



IN VITRO CYTOTOXICITY EVALUATION: DNA FRAGMENTATION IN MURINE THYMOCYTES BY ORGANOPHOSPHATE DIMETHOATE

Pavel K. Delgado S.* , Derly A. Delgado S.

Departamento de Ingeniería Química, Laboratorio de Química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa UNSA, Avenida Venezuela s/n, Tel. 5154-233775, Arequipa – Perú, pavelds1@yahoo.com

Keywords: *Citotoxicity, DNA Fragmentation, Dimethoate, Murine thymocytes.*

ABSTRACT

Studies on the effect of pesticides on health are of great interest because they can affect many organ systems such as the immune system which is very sensitive to exposure to environmental contaminants. Therefore, this paper presents the *in vitro* evaluation of the cytotoxicity and the DNA fragmentation in murine thymocytes, cultivated *in vitro* in different concentrations of organophosphate (0,05 %, 0,1 % and 0,2 %) at intervals of 1, 3 and 6 hours respectively. The effect on the cell cytotoxicity, as well as the DNA damage was assessed. On the basis of the results obtained, it is concluded that dimethoate produces cytotoxicity, the generation of a superoxide anion radical which depends on the concentration and on the time. On the other hand it induces the generation of nitric oxide significantly for the concentrations: 0,1 % and 0,2 %. Electrophoretic evaluation of DNA after 6 hours of incubation showed a nucleosomal DNA fragmentation accompanied of a sweep, indicative of necrotic cell death.

*Corresponding author: pavelds1@yahoo.com

RESUMEN

Spanish title: *Evaluación in vitro de la citotoxicidad y la fragmentación del ADN en timocitos murinos por efecto del organofosforado dimetoato.* Los estudios sobre el efecto de los pesticidas en la salud son de gran interés debido a que pueden afectar diversos órganos o sistemas, tales como el sistema inmunológico, el cual es muy sensible a la exposición a contaminantes ambientales. Por tal motivo, el presente trabajo plantea el estudio de la evaluación *in vitro* de la citotoxicidad y la fragmentación del ADN en timocitos murinos los cuales fueron cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones del organofosforado (0,05%, 0,1%, y 0,2%) y tiempos de 1, 3, y 6 horas respectivamente. Se evaluó el efecto sobre la citotoxicidad celular y el daño al ADN. Se concluye en base a los resultados obtenidos, que el dimetoato produce una citotoxicidad, generación de radical anión superóxido dependiente de la concentración y tiempo. Por otro lado, induce la generación de óxido nítrico en forma significativa para las concentraciones de 0,1% y 0,2%. En la evaluación electroforética de ADN, luego de 6 horas de incubación se observó fragmentación nucleosomal del ADN acompañada de un barrido, indicando una muerte celular por necrosis.

INTRODUCCION

Los plaguicidas son sustancias químicas o agentes biológicos que matan las plagas de plantas o animales, y podrán incluir herbicidas, insecticidas y fungicidas. Más de mil millones de libras [más de 453592 t] de pesticidas se utilizan en el mundo cada año para controlar las malezas, insectos y otros organismos que amenazan las actividades humanas [1]. El amplio uso de estos pesticidas como el dimetoato en la agricultura, ha creado una alarma sobre el peligro potencial para la salud siendo el principal blanco el consumidor ya que en los productos se hallan residuos de pesticidas. Adicionalmente los humanos y animales pueden estar expuestos a organofosforados debido a la contaminación ambiental del agua de beber, aguas superficiales y subterráneas, así como por el consumo de peces de aguas contaminadas.

La inmunotoxicología, es una de las áreas de mayor interés dentro de la toxicología debido a que el sistema inmune juega un rol central en el mantenimiento de la salud de un organismo y está gobernado por una serie de delicados, complejos y balanceados mecanismos fisiológicos multicelulares que pueden ser vulnerables a muy bajos



niveles de toxicidad química [2]. La supresión del sistema inmune por ciertos pesticidas se ha sugerido que es la base del incremento en las alergias, hipersensibilidad y cáncer observada en los pobladores expuestos a estos xenobióticos [3].

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, y con el fin de ampliar los conocimientos de los efectos producidos por el dimetoato, se plantea el presente trabajo para estudiar el efecto citotóxico y la fragmentación del ADN inducida por el organofosforado dimetoato, en timocitos murinos, lo cual contribuirá al conocimiento de los posibles efectos sobre las células de los seres humanos, a fin de poder desarrollar medidas de prevención y manejo adecuado de este organofosforado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ensayo de citotoxicidad o método del MTT (metil-tiazole tetrazolium)

En la tabla 1, se muestra que las interacciones para los controles de 1, 3 y 6 horas no presentan citotoxicidad, mientras que las otras interacciones de mayor concentración y tiempo presentan una mayor citotoxicidad altamente significativa.

Tabla 1. Prueba de contraste múltiple de Dunnett, del porcentaje de citotoxicidad en el cultivo de timocitos sometidos a la interacción, concentración de dimetoato x tiempo de exposición.

<i>Interacción Dimetoato x Tiempo</i>	<i>Citotoxicidad Promedio (%)</i>	<i>Desviación Estandar (%)</i>	<i>Significancia- Contraste Unilateral (>) Control x 1hr.</i>
Control x 1hr.	0,00	±0,00	*
Control x 3hr.	0,00	±0,00	N.S.
Control x 6hr.	0,00	±0,00	N.S.
0,05% x 1hr.	37,31	±3,58	A.S.
0,05% x 3hr.	38,94	±2,31	A.S.
0,05% x 6hr.	62,46	±3,59	A.S.
0,1% x 1hr.	42,99	±4,68	A.S.
0,1% x 3hr.	65,59	±1,54	A.S.
0,1% x 6hr.	68,11	±1,45	A.S.
0,2% x 1hr.	50,48	±1,73	A.S.
0,2% x 3hr.	68,89	±0,38	A.S.
0,2% x 6hr.	72,15	±2,00	A.S.

(A.S.= Diferencia Altamente significativa, N.S.= Diferencia No significativo)
* No es posible la comparación entre la misma interacción.

Se muestra en la figura 1, que el mayor porcentaje de citotoxicidad está influenciado por la concentración de dimetoato al 0,2% y a un tiempo de exposición de 6 horas.

Cuantificación de óxido nítrico

Se observa en la tabla 2, la comparación de cada una de las interacciones de concentración de dimetoato (%) x tiempo de exposición observándose que para las interacciones 0,1% x 6 hr y 0,2% x 6 hr, presentan concentraciones de óxido nítrico mayor por lo que son altamente significativos mientras que para las demás interacciones realizadas nos son significativas estadísticamente.

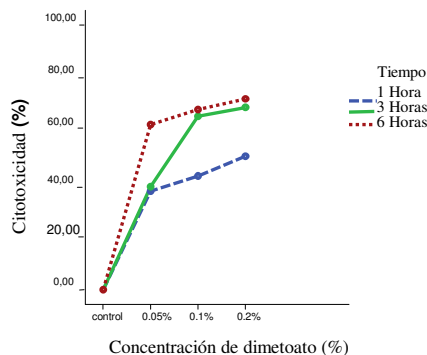


Figura 1. Interacción para el efecto de la concentración de dimetoato y el tiempo sobre el porcentaje de citotoxicidad del cultivo de timocitos murinos.

Tabla 2. Prueba de contraste múltiple de Dunnett, de la concentración de óxido nítrico en el cultivo de timocitos murinos sometidos a la interacción, concentración de dimetoato x tiempo de exposición.

Interacción Dimetoato x Tiempo	Oxido nítrico Promedio (Ab.)	Desviación Estandar (Ab.)	Significancia- Contraste Unilateral (>) Control x 1hr.
Control x 1hr.	0,043	±0,008	*
Control x 3hr.	0,039	±0,009	N.S.
Control x 6hr.	0,047	±0,013	N.S.
0,05% x 1hr.	0,048	±0,005	N.S.
0,05% x 3hr.	0,035	±0,007	N.S.
0,05% x 6hr.	0,045	±0,004	N.S.
0,1% x 1hr.	0,044	±0,007	N.S.
0,1% x 3hr.	0,039	±0,007	N.S.
0,1% x 6hr.	0,063	±0,013	A.S.
0,2% x 1hr.	0,041	±0,002	N.S.
0,2% x 3hr.	0,039	±0,013	N.S.
0,2% x 6hr.	0,060	±0,006	A.S.

(A.S.= Diferencia Altamente significativa, N.S.= Diferencia No significativo)
 * No es posible la comparación entre la misma interacción.

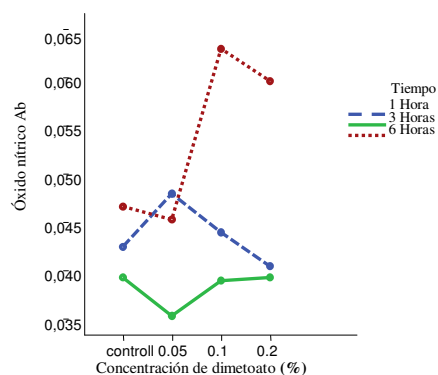


Figura 2. Gráfico de Interacción para el efecto de la concentración de dimetoato y el tiempo sobre la concentración de óxido nítrico del cultivo de timocitos murinos.

Ensayo de reducción NTB (tetrazolium nitro blue) para determinar la producción del anión super-óxido.



En la tabla 3 se muestra la comparación de cada una de las interacciones concentración de dimetoato (%) x tiempo de exposición con la interacción control x 1hr, mediante una prueba de contraste múltiple de Dunnett para la comparación Significancia-Contraste Unilateral (>), dicha prueba muestra que todas las interacciones presentan concentraciones de anión super-óxido mayores a la interacción Control x 1hr (A.S.).

Tabla 3. Prueba de contraste múltiple de Dunnett, de la concentración de anión super-óxido en el cultivo de timocitos murinos sometidos a la interacción, concentración de dimetoato x tiempo de exposición.

Interacción Dimetoato x Tiempo	Anión super-óxido Promedio (mAb.)	Desviación Estandar (mAb.)	Significancia- Contraste Unilateral (>) Control x 1hr.
Control x 1hr.	113,667	±4,589	*
Control x 3hr.	268,667	±7,229	A.S.
Control x 6hr.	545,000	±4,472	A.S.
0,05% x 1hr.	375,667	±5,391	A.S.
0,05% x 3hr.	516,000	±9,077	A.S.
0,05% x 6hr.	590,667	±9,004	A.S.
0,1% x 1hr.	416,667	±6,831	A.S.
0,1% x 3hr.	574,333	±11,535	A.S.
0,1% x 6hr.	637,667	±11,183	A.S.
0,2% x 1hr.	469,667	±4,926	A.S.
0,2% x 3hr.	651,000	±5,865	A.S.
0,2% x 6hr.	678,000	±6,449	A.S.

(A.S.= Diferencia Altamente significativa.)

* No es posible la comparación entre la misma interacción.

En la figura 3, se muestra que la mayor concentración de anión super-óxido está influenciado por la concentración de dimetoato al 0,2% y a un tiempo de exposición de 6 horas.

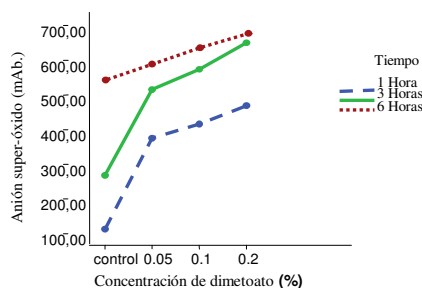


Figura 3. Gráfico de Interacción para el efecto de la concentración de dimetoato y el tiempo sobre la concentración de anión super-óxido del cultivo de timocitos murinos.

Inducción a la fragmentación del ADN por el organofosforado dimetoato

En esta sección se puede apreciar el efecto del organofosforado dimetoato sobre el ADN para las distintas concentraciones y tiempos probados. En las figuras 4a y 4b no se muestra fragmentación del ADN lo cual se evidencia por la presencia de una sola banda de elevado peso molecular en cada uno de los carriles.

En la figura 4c se puede apreciar que las concentraciones de 0,1 y 0,2 % indujeron una fragmentación y un smirre del ADN que se manifiesta por la presencia de fragmentos de ADN en la parte final del gel, indicando que el organofosforado para estas dos concentraciones indujo muerte celular por necrosis y apoptosis, respectivamente.

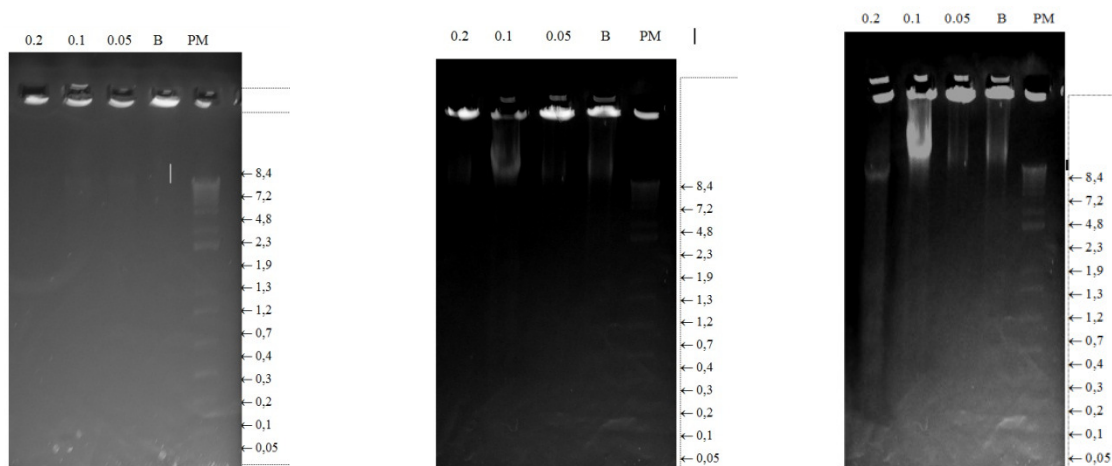


Figura 4. a) Efecto del dimetoato sobre la fragmentación del ADN. durante 1 hora de exposición, b) Efecto del dimetoato sobre la fragmentación del ADN. durante 3 horas de exposición, y c) Efecto del dimetoato sobre la fragmentación del ADN. durante 6 horas de exposición.

EXPERIMENTAL

Extracción de timocitos murinos

Los timocitos murinos fueron extraídos del timo de ratas blancas (*Rattus norvegicus*) de la variedad Wistar, de tres meses de edad. El aislamiento de los timocitos se realizó según Yu-I *et al* [4]. Se aisló 5×10^6 células, las cuales fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)-1640 y sembradas en diferentes pocillos para los tratamientos respectivos.

Ensayo de Citotoxicidad o Método del MTT (Metil-Tiazole Tetrazolium)

Para la toxicidad celular [5] se utilizó el análisis de la sal de tetrazolium (MTT) para determinar la actividad de las células metabólicamente activas. Para el análisis de MTT, los timocitos obtenidos fueron incubados en diferentes concentraciones de dimetoato, 0,05%, 0,1% y 0,2%, durante 1, 3, y 6 horas respectivamente, en frascos de cultivo celular en el medio de cultivo RPMI 1640. Media hora antes de culminar los tiempos de incubación se agregó 100 μ L de MTT (5mg/ml) a cada uno de los sistemas. Luego se procedió a lavar los macrófagos con 500 μ L de metanol al 70% para eliminar restos de las sales de formasan, después se centrifugó a 15000 rpm por 5 minutos y se disolvió la sal de formasan agregándole 200 μ L de hidróxido de potasio (KOH) y 200 μ L de dimetil sulfóxido “DMSO” (CH_3)₂SO. Luego se determinó la reducción del MTT a través de la lectura en el espectrofotómetro a 570nm.

Ensayo de Reducción NBT (Tetrazolium Nitro Blue) para determinar la producción de anión super-óxido.

El ensayo de reducción del NBT se realizó [6] preparando los diferentes sistemas conteniendo timocitos (1×10^6 cel/frasco) los que fueron incubados a 37 °C a los que se adicionó 100 μ L de solución de NBT (1mg/ml) en cada uno de los sistemas, para hacer un volumen final de 1000 μ L, después de terminar la incubación se realizó una centrifugación a 15000 rpm por 5 minutos, después los sobrenadantes fueron removidos y el “pellet” celular fue lavado 2 veces con metanol al 70% para luego ser solubilizadas con 200 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) y 200 μ L de hidróxido de potasio (KOH) para disolver el precipitado de NBT. Luego las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm.

Cuantificación de óxido nítrico



Para la evaluación de óxido nítrico se utilizó el reactivo de GRIES. Se midió 500 μL del sobrenadante y se mezcló con 500 μL del reactivo de GRIES; dejándose en reposo durante 10 minutos y luego las muestras fueron leídas a 550 nm; para la cuantificación se utilizó nitrito de sodio como estándar.

Determinación de la fragmentación del ADN

Se incubó los timocitos con concentraciones diferentes de dimetoato (0,05%, 0,1% y 0,2%) durante 1, 3 y 6 horas, en frascos de cultivo celular en el medio de cultivo RPMI 1640. Luego fueron transferidas a tubos Eppendorf, para ser centrifugadas a 15000 rpm durante 1 min. Seguidamente se eliminó el sobrenadante de cada uno de los tubos Eppendorf y el pellet obtenido fue lavado 2 veces con 100 μL de PBS (NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4). Seguidamente, los timocitos fueron lisados agregándole a cada uno de los Eppendorf 500 μL de buffer de lisis (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 25 mM, SDS 0,5%). Se procedió a incubar las muestras a 37 °C con buffer de lisis por un periodo de 5 minutos [7]. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a agregar 500 μL de una mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), en una proporción 1:1 a cada una de las muestras, las cuales fueron agitadas vigorosamente por 15 segundos; seguidamente fueron centrifugadas durante 5 minutos a 15000 rpm, se procedió a retirar la fase acuosa (parte superior) a la que se le agregó alcohol isopropílico frío, llevándose luego la muestra a refrigeración por media hora, se produjo la precipitación del ADN, se eliminó el sobrenadante luego de la centrifugación y se deja secar el pellet hasta que se evaporen los restos de alcohol isopropílico, luego el pellet (ADN) fue resuspendido en Buffer T.E (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) obteniéndose un volumen final de 15 μL de ADN.

La muestra de ADN de los timocitos de sistema fue corrida, junto con el marcador de peso molecular (TrackIt Plus DNA Ladder de 1Kb) en un gel de agarosa al 1%; se observó las bandas luego de la tinción del gel con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 mg/ml (SIGMA-ALDRICH7) en un transiluminador con luz ultravioleta [8].

CONCLUSIONES

El dimetoato produce una citotoxicidad dependiente del tiempo y concentración en timocitos murinos.

La generación del radical anión superóxido es inducido por la presencia del dimetoato, para todas las concentraciones y tiempos.

El efecto del dimetoato va acompañado de la generación del radical anión óxido nítrico en forma significativa para las concentraciones de 0,1% y 0,2%

La fragmentación y smirre del ADN de timocitos murinos se observó a partir de concentraciones de dimetoato de 0,1% y 0,2% luego de 6 horas de incubación, indicando una muerte celular por apoptosis y necrosis.

REFERENCIAS

1. Aspelin, A., **2003**, Pesticide usage in the United States: Trends During the 20th Century. NSF CIPM Technical Bulletin 105. NSF Center for Integrated Pest Management.
2. Burns, L., Meade B.J., Munson, A.E. **1996**, Toxic Responses of the Immune System, in Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 5th edition. Klaassen CD (ed). McGraw Hill. NY, pp. 355-402.
3. Marks, D.B., Marks, A.D., Smith, C.M. **1996**, Oxygen Metabolism and Toxicity, in Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. Williams and Wilkins. Baltimore MD. pp. 327-340.
4. Yu-I, W., Shivendra, D. **2000**, Ethanol alters angiotensin II stimulated mitogen activated protein kinase in hepatocytes: agonist selectivity and ethanol metabolic independence, *European Journal of Pharmacology*, 398, 323.
5. Lopes, M.C., Guilhermino, L., Donato, A., Silveira, L., Soares, A.M.V.M., Carvalho, A.P. **1994**, Quantitative concentration-toxicity relationship for the injury of rat thymocytes by chemical compounds used in inter-laboratory toxicity ring-tests, *Toxicology in vitro*; 8, 831.
6. Pick E., Charon, J., Mizel, D. **1981**, A rapid densitometric microassay for nitroblue tetrazolium reduction and application of the microassay to microphages. *J. Reticuloendothel. Soc.* 30, 581.
7. Sanbrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. **1989**, Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Doyle, K., **1996**, Promega Protocols and Applications Guide, 3rd edition. Promega Corporation.