

# Evaluación de la Citotoxicidad del Cobre y del Lindano en Cultivos de células CHO-K1

Nóvoa-Valiñas M.C.<sup>1</sup>, Pérez-López M<sup>2</sup>, García-Fernández M.A.<sup>1</sup>, Melgar-Riol M.J.<sup>1</sup>

Área de Toxicología, Facultade de Veterinaria 1(USC), 2(UEX). C/Carballo Calero s/n. 27002-Lugo (España).

**Resumen:** El uso de determinados metales pesados y pesticidas es la estrategia más empleada para el control de plagas. Estas sustancias, una vez aplicadas a los cultivos, pueden pasar al medio ambiente, permaneciendo en él como xenobióticos que van a afectar, en mayor o menor medida, a los seres vivos.

En el presente estudio se ha evaluado la toxicidad basal de un metal, cobre, y un pesticida organoclorado, lindano, así como mezclas de ambos a distintas concentraciones. Para llevar a cabo este trabajo se ha utilizado la línea celular CHO-K1 (células epiteliales de ovario de hamster), usándose como criterio de citotoxicidad la muerte celular, determinada mediante la técnica del rojo neutro.

Las concentraciones iniciales fueron: 0,03; 0,06 y 0,9 mM de cobre y 0,01; 0,03 y 0,1 mM de lindano. Y en las mezclas, las concentraciones estuvieron comprendidas entre 0,01-0,9 de cobre y 0,001-0,1 de lindano. Como resultados, la citotoxicidad del cobre y lindano fue dosis-dependiente. En las exposiciones a mezclas se observa que a concentraciones fijas de lindano, la viabilidad desciende al aumentar la concentración de cobre, mientras que, dentro de un cierto rango, a concentraciones fijas de cobre, la viabilidad celular se incrementa al aumentar la concentración de lindano.

**Palabras clave:** citotoxicidad, CHO-K1, cobre, lindano.

**Abstract: Evaluation of the Citotoxicity of Copper and Lindane in cell line CHO-K1.** The use of some heavy metals and pesticides is the strategy most employed for the control of plagues. These substances, once applied to the cultivation, they can happen and stay in the environment as toxics that can to affect, in greater or minor measured, to the live beings.

In the present study has been evaluated the basal toxicity of a metal, copper, and a organochlorinated pesticide, lindane, as well as mixtures of both to different concentrations. To carry out this work has been used the cellular line CHO-K1, being used as criterion of citotoxicity the cellular death, determined through the technique of the neutral red.

The initial concentrations were: 0.03; 0.06 and 0.9 mM of copper and 0.01; 0.03 and 0.1 mM of lindane. And in the mixtures, the concentrations were understood between 0.01-0.9 of copper and 0.001-0.1 of lindane. The citotoxicity of the copper and lindane was dose-dependent. In the expositions to mixtures was observed that to fixed concentrations of lindane, the viability decreases upon increasing the copper concentration, while, within a certain range, to fixed copper concentrations, the cellular viability is increased upon increasing the concentration of lindane.

**Key words:** citotoxicity, CHO-K1, copper, lindane.

## **Introducción**

El uso de determinados metales y pesticidas para el control de plagas origina su acumulación en el medio ambiente, donde pueden alcanzar niveles tóxicos para los seres vivos.

Entre ellos, los insecticidas organoclorados se han utilizado ampliamente desde los años 40. Los plaguicidas de este grupo son persistentes y lipófilos, por lo que se acumulan en el medio ambiente y los organismos que en él viven. En España únicamente están autorizados los insecticidas menos persistentes, y sólo en aplicaciones concretas, como por ejemplo el endosulfán y el lindano o el acaricida dicofol. El lindano, (gamma - hexaclorociclohexano), se sigue comercializando a concentraciones que oscilan entre un 0,5 y un 10%, usándose, casi exclusivamente en el tratamiento de ectoparásitos en animales, ya que su uso en agricultura como agente fitosanitario está prohibido desde el año 2002 [1].

Por otra parte, el cobre, en forma de distintas sales, sigue siendo extensamente utilizado en agricultura, como antifúngico, pero también como alguicida, etc.

En este estudio se trató de evaluar la citotoxicidad aguda de dos polutantes: un metal, el cobre y un pesticida organoclorado, el lindano, ampliamente utilizados para la optimización del cultivo de vegetales.

## **Material y métodos**

Para llevar a cabo este trabajo se ha utilizado la línea celular CHO-K1 (células epiteliales de ovario de hámster), usándose como criterio de citotoxicidad la muerte celular, evaluada mediante la técnica del rojo neutro [2, 3]. Las células fueron cultivadas en placas de microtitulación de 96 pocillos durante 24 h, hasta una confluencia de 70-80%, cambiándose entonces el medio de cultivo completo por medio simple (pocillos control) o medio simple con las distintas concentraciones de polutantes; tras 24 h de incubación, se reemplazó este medio por 0.2 ml de medio con 40 µg/ml de colorante vital rojo neutro (RN) y se incubaron otras tres horas antes de la determinación de viabilidad.

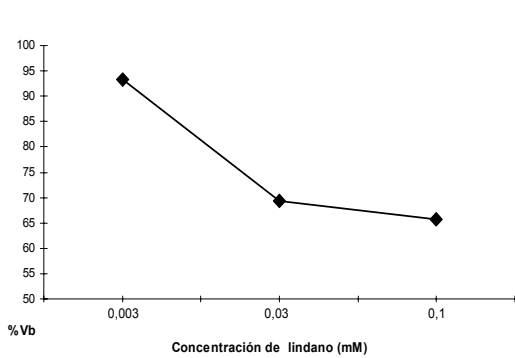
El ensayo de citotoxicidad se basa en la inclusión del colorante supravital, no tóxico, RN por los lisosomas de las células viables. Cambios en la acumulación y retención de dicho colorante implican un daño en las membranas celulares, células muertas que no retienen el RN [4, 5].

La determinación analítica se realizó en un lector de microplacas modelo 550 (BIO-RAD), equipado con un filtro de 540 nm para medir la absorbancia del colorante extraído de las células viables [2, 3].

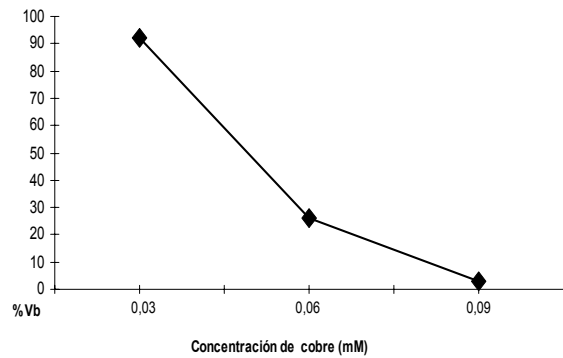
De esta forma se ha evaluado tanto la toxicidad basal del cobre y del lindano, como mezclas de ambos a distintas concentraciones, analizándose un total de 42 mezclas diferentes. Las concentraciones iniciales fueron: 0,03; 0,06 y 0,9 mM de cobre y 0,01; 0,03 y 0,1 mM de lindano; y en las mezclas, las concentraciones estuvieron comprendidas entre 0,01-0,9 mM de cobre y 0,001-0,1 mM de lindano.

## Resultados y discusión

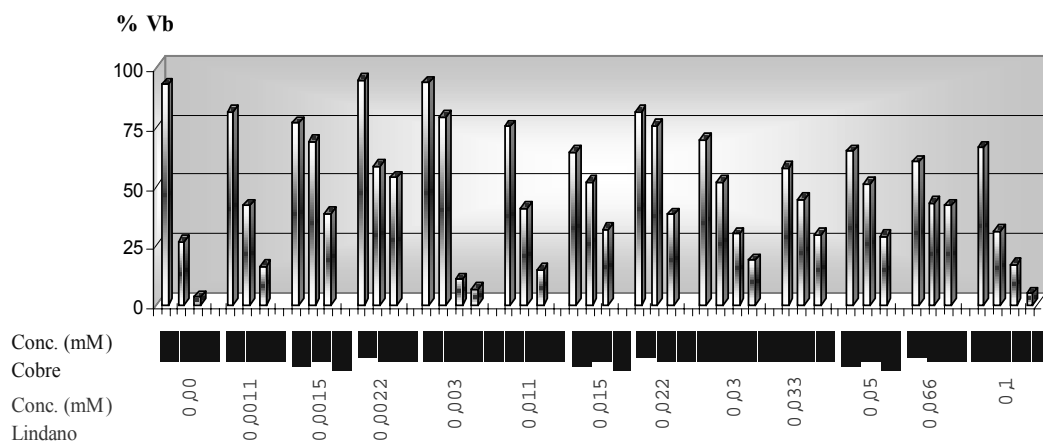
La citotoxicidad mostrada, independientemente, por el cobre y el lindano fue dosis-dependiente (Figuras 1 y 2). Sin embargo, en las exposiciones a mezclas se observa que a concentraciones fijas de lindano, la viabilidad desciende al aumentar la concentración de cobre, mientras que, dentro de un cierto rango, a concentraciones fijas de cobre, la viabilidad celular se incrementa al aumentar la concentración de lindano (Figuras 3- 4).



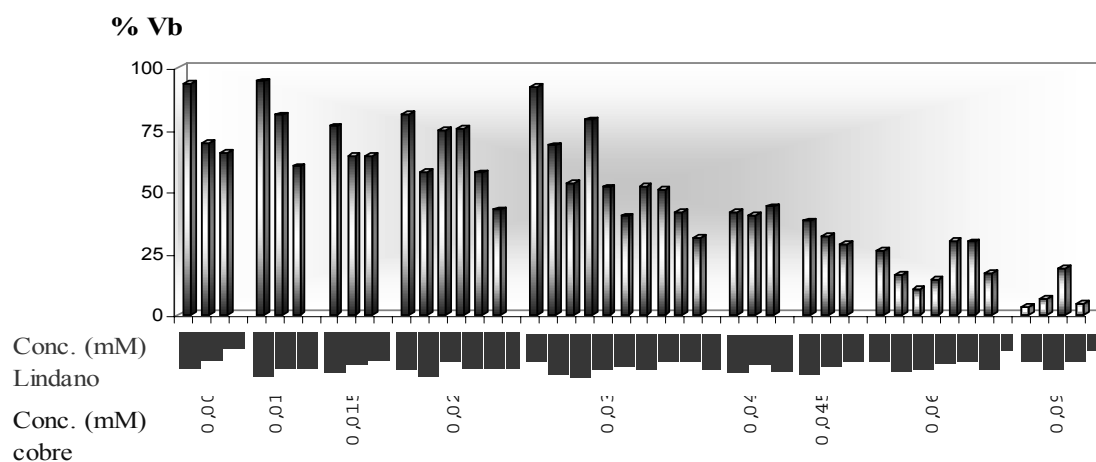
**Fig.1.** Porcentaje de viabilidad/concentración simple de cobre



**Fig.2.** Porcentaje de viabilidad/concentración simple de lindano



**Fig. 3.** Porcentaje de viabilidad/concentración fija de lindano-creciente de cobre



**Fig. 4.** Porcentaje de viabilidad/concentración fija de cobre-creciente de lindano

## Agradecimientos

A la Xunta de Galicia que subvencionó el Proyecto PGIDT99PX26101B.

## Bibliografía

1. Decisión 2000/801/CE, relativa a la no inclusión del lindano en el anexo 1 de la directiva 91/414/CEE del Consejo (D.O.C.E: 21/12/2000).
2. Borefreund E. y Puerner J.A. (1985a). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24: 119-124.
3. Borefreund E. y Puerner J.A. (1985b). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. *J. Tiss. Cult. Meth.* 9:7-9.
4. Nemes Z., Dietz R., Luth J.B., Gomba S., Hackenthal E. y Gross F. (1979). The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia* 35:1475-1476.
5. Winckler J. (1974). Vitalfarbung von lysosomen und anderen Zellorganeren der Ratte mit neutralrot. *Progr. Histochem. Cytochem.* 6: 1-89.