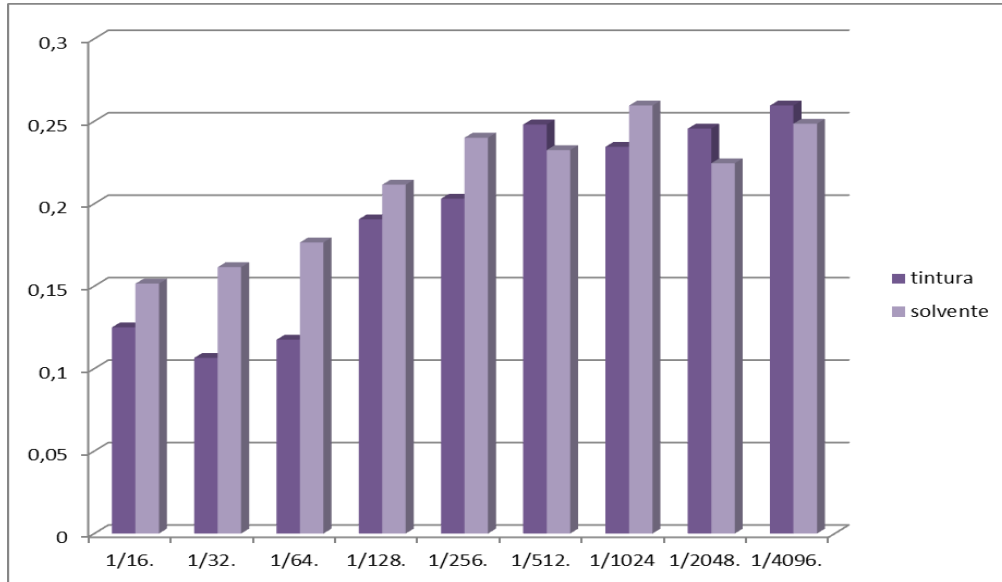
PROCEDIMIENTO DE CITOTOXICIDAD MEDIANTE COLORACIÓN VITAL POR VIOLETA CRISTAL

Luego de 72 horas de incubación a 37°C al 5% de CO₂, se remueve el medio de cultivo y las placas se lavan dos veces con PBS. Luego se fijaron con formaldehído al 5% en PBS 100 mM isotónico pH=7,4 por 10 min a temperatura ambiente. Luego de descartar la solución de fijación se agrega la solución de cristal violeta al 0.05% en etanol 95°. Luego de solubilizado el colorante se procede a leer la absorbancia a 595 nm en un lector de placas.

RESULTADOS

1. Línea celular SK-N-SH.

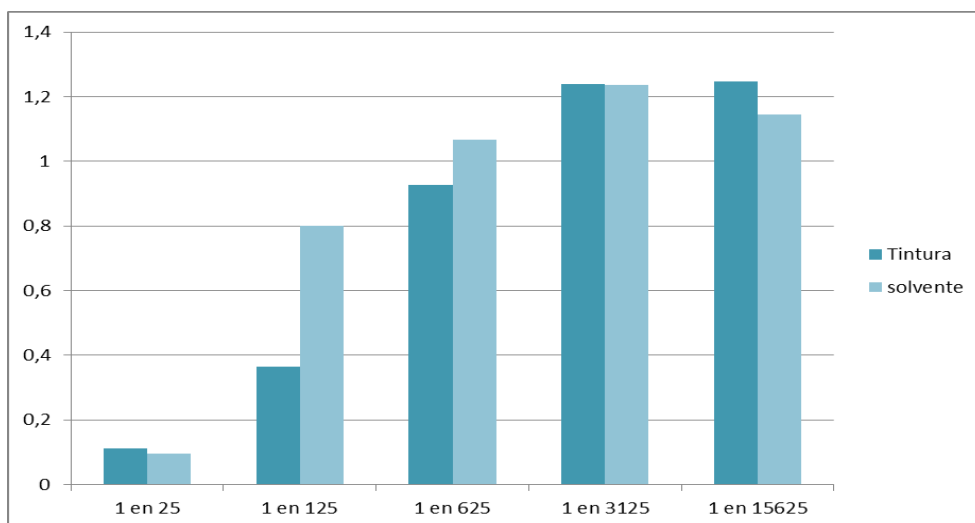
(Gráfico de barras mostrando la absorbancia relativa (eje X) en función de diluciones crecientes de la tintura y el solvente (Y).



Se observa una caída significativa en la viabilidad celular con diluciones de hasta 1/256. Con las siguientes diluciones no se observa una caída en la viabilidad celular al enfrentarlas a la tintura, comparadas con los efectos del solvente.

2. Línea celular HeLa

(Gráfico de barras mostrando la absorbancia relativa (eje X) en función de diluciones crecientes de la tintura y el solvente (Y).

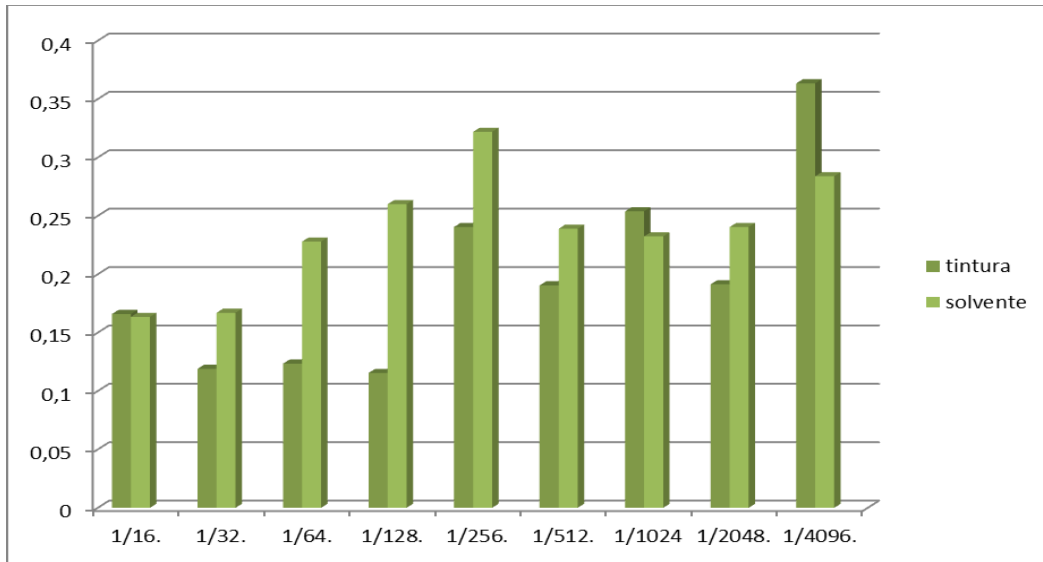


Se observa una caída significativa en la viabilidad celular hasta diluciones de 1/125. Con

as siguientes diluciones no se observa una caída en la viabilidad celular al enfrentarlas a la tintura al enfrentarlas a la tintura, comparadas con el efecto del solvente.

3. Línea celular MDA-MB-231

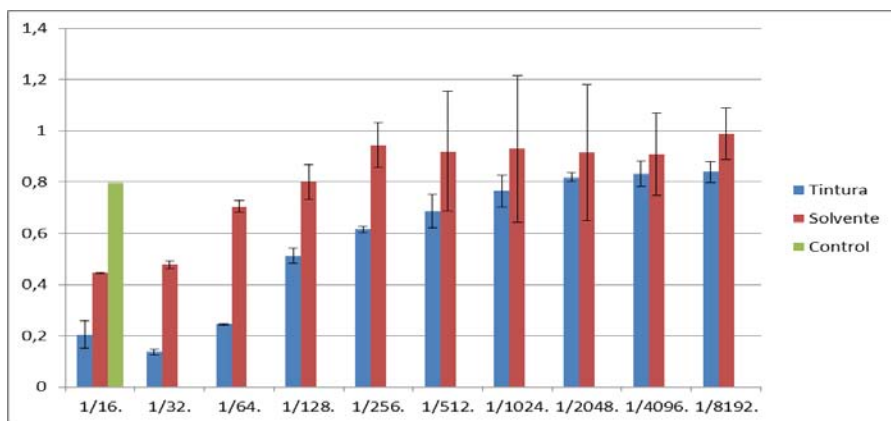
(Gráfico de barras mostrando la absorbancia relativa (eje X) en función de diluciones crecientes de la tintura y el solvente (Y).



Se observa una caída significativa en la viabilidad celular hasta diluciones 1/512. Con las siguientes diluciones no se observa una caída en la viabilidad celular al enfrentarlas a la tintura, comparadas con el efecto del solvente.

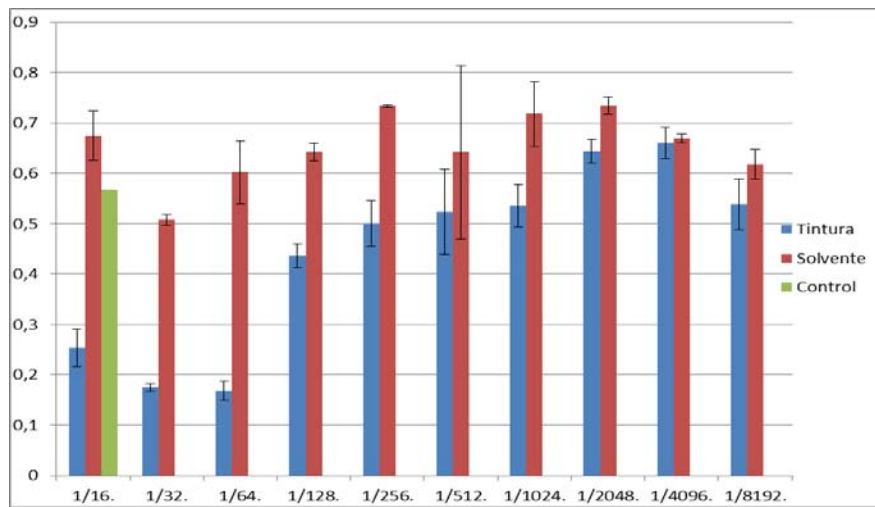
4. Línea celular: A549

(Gráfico de barras mostrando la absorbancia relativa (eje X) en función de diluciones crecientes de la tintura y el solvente (Y).



Se observa una caída significativa en la viabilidad celular hasta con diluciones máximas utilizadas en el presente estudio (1/8192).

5. Línea celular: Wi38



Se observa una caída significativa en la viabilidad celular evidenciable con diluciones de hasta 1/2048. Con las siguientes diluciones no se observa una caída en la viabilidad celular al enfrentarlas a la tintura, comparadas con el control de células sin ser expuestas a la tintura.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. En este estudio *in vitro*, la tintura de Basquädé mostró un efecto citotóxico en todas las líneas tumorales aunque de intensidad variable.
2. Para el caso de las líneas derivadas de neuroblastoma (SK-N-SH), cáncer de cuello uterino (HeLa) y de cáncer mamario (MDA) el efecto citotóxico atribuible a la tintura de Basquädé fue de moderado a mediana intensidad y objetivable hasta diluciones entre 64 veces para la línea SK-N-SH y de hasta 512 veces para la línea MDA-MB-231.
3. Para el caso de líneas tumorales de cáncer de pulmón la tintura de Basquädé mostró un potente efecto citotóxico con efecto hasta diluciones ≥ 8192 veces. Las líneas no tumorales derivadas de tejido pulmonar también mostraron un significativo efecto citotóxico aunque demostrable hasta diluciones menores (≤ 2048 veces)

CONCLUSIONES FINALES

La tintura de Basquädé mostró un efecto citotóxico de moderada a mediana intensidad *in vitro* sobre líneas celulares derivadas de tumores de cuello uterino, neurológico y mamario.


El efecto citotóxico atribuible a la tintura de Basquädé tuvo una potencia significativa con dilu

ciones mayores tanto para las líneas no tumorales de tejido tumoral (Wi-38) como para las tumorales (A549). Sin embargo el efecto fue varias veces más potente para la línea maligna ($\geq 1/8192$) que para las no tumorales ($\approx 1/2048$).

Estos ensayos *in vitro* sugieren que la tintura de Basquädé posee un efecto citotóxico de variada intensidad tanto sobre células normales como células tumorales, cuya potencia depende del tejido de origen.

NOTA: Debido a la naturaleza hidro-alcohólica en que se encuentra diluida la tintura, las diluciones de partida de los ensayos fueron determinadas en función del efecto de este solvente sobre la viabilidad celular en ausencia de la tintura. Por la misma razón, los controles del ensayo consistieron en diluciones similares del diluyente sólo.

Montevideo, 24 de Marzo de 2017



Prof. Dr. Alfonso Cayota

Director

Departamento Básico de Medicina