

ACCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES NAC Y L-CARNITINA SOBRE UN MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO CRÓNICO EN LA LÍNEA CELULAR MIOBLASTOIDE C2C12

NAC AND L-CARNITINE ANTIOXIDANT ACTION IN A CHRONIC OXIDATIVE STRESS MODEL IN C2C12 MYOBLAST CELL LINE

Elizabeth Orozco G^{1*}, Gloria Angélica Santa G¹,
Mauricio Camargo Guerrero¹.

¹ Instituto de biología, Laboratorio de Genética de Poblaciones, Mutacarcinogénesis y Epidemiología Genética, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia. lizoruga@gmail.com, angelica515@gmail.com, mcamargo@une.net.co

Recibido: Agosto 27 de 2009

Aceptado: Marzo 1 de 2010

*Correspondencia del autor. Instituto de biología, Laboratorio de Genética de Poblaciones, Mutacarcinogénesis y Epidemiología Genética, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia, Calle 62 # 52-59 Torre 2 Laboratorio 432. Tel: 57 4 2196526E- mail: lizoruga@gmail.com

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) cumplen diversos papeles en el metabolismo y vías de señalización celular. Así, dada la importancia de las ROS en las rutas de respuesta a diferentes estímulos celulares, se hace importante conocer los efectos y modulación antioxidante de la respuesta a eventos pro oxidantes.

Los resultados de los experimentos realizados en un modelo in vitro de miocitos indican que las células se adaptan a condiciones de estrés oxidativo crónico inducido con glucosa oxidasa GO 5mU/ml ($\approx 50\mu\text{M}$ de H_2O_2), este tratamiento se llevó a cabo durante 7 días y se demostró que durante este proceso adquieren ventajas para responder a situaciones de estrés oxidativo agudo (H_2O_2 1mM). Además se encontró que antioxidantes como N-Acetilcisteína (NAC) y L-carnitina (L-Car), desempeñan un importante papel en la prevención de producción de ROS y daño oxidativo del DNA en situaciones de estrés oxidativo agudo, pero interfieren con la respuesta adaptativa cuando son suministrados de forma crónica, perdiendo su capacidad protectora.

Al analizar el conjunto estos resultados, se puede concluir que sí es posible obtener adaptación celular en el modelo estudiado y mejorar la respuesta a situaciones de estrés oxidativo agudas, manteniendo niveles bajos de citotoxicidad y genotoxicidad. Como perspectivas futuras al conocimiento del proceso de adaptación al estrés oxidativo, se vislumbra que el uso de diferentes antioxidantes, puede ayudar a idear nuevas estrategias de tratamiento, al comprender mejor su acción como coadyuvantes terapéuticos, siempre y cuando su empleo sea realmente adecuado y no interfiera con el resultado neto del proceso de control de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Especies Reactivas de Oxígeno, Estrés Oxidativo, Daño en el DNA, Respuesta Adaptativa, Antioxidantes, Hormesis

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) play different roles in metabolism and cell signalling; therefore, it is quite evident the importance of knowing the routes and involvement of ROS routes in different cellular stimuli, as well as the effect of antioxidants and their modulation of pro-oxidants.

Adaptive response to mild chronic oxidative stress in an in vitro myocyte model was induced by 5mU/mL of glucose oxidase (GO) that generate a steady input of H₂O₂ 50µM in the medium. This treatment regime was extended for 7 days, and it was discovered that after this process, cells develop the advantage to respond to acute challenges up to levels of 1mM of H₂O₂. The antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and L-carnitine (L-Car) surprisingly interfere with the adaptive response when added in a chronic way, then loosing their protective capacity. The overall analysis of these results indicate the feasibility of cellular adaptation, that may allow the defence to acute oxidative stress, maintaining low levels of genetic damage and cytotoxic effect. In conclusion, this increased resistance seen after prior exposure to oxidants is attributed to an adaptive response to chronic oxidative stress, and this response is notably modified for the chronic use of antioxidants. In perspective, this knowledge about oxidative stress adaptation could be applied to a better use of antioxidants as prodrugs in cotherapy, as long as the net result will not interfere with the control of the disease.

KEY WORDS: Oxidative stress, DNA damage, adaptive response, reactive oxygen species, antioxidants, hormones.

INTRODUCCIÓN

La exposición a radicales libres ha llevado a los organismos a desarrollar una serie de mecanismos de defensa (1); así, si el daño ocurre, puede ser reparado, o las moléculas dañadas pueden ser reemplazadas por otras intactas (2).

Cambios adaptativos debidos a alteraciones fisiológicas como un entrenamiento físico, raramente son de gran magnitud; sin embargo, pequeñas variaciones, tales como las observadas en la actividad de reparación del DNA y proteínas, podrían tener efectos significativos a largo plazo (3). No obstante, bajo condiciones patológicas, concentraciones anormales de ROS pueden llevar a cambios permanentes en la transducción de señales y expresión génica, típicos para estados de enfermedad (1)

El músculo esquelético es el tejido con mayor masa en el cuerpo, y consiste en células postmitóticas, las cuales son más propensas a acumular daño oxidativo (4). Sin embargo es poco común encontrar formaciones neoplásicas asociadas a este tipo de tejidos (3); además son altamente resistentes a situaciones agudas de estrés oxidativo.

Actualmente hay considerable información acerca del daño endógeno del DNA causado por estrés oxidativo, y constantemente se buscan formas de disminuirlo.

Como resultado de esto, la suplementación antioxidante es un hábito que se ha ido estableciendo no sólo en los deportistas de alto rendimiento sino en la población general, aunque dicha población no cuente con problemas de salud que requieran este tipo de medicación.

Muchas evidencias sugieren que el daño oxidativo endógeno del DNA está íntimamente asociado con pequeñas lesiones que no afectan de forma inmediata la viabilidad celular. Las enfermedades multifactoriales que por lo general aparecen en edad adulta o avanzada, encuentran asociada su patología a una serie de eventos padecidos a lo largo de la vida, que finalmente presentan un efecto acumulativo.

Una alta incidencia de este tipo de enfermedades en personas no expuestas a un riesgo ambiental u ocupacional ha llevado a hipotetizar que un desequilibrio en el metabolismo prooxidante/antioxidante y alteraciones en los sistemas de reparación, seguido de una modificación en el control de ciclo celular, son la mayor causa de acumulación de daño oxidativo en el DNA, lo que conduce a un alto riesgo de desarrollar daño de tejidos por disfunción celular, e iniciar diversas patologías.

Existe una alta proporción de la población que no padece ninguno de estos desórdenes, pero debido a su estilo de vida, pueden encontrarse expuestos continuamente a presión por estrés oxidativo. Adicional a esto, el hábito de incluir en sus dietas alimentarias suplementa-

ción antioxidante, puede conducir a atenuar la respuesta adaptativa al daño y permitir la supervivencia de células con lesiones no reparadas, teniendo como consecuencia, un aumento en el daño oxidativo residual del DNA. En diferentes procesos como la apoptosis, que es causada por niveles elevados de radicales libres, una concentración disminuida de estos debida a una excesiva administración de antioxidantes podría estimular la supervivencia y proliferación de células dañadas dentro de un estado neoplásico; bajo estas circunstancias no habría una estimulación del estado de progresión como sería para el caso de los pacientes con cáncer, sino una estimulación precoz del estado de inicio (promoción) de estas patologías, a través de una aumentada supervivencia de células transformadas.

Con las recientes teorías científicas acerca del estrés oxidativo, proceso de envejecimiento, enfermedades complejas y otros, se ha generado en la población una creciente necesidad por combatir todo posible riesgo de estos procesos degenerativos, teniendo como objetivo extender tiempo y calidad de vida, y mejorar el desempeño físico.

A pesar de los esfuerzos de los investigadores por encontrar posibles curas a este gran número de alteraciones multifactoriales, los resultados no han sido los esperados, ya que este tipo de enfermedades se caracteriza por surgir como producto de múltiples alteraciones tanto genéticas como ambientales, lo cual dificulta el diseño de terapias para blancos específicos. Por esto se hace evidente la necesidad de desarrollar una línea de estrategias con fines preventivos más que curativos.

Las células musculares son capaces de adaptarse a fuertes desequilibrios en el estado redox, y por ello representan un sistema experimental ideal para estudiar los mecanismos activados durante el estrés oxidativo, lo cual hace importante diseñar investigaciones que permitan definir las vías de regulación de la función de este tipo celular durante el estrés oxidativo. Para este propósito, estudiaremos el efecto del peróxido de hidrógeno en la respuesta adaptativa al estrés oxidativo y la modulación de los antioxidantes en este proceso, empleando como modelo *in vitro* mioblastos de origen murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas y cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron C2C12 (ATCC CRL-1772), CHO-K1 (ATCC CCL-61). Se mantuvieron como cultivos de crecimiento adherente en medio de cultivo DMEM y F12 respectivamente suplementado con suero bovino fetal al 10%, Penicilina 100 µg/ml y Estreptomycin 100 µg/ml, e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5%. Los subcultivos se realizaron cada 2 o 3 días sembrando aproximadamente 2 x 10⁵ células en 5 ml de medio de cultivo.

Compuestos químicos (Agentes Pro- Oxidantes y Anti-Oxidantes)

Glucosa Oxidasa (GO): [Sigma G6641]. **N-Acetil-L-cisteína (NAC):** [Sigma A9165, (HSCH₂CH(NHCOCH₃)CO₂H)].

Esquema de tratamientos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en cultivos exponenciales con subconfluencia del 75% (Aproximadamente 1,5 x 10⁶ células). A partir del segundo día post-siembra, se realizaron tratamientos crónicos durante siete días consecutivos: Pro-Oxidantes con GO 5mU/ml; Anti-Oxidantes con N-acetil Cisteína 0,5mM y L-Carnitina 0,5mM. El último día de tratamiento los cultivos con tratamiento crónico y cultivos sin previa exposición a agentes Pro/Anti-Oxidantes fueron retados con H₂O₂ 1mM (tratamiento agudo). Todos los tratamientos se realizaron en medio libre de suero durante 1h y posteriormente fueron lavados por tres veces con PBS para eliminar cualquier residuo; tras cada tratamiento las células fueron incubadas nuevamente en medio completo. El último día los cultivos fueron cosechados y se emplearon diferentes metodologías para evaluar el posible efecto adaptativo.

Producción de peróxido de hidrógeno con GO

En este estudio se determinó la producción de peróxido de hidrógeno a partir de GO en los dos medios de cultivo F12 y DMEM, que tienen una concentración de glucosa de 9mM y 5mM respectivamente. El ensayo se realizó por triplicado en platos de 96 pozos. El volumen total de reacción fue de 200µl por pozo, conteniendo 153µl de o-DD [Sigma D3252], 7µl de HRPO [Sigma P8375], y 40µl de muestra (medio + GO [Sigma G6641]). Las

condiciones del ensayo fueron: $T = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,0$; la absorbancia fue leída a 450 nm en un lector de Elisa. Se empleó una solución comercial de H_2O_2 al 30% para generar la curva de calibración de H_2O_2 generado por GO. Estos experimentos se llevaron a cabo en medio libre de suero \pm HRPO.

Evaluación de citotoxicidad

Viabilidad por Azul de Tripano y MTT

Con el fin de evaluar el efecto de los diferentes tratamientos Pro/Anti-Oxidantes sobre la viabilidad de las dos líneas celulares, se tomaron alícuotas de los cultivos celulares tratados, inmediatamente después del último tratamiento y 24 horas después. En hemocitómetro se estimó el número total de células en el cultivo, discriminando la viabilidad mediante coloración con Azul de Tripano al 0.4%.

Se tomaron 2×10^4 células provenientes de cultivos tratados y se sembraron por triplicado en microplatos de 96 pozos que contenían medio de cultivo simple; a las 24 horas se les adicionó MTT [Sigma M2128] (0,5 mg/ml), se incubaron a 37°C por 4h y posteriormente se les adicionó Isopropanol Ácido (100 μL) para solubilizar los cristales de formazan producidos; los platos de cultivo fueron incubados por 30 minutos en constante agitación y posteriormente se determinó su absorbancia a 570nm en lector de Elisa. La media de las tres lecturas de cada tratamiento fue contrastada con la media de la absorbancia del medio simple que fue empleado como blanco.

Detección de especies reactivas de oxígeno

Tras los tratamientos Pro/Anti-Oxidantes se tomaron aproximadamente 5×10^5 células, se centrifugaron durante 5 minutos a 3500rpm; se descartó el medio y se resuspendieron las células en 0,5ml de PBS; posteriormente se les adicionó 2',7'- Diclorofluorescencia diacetato (DCF-DA) a una concentración final de 0,1 μM y se incubaron durante 15 minutos tras los cuales se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar el exceso de fluorocromo. Como control se emplearon células con los mismos tratamientos sin adición de DCF-DA. Se realizaron lecturas de 1×10^4 células por tratamiento en el Citómetro de Flujo Coulter Epics XL.

Evaluación de efectos en el ciclo celular

Con el propósito de determinar las fases del ciclo celular sensibles a la acción de los tratamientos Pro/Anti-Oxidantes, se tomaron 5×10^5 células previamente tratadas para el análisis que se describe a continuación.

Citometría de Flujo con Ioduro de Propidio (PI)

Para analizar la distribución de fases del ciclo celular y corroborar el efecto citotóxico de los tratamientos Pro-Anti-Oxidante mediante contenido de DNA/célula, se tomó un volumen de 1,0 ml de células en los cultivos, el cual se mezcló gota a gota, y con vortex, con 3 ml de etanol al 70%. Las células fijadas se almacenaron a 4°C máximo por 24 horas. Para las lecturas, las células fijadas se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos, se resuspendieron en 1 ml de PBS citrato, se adicionó 50 μL de RNasa A [Sigma R5000] 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 50 μL de Yoduro de Propidio [PI, Sigma P4170] 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se incubó a 37°C durante 30 minutos protegido de la luz y se realizaron lecturas de 1×10^4 células por tratamiento en el Citómetro de Flujo Coulter Epics XL.

Evaluación de genotoxicidad

Para evaluar genotoxicidad, se trataron cultivos en subconfluencia del 75% de cada línea celular en 5 mL de medio de cultivo libre de suero. La evaluación de quiebres de cadena sencilla (SSB) se realizó mediante el ensayo DNA-Cometa alcalino.

Ensayo DNA-Cometa o SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis)

Se realizó siguiendo los lineamientos de internacional Workshop on Genotoxicity Test Procedures (Tice et al, 2000), adaptado así: posterior al tratamiento del último día, se tomaron alícuotas de 2×10^4 células que fueron resuspendidas en 20 μL de medio simple y posteriormente mezcladas con 80 μL de agarosa de bajo punto de fusión, esta suspensión celular fue transferida a placas de vidrio pre-cubiertas con agarosa de punto de fusión normal. A cada placa se le puso un cubre-objetos y se pusieron a 4°C durante 5 minutos. Se removieron los cubre-objetos y le adicionó a cada placa 70 μL de agarosa de bajo punto de fusión y nuevamente fueron llevadas a 4°C durante 5 minutos. Posteriormente las placas con las células embebidas en agarosa gelificada fueron sometidas a digestión durante 24 horas en buffer de lisis (2.5M NaCl, 0.1M Na2EDTA, 10mM Tris base, 1% N-

lauril sarcosinato de Sodio, 10% DMSO y 1% Triton X-100, ajustado a pH 10,0).

Ulterior a la lisis, se lavaron con PBS pH 7,4 y se sumergieron en buffer de electroforesis pH 13 (NaOH 50 mM / EDTA 1 mM) durante 30 minutos para permitir la desnaturalización del DNA y el desenrollamiento de las cadenas. Posteriormente, se corrió la electroforesis a 25 voltios y 300 mA durante 30 minutos, se lavaron las placas con buffer neutralizante pH 7,4 (Tris 0.4 M) tres veces durante 5 minutos cada una. Se realizaron lecturas en el microscopio de fluorescencia (Leica DMLS) con filtro rojo de excitación 515-560 nm y filtro barrera 590 nm, objetivo 20x, mediante la adición de 40 μ L de Bromuro de Etidio (BrEt) 20 μ g/mL sobre la agarosa.

La captura de imágenes se realizó utilizando una cámara digital adaptada al microscopio; y el porcentaje de DNA liberado de los núcleos (“DNA en la cola”) se cuantificó mediante el programa CASP (Comet Assay Software Project, <http://casp.sourceforge.net>).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos fueron tabulados, procesados y graficados en Excel (Microsoft Corporation, USA, 2007), y analizados estadísticamente mediante el programa SPSS (versión 11.5 para Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se empleó el test de t-student para determinar las diferencias significativas. Los resultados de las Citometrías de Flujo con PI fueron procesados, graficados y analizados utilizando el programa WinMDI 2.8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de peróxido de hidrógeno con GO

La glucosa oxidasa fue usada como generador de H_2O_2 , y su concentración fue determinada usando o-DD y HRPO como se describe en materiales y métodos. La curva de calibración muestra un comportamiento bifásico de la reacción (Gráfica 1); cuando GO se encontraba a bajas concentraciones se observa un aumento en la producción de H_2O_2 directamente proporcional a la concentración de GO; para el medio de cultivo DMEM se alcanza el punto de saturación a una concentración de GO de 20mU/ml (Gráfica 1A) y para F12 de 60mU/ml (Gráfica 1C), con generación de H_2O_2 a concentraciones de 250 μ M y 300 μ M respectivamente. Para los ensayos de adaptación se empleó una concentración de 5mU/ml

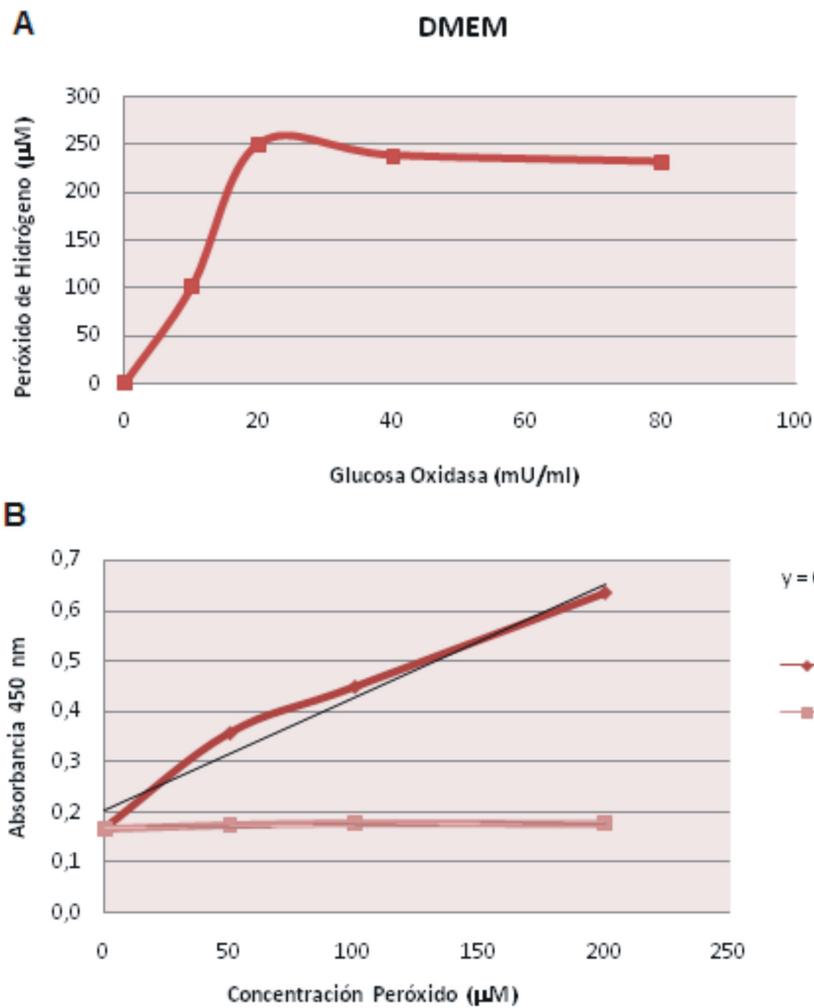
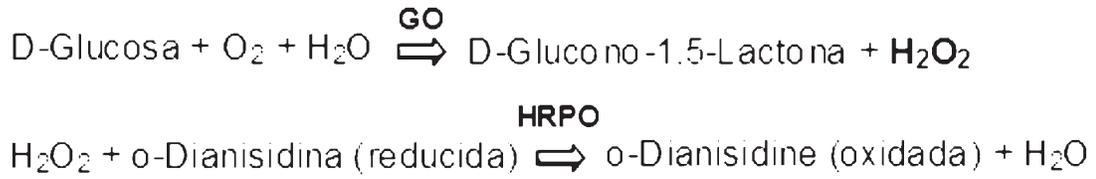
de GO que genera aproximadamente 50 μ M de H_2O_2 , para ambos medios de cultivo.

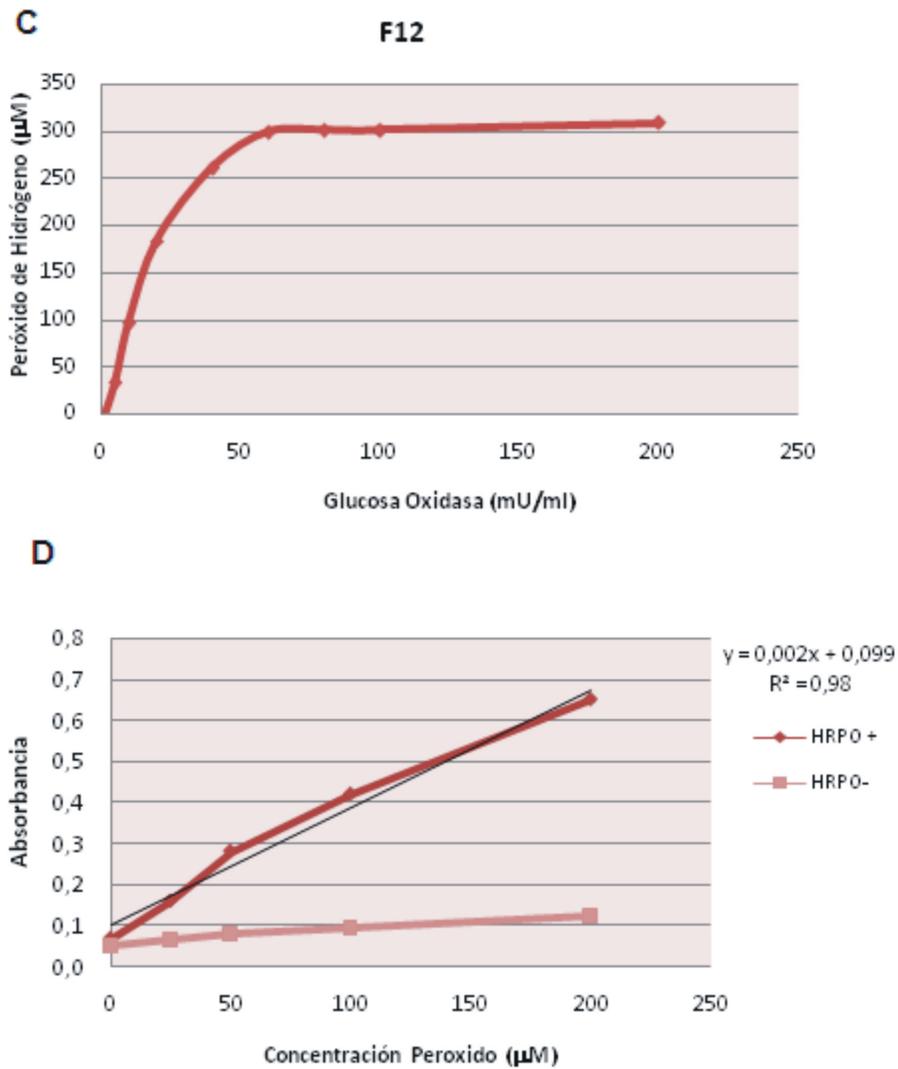
El peróxido de hidrógeno pudo haber sido adicionado directamente al medio, pero acorde con los objetivos se eligió la GO, ya que es una excelente enzima para generar concentraciones constantes de H_2O_2 y sirve como modelo de estrés oxidativo crónico. El sistema GO provee una estrategia confiable para estudiar el daño celular inducido por ROS, ya que las bajas y constantes dosis de H_2O_2 reflejan mejor la relevancia biológica de la exposición a este, más que la adición de una sola dosis a una concentración alta (5).

Efecto de los tratamientos Pro/Anti-Oxidantes sobre la viabilidad de las líneas celulares C2C12 y CHO-K1

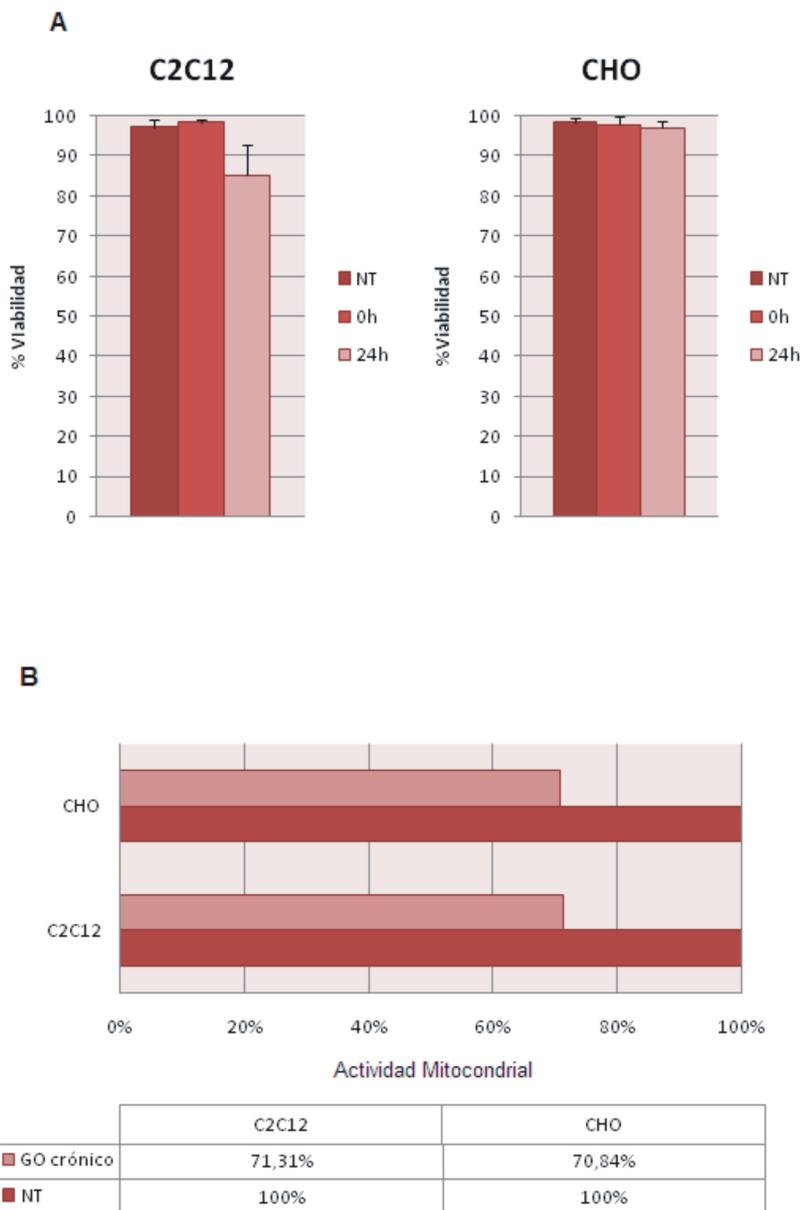
Se realizaron experimentos previos al ensayo de adaptación para determinar las condiciones óptimas de tratamiento pro-oxidante. Los resultados (datos no mostrados) demostraron que la densidad celular y la duración de la exposición al agente pro-oxidante son factores importantes. En los cultivos con densidad celular inferior a 1×10^6 , la toxicidad resultó estar inversamente relacionada con el número de células, a menor densidad celular mayor daño citotóxico; en cultivos con más de 1×10^6 células la densidad celular no fue un factor importante. Dado lo anterior, todos los experimentos de adaptación se realizaron en cultivos exponenciales con subconfluencia del 75% (aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células).

Para determinar el efecto citotóxico de los tratamientos pro-oxidantes sobre las líneas celulares C2C12 y CHO-K1 se evaluó la dosis GO 5mU/ml; se determinó viabilidad por azul de Tripano y metabolismo mitocondrial por MTT tras los 7 días de tratamiento crónico (Gráfica 2). En los cultivos de células C2C12 y CHO-K1, no se observa una disminución significativa de la viabilidad obtenida por azul de Tripano tras el tratamiento crónico con respecto a las células no tratadas. El metabolismo mitocondrial se ve disminuido al 71,31% en células C2C12 y al 70,84% en células CHO.





Gráfica 1. Generación de peróxido de hidrógeno por GO. Arriba de la figura se presenta la reacción de generación y detección de peróxido de hidrógeno; el tratamiento con GO por 1h fue realizado en los medios DMEM y F12 libres de suero y en ausencia de células. 1B, 1D, curva estándar típica realizada en cada experimento con o sin presencia de HRPO, para monitorear la actividad de la enzima.



Gráfica 2. Efecto de los tratamientos pro-oxidantes sobre la viabilidad de las líneas celulares C2C12 y CHO-K1. 2A, Viabilidad celular obtenida por azul de Tripano. Los datos se tomaron inmediatamente (0h) después de terminar el tratamiento pro-oxidante crónico y 24h después de terminado dicho tratamiento. 2B, Actividad mitocondrial evaluada por ensayo MTT 24 horas después de terminar el tratamiento crónico (GO 5mU/ml/1h/7d). Los valores son expresados como media \pm SD; no se observó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre células no tratadas y células sometidas a tratamiento crónico.

Efecto del antioxidante NAC sobre la viabilidad de las líneas celulares C2C12 y CHO-K1

Muchos de los estudios que se realizan para evaluar las propiedades antioxidantes de un compuesto y las vías de señalización a través de las cuales interfieren, se llevan a cabo empleando un modelo de estrés oxidativo agudo, y se evalúa la propiedad antioxidante inmediata.

Es evidente que el consumo de suplementos antioxidantes se está convirtiendo en un hábito para la población, aunque esta no padezca desórdenes en el metabolismo redox. Por ello, se propuso un modelo de suplementación antioxidante crónica, para evaluar los efectos del NAC en un plazo de tiempo mayor y en un modelo celular no patológico.

Así, para determinar el efecto citotóxico del NAC sobre las líneas celulares C2C12 y CHO-K1 se evaluaron dosis de 0,5 mM; se determinó la viabilidad por azul de Tripano y el metabolismo mitocondrial por MTT, tras una sola dosis del antioxidante y tras tratamiento crónico durante 7 días (Gráfica 3).

Al evaluar citotoxicidad con azul de Tripano se observó que no hay una diferencia significativa, respecto a las células no tratadas, cuando C2C12 y CHO fueron tratadas con una sola dosis de NAC 0,5mM. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas de manera crónica, se observó que los cultivos son más sensibles respecto al control, con una disminución significativa de la viabilidad en C2C12 (Gráfica 3A).

En los cultivos de células C2C12 y CHO-K1, una sola dosis de NAC 0,5mM durante 1h, redujo el metabolismo mitocondrial a 81,08% y 85,67% respectivamente; mientras que el tratamiento crónico, muestra una significativa disminución de la actividad mitocondrial, para C2C12 de 66,46% y para CHO de 58,39% respecto al control (Gráfica 3B). El ensayo DNA cometa permitió establecer la genotoxicidad del antioxidante, se observó un 35,8% y 40,7% de DNA en cola, respectivamente para C2C12 y CHO, cuando las células fueron sometidos tratamiento antioxidante crónico; una sola dosis del antioxidante no tuvo efectos genotóxicos considerables sobre las células (Gráfica 3C).

Estos resultados sugieren que bajo condiciones normales en el estado redox y sin estar sometidos a estímulos pro-oxidantes, no se observa un efecto benéfico en la suplementación antioxidante crónica con NAC.

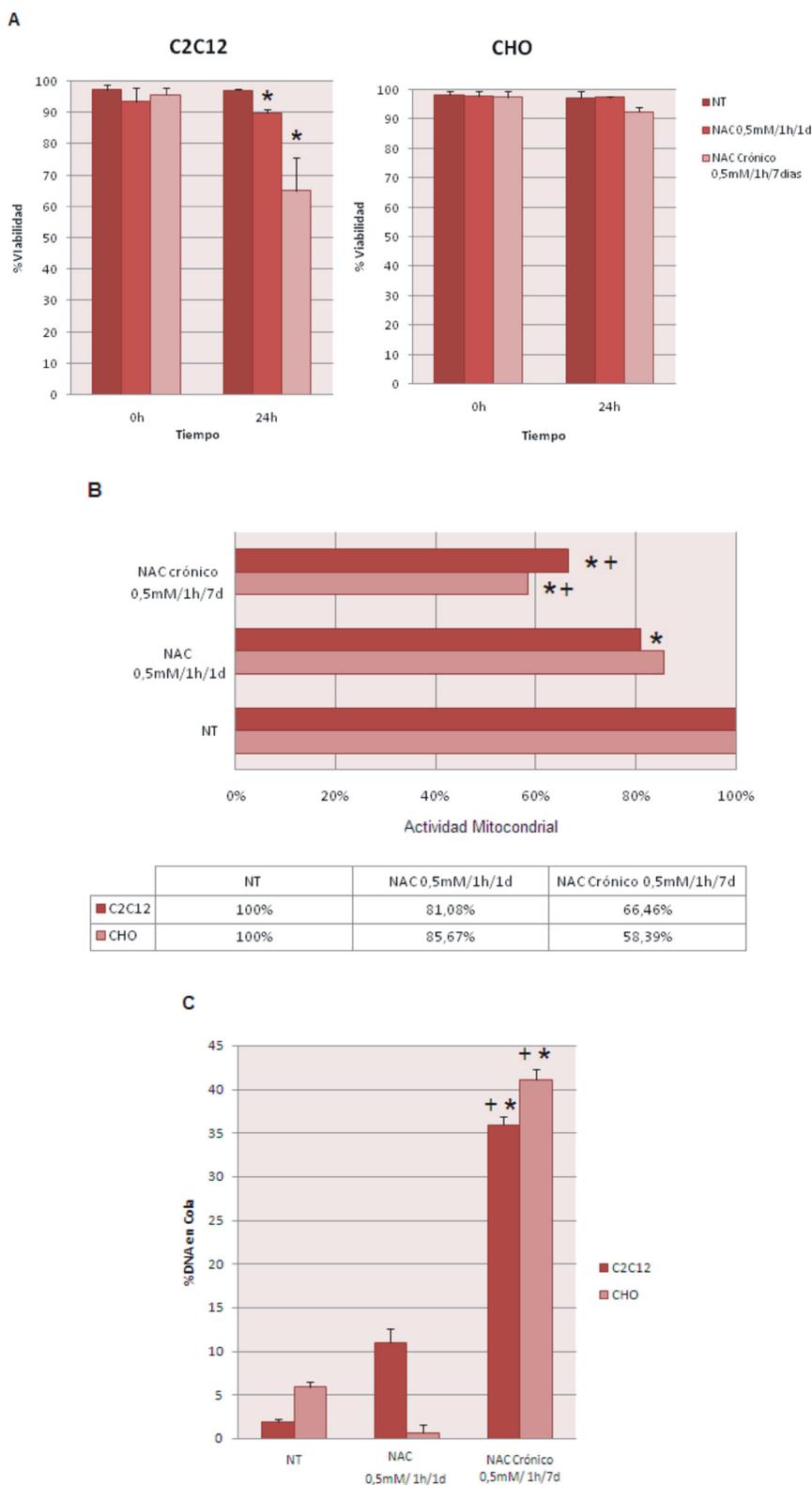
Adaptación celular a condiciones de estrés oxidativo crónico

El principal beneficio fisiológico de la respuesta adaptativa es proteger las células y organismos de altas dosis de un agente tóxico, y ésta respuesta protectora indica que las células deben estar preparadas para una subsecuente dosis letal. Así, es de particular importancia evaluar si las células pueden adaptarse, pero también evaluar bajo qué condiciones logran hacerlo. Por ello los experimentos no sólo se dirigieron hacia la estimación de la viabilidad, sino también hacia la valoración del daño y/o la susceptibilidad al daño postratamiento en las células; ya que en este contexto es muy importante evaluar el daño que dicho proceso representa para una célula normal y si realmente significa una ventaja al compararlos con situaciones de exposición agudas.

La exposición de células C2C12 y CHO a pequeñas concentraciones de GO (5mU/ml \approx 50 μ M de H₂O₂) resultó en un estímulo del crecimiento (datos no mostrados); mientras que la concentración reto de 1mM de H₂O₂ resultó ser altamente citotóxica y genotóxica. Cuando las células fueron pre-tratadas o sometidas a tratamiento pro-oxidante crónico con GO, los efectos perjudiciales tras el reto fueron significativamente menores (Gráfica 4).

Al evaluar viabilidad con azul de Tripano, inmediatamente después del reto no se observan diferencias significativas entre las células pre-tratadas/retadas y las células que solo fueron retadas; a las 24h se observó una disminución significativa de la viabilidad en las células retadas sin tratamiento crónico previo, la viabilidad celular a las 24h desciende hasta 43,7% en C2C12 y a 67,7% en CHO (Gráfica 4A). La actividad mitocondrial, determinada 24h después del reto con el ensayo MTT, se ve considerablemente disminuida en ambos tipos celulares. En la línea C2C12 las células que fueron pre-tratadas y posteriormente retadas, presentan una actividad mitocondrial de 67,8%, mientras que las células que solo fueron retadas disminuyen su actividad mitocondrial hasta 46%. En CHO las células pre-tratadas/retadas presentaron actividad del 80,9% y las retadas del 56,1%. Los porcentajes se expresan respecto al control que fueron células no tratadas (Gráfica 4B).

La acumulación de ROS fue determinada por medio de citometría de flujo empleando el fluorocromo DCF-DA; en C2C12 las células retadas, presentan un incremento de fluorescencia de 42,8 veces con respecto al control,



Gráfica 3. Efecto del antioxidante NAC sobre la viabilidad de las líneas celulares C2C12 y CHO-K1. En ambas líneas celulares se determinó la viabilidad por azul de Tripano (3A), el metabolismo mitocondrial por MTT (3B) y daño oxidativo en el DNA a través del ensayo cometa alcalino (3C), cuando los cultivos fueron sometidos a una única dosis de NAC (0,5mM/1h/1d) o a tratamiento crónico con NAC (0,5mM/1h/7d). Los valores son expresados como media \pm SD. * Indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a las células no tratadas. + Indica diferencia significativa ($p < 0,1$) respecto a una sola dosis de NAC.

mientras las células pre-tratadas/retadas solo presentan 4,4 veces más fluorescencia que las células no tratadas. En CHO, las células retadas tienen fluorescencia aumentada en 3,2 veces respecto a las células no tratadas, y las células pre-tratadas/retadas presentan un insignificante aumento en la fluorescencia respecto a las células no tratadas (Gráfica 4C).

Para evaluar genotoxicidad, se empleó el ensayo DNA-Cometa alcalino que permite detectar quiebres de cadena sencilla (SSB) en células interfásicas. Se evaluó el daño en el DNA causado por el reto, tanto en las células pre-tratadas como en las solo retadas. El nivel basal de quiebres de doble cadena en células C2C12 fue de 1,9%, las células pre-tratadas/retadas presentaron un considerable aumento en daño genotóxico con 29,6% de DNA en cola, pero este valor es inferior al obtenido con las células que solo fueron retadas, para las que se determinó un 36,8% de DNA en cola. En CHO se observa un considerable aumento de quiebres de cadena sencilla en las células que solo fueron retadas, lo que se expresa como 51,9% de DNA en cola, mientras las células que habían sido sometidas a tratamiento crónico con GO 5mU/ml solo presentan 25,7% de DNA en cola. El nivel basal de quiebre de cadena sencilla en CHO, se determinó en células no tratadas, las cuales presentaron un 5,9% de DNA en cola (Gráfica 4D).

Al evaluar en conjunto el efecto citotóxico y genotóxico en las dos líneas celulares se encontró que el reto disminuyó considerablemente la viabilidad celular y aumento el daño en el DNA genómico, además de observarse un significativo aumento en la acumulación de ROS; estos efectos perjudiciales se vieron disminuidos, para ambas líneas celulares, cuando los cultivos habían sido sometidos a tratamiento pro-oxidante crónico durante seis días con GO 5mU/ml. Entre líneas celulares se observa una importante diferencia en la acumulación de ROS y quiebres de cadena sencilla; mientras C2C12 presenta un elevado nivel de fluorescencia (42,8 veces respecto al control) con DCF-DA tras el reto, en CHO el aumento respecto al control (3,2 veces), aunque significativo, no es mucho. El daño genotóxico es menor en células C2C12, tanto a nivel basal, como el observado tras el tratamiento crónico y/o reto.

El mecanismo molecular a través del cual las células musculares logran contrarrestar de manera tan eficiente los ataques oxidativos, requieren un mayor estudio pues aunque en los dos modelos celulares se presenta el proceso de adaptación, las células C2C12 tienen muy bajo

nivel de daño en el DNA, aunque tuvieron un aumento muy significativo en los niveles ROS.

Modulación antioxidante a la respuesta adaptativa

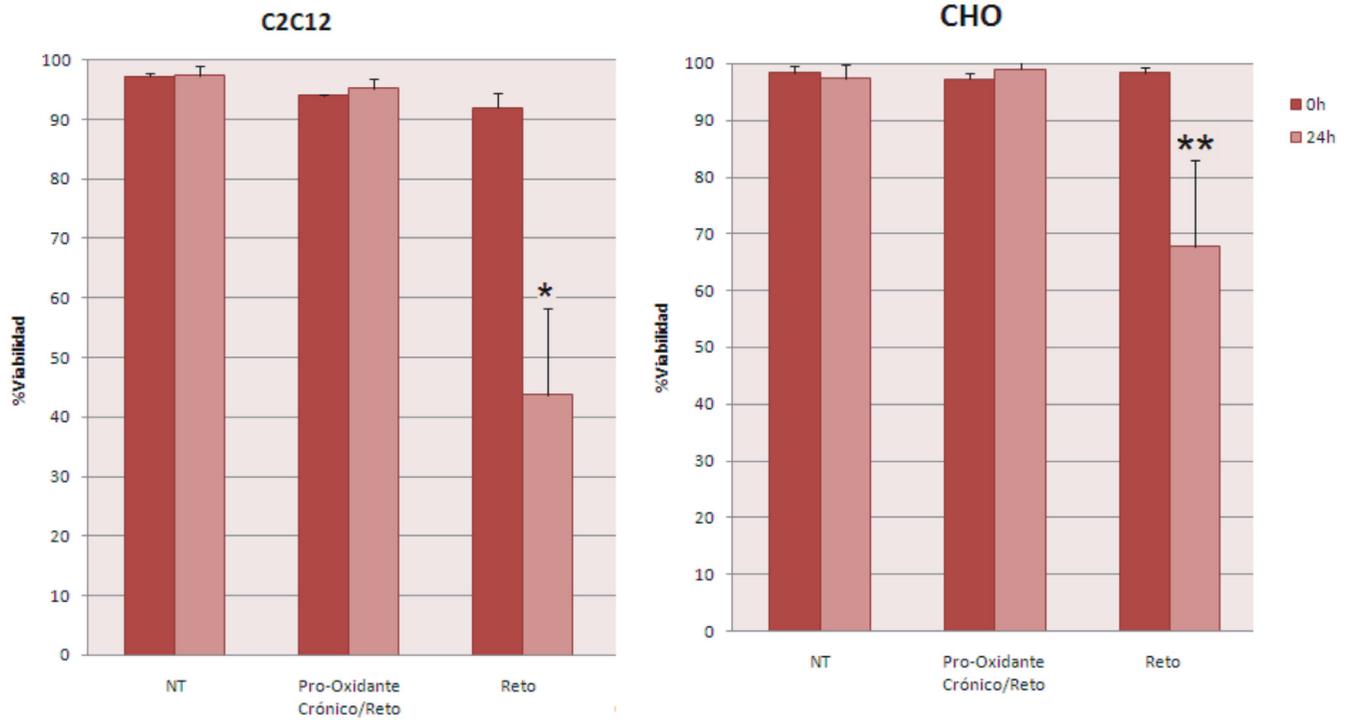
Hasta este punto se ha logrado evidenciar los efectos adaptativos de las bajas condiciones prooxidantes en los cultivos celulares en cuanto a viabilidad, actividad mitocondrial, acumulación de ROS y daño genotóxico del DNA, pero, ¿hasta que punto estos resultados pueden ser promisorios como mecanismo preventivo, al ser contrastados con un tratamiento antioxidante? Los antioxidantes se han utilizado con gran aceptación por presentar una actividad protectora al daño por radicales libres. Sin embargo, se trata de un sistema al cual se le ha probado su relevancia biológica en modelos patológicos, donde ya hay un desorden en metabolismo redox. Pero, acorde con la paradoja antioxidante, la acción crónica de estos en un sistema normal puede llevar a atenuar la capacidad de respuesta celular al estrés oxidativo, y probablemente a potencializar el efecto de este último.

Como se describe arriba, cuando las células fueron pre-tratadas o sometidas a tratamiento pro-oxidante crónico durante 7 días con GO, los efectos perjudiciales tras el reto fueron significativamente menores; al realizar el mismo ensayo de adaptación suministrando a los cultivos celulares un co-tratamiento antioxidante con NAC o L-carnitina se observa un efecto modulador sobre la respuesta adaptativa. Las células fueron tratadas 7 días consecutivos (tratamiento antioxidante crónico) con NAC 0,5mM (C2C12 y CHO) o L-carnitina 0,5mM (C2C12) durante 1 hora, tras la cual fueron lavadas con PBS y sometidas a tratamiento pro-oxidante crónico con GO, el séptimo día de cultivo después de la dosis antioxidante se retaron las células con H₂O₂ 1mM.

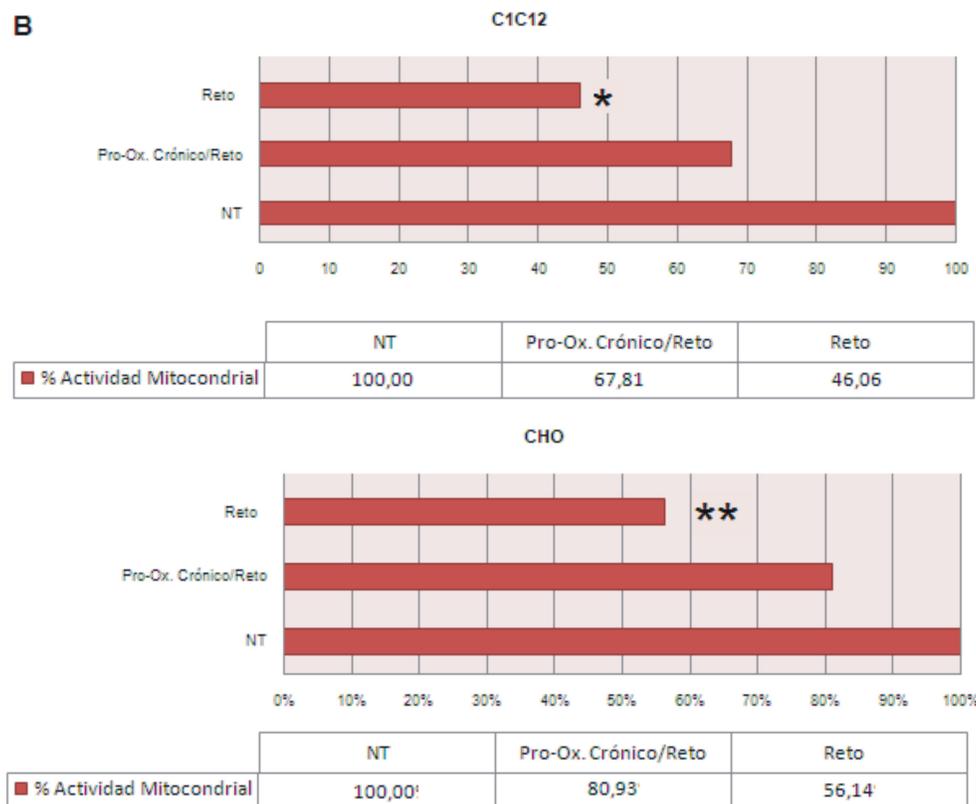
Al evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos, en ambas líneas celulares se observa una modulación negativa del antioxidante NAC sobre la respuesta adaptativa al estrés oxidativo crónico (Gráfica 5).

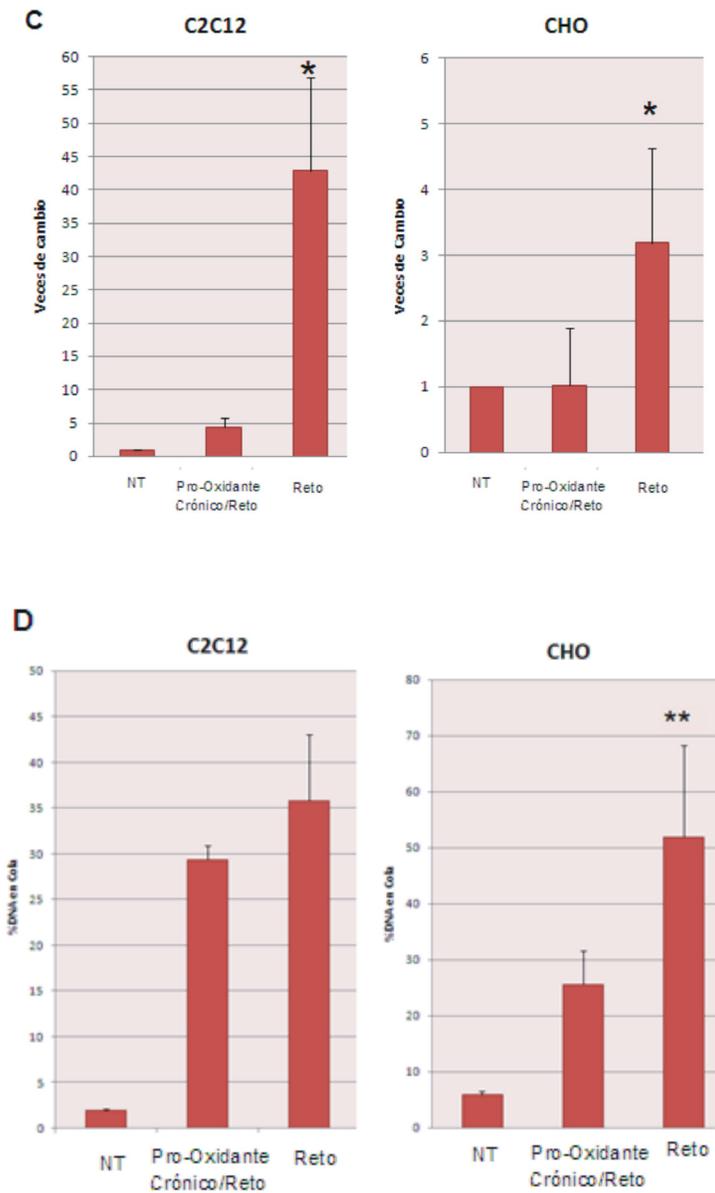
Los resultados obtenidos con azul de Tripiano no muestran diferencia entre tratamientos al evaluar viabilidad a las 0h; después de 24h se observa una disminución significativa de la viabilidad celular en los cultivos co-tratados con NAC y GO, para C2C12 la viabilidad fue de 52,8 % y para CHO de 67,8%; cuando se adicionó antioxidante solo antes del reto la viabilidad no se vio afectada considerablemente respecto al control, en

A



B





Gráfica 4. Adaptación celular a condiciones de estrés oxidativo crónico. Las células C2C12 y CHO-K1 se trataron y procesaron como se indica en materiales y métodos. 4A, Viabilidad celular determinada por azul de Tripano. 4B, Metabolismo mitocondrial evaluado por MTT. 4C, Detección de ROS con DCF-DA. 4D, Identificación de daño oxidativo en el DNA a través del ensayo cometa alcalino. Los valores son expresados como media \pm SD. ** Indica diferencia significativa respecto a tratamiento pro-oxidante crónico/reto ($p < 0,1$). * Indica diferencia significativa respecto a tratamiento pro-oxidante crónico/reto ($p < 0,05$).

C2C12 fue de 87% y en CHO de 74,1% (Gráfica 5A). La actividad mitocondrial se ve considerablemente disminuida en los cultivos que recibieron co-tratamiento por siete días, las células C2C12 44,8% y las CHO de 58,3% (Gráfica 5B).

Se observó un considerable aumento en la acumulación de ROS, para ambos tipos celulares, cuando los cultivos habían sido co-tratados con NAC y GO; C2C12 mostró un aumento de 16 veces y CHO de 4,35 veces respecto al control, lo que evidencia una diferencia importante entre líneas celulares (Gráfica 5C).

Los resultados obtenidos por ensayo DNA cometa indican un 36% y 37,9% de DNA en cola, respectivamente para C2C12 y CHO, cuando se trataron con dosis crónica de antioxidante y GO; cuando el tratamiento antioxidante fue solo antes del reto se observó 14% de DNA en cola para C2C12 y 33,2% para CHO (Gráfica 5D).

De este modo, se puede decir que NAC presenta un efecto negativo en la modulación de la respuesta adaptativa, al establecer que para todos los parámetros evaluados, el co-tratamiento con NAC presenta efectos comparables con los ejercidos por el reto solo.

Recientemente se ha reportado que el uso aislado de NAC puede contribuir a la producción y liberación de otros mediadores oxidativos, probablemente debido a la facilidad con la cual interactúa con el hierro (Aguilar *et al.*, 2008). NF- κ B se transloca al núcleo uniéndose a una gran número de promotores de genes blanco, a través de sus subunidades de unión al DNA, activa la producción de más de una enzima protectora como Mn-SOD; además, después de un estímulo puede unirse a las regiones promotoras por varias horas, y hasta días; así, una disminución en la expresión de proteínas limpiadoras de radicales libres facilita la acumulación de ROS, la cual a su vez inicia una cascada de eventos que finalmente contribuyen a un aumento del daño y acumulación del daño del DNA. NAC interviene con NF- κ B, al inhibir su activación. Así, varios autores han sugerido que el papel de NF- κ B es importante en la adaptación a estrés oxidativo, a través de su activación por ROS, por lo tanto la estrategia preventiva antioxidante debe ser reconsiderada (6).

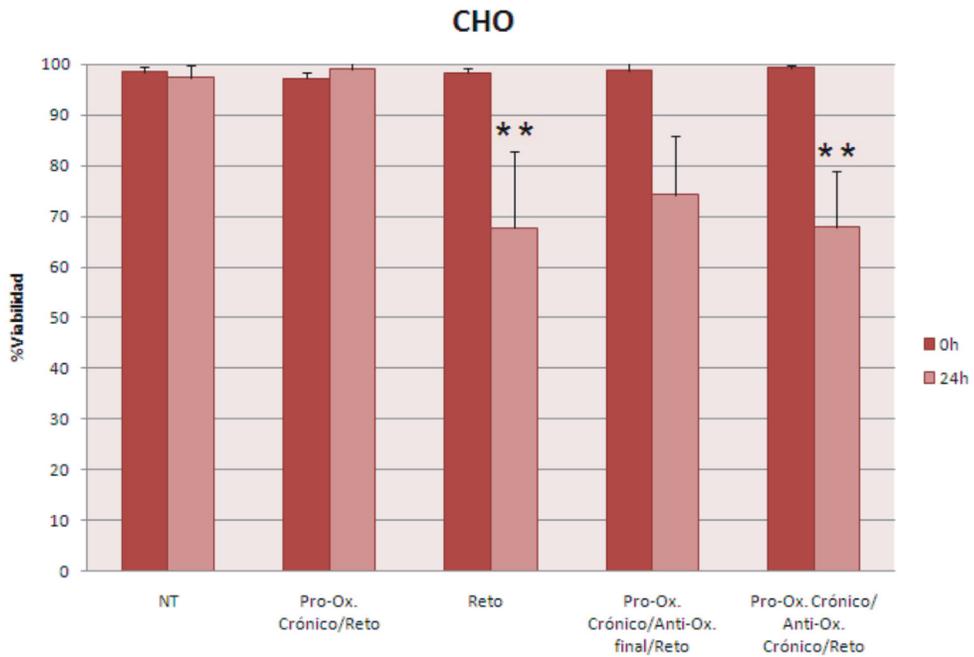
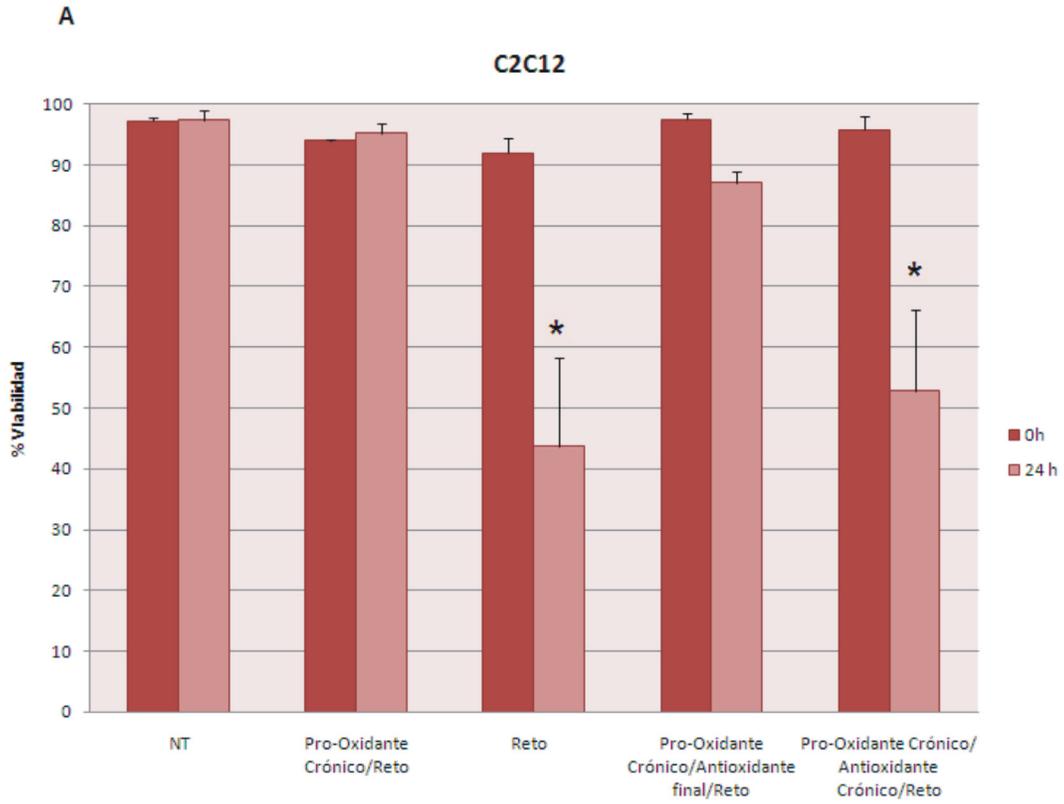
De estos resultados se puede concluir que, acorde con lo reportado en muy recientes trabajos de investigación, el antioxidante NAC, potencializa la acumulación de ROS y el daño en el DNA inducido por exposición crónica

a bajas concentraciones de oxidantes, atenuando el potencial biológico de respuesta al daño que poseen las células, dejándolas más susceptibles a situaciones agudas de estrés oxidativo (reto). Esto se convierte, entonces, en una desventaja más de los antioxidantes para ser utilizados en estrategias de *prevención* de desórdenes patológicos asociados con estrés oxidativo.

En el ensayo de co-tratamiento con L-Carnitina y GO realizado en células C2C12 (Gráfica 6) se observó que en cultivos con dosis crónica de antioxidante la actividad mitocondrial es de solo 42,93% respecto al control; mientras que cuando se suplementó el cultivo solo antes del reto, las células presentaron una viabilidad del 76,77% (Gráfica 6A). La acumulación de ROS, determinada por citometría de flujo empleando DCF-DA mostró que las células con tratamiento pro/antioxidante crónico aumentaron 23,3 veces el nivel de ROS con respecto a las células no tratadas y las células suplementadas solo antes del reto aumentaron el nivel solo 9,5 veces (Gráfica 6B). Lo anterior indica que el efecto antioxidante de L-Carnitina fue solo efectivo cuando se suministró una única dosis antes del reto. Los resultados obtenidos por ensayo DNA cometa indican un 36,6% de DNA en cola en células con tratamiento antioxidante solo antes del reto; en tanto que las células con dosis crónica de antioxidante presentaron un 20,6% de DNA en cola (Gráfica 6C).

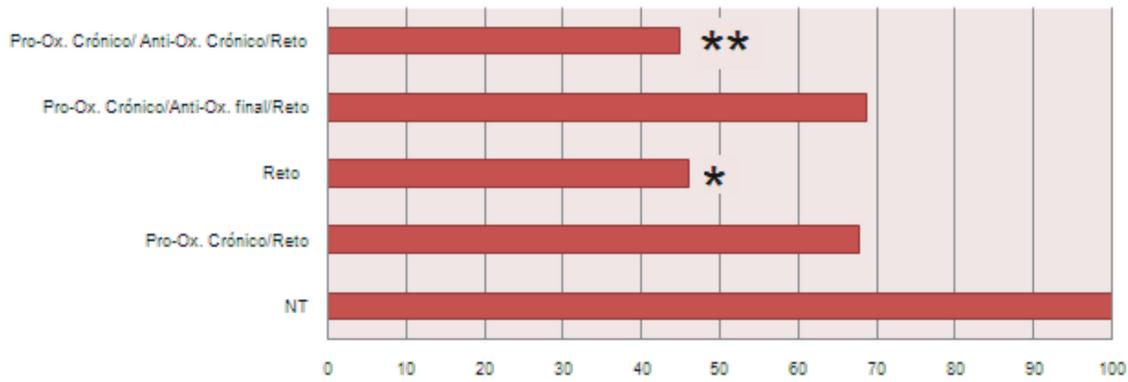
El comportamiento de la L-carnitina tras los diferentes tratamientos no sigue el mismo patrón del NAC, pues aunque se reducen los niveles de viabilidad y actividad mitocondrial y se elevan los niveles de ROS (aumento superior al presentado con NAC), los daños en el DNA son mucho menores.

Son numerosos los estudios que demuestran que la L-carnitina protege a las células del daño en el DNA y el proceso de mutagénesis; sin embargo, hasta ahora no se demostrado que este compuesto interfiera directamente con vías de señalización celulares como NF κ B, AP 1, y otras, sino que se plantea que sus posibles beneficios radican en su papel potenciador de la producción de energía celular, al estimular el metabolismo mitocondrial.



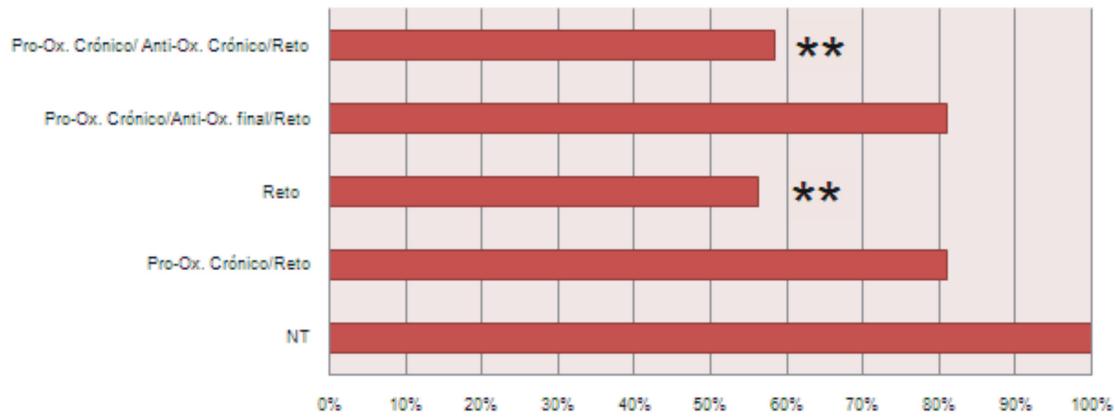
B

C1C12



	NT	Pro-Ox. Crónico/Reto	Reto	Pro-Ox. Crónico/Anti-Ox. final/Reto	Pro-Ox. Crónico/Anti-Ox. Crónico/Reto
%Actividad Mitochondrial	100,00	67,81	46,06	68,69	44,85

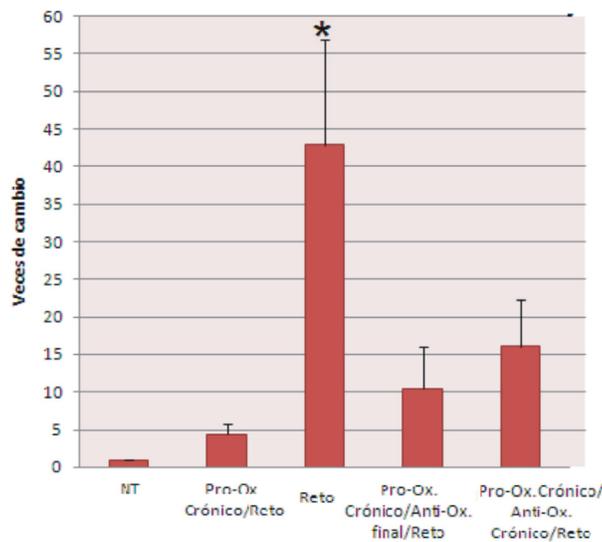
CHO

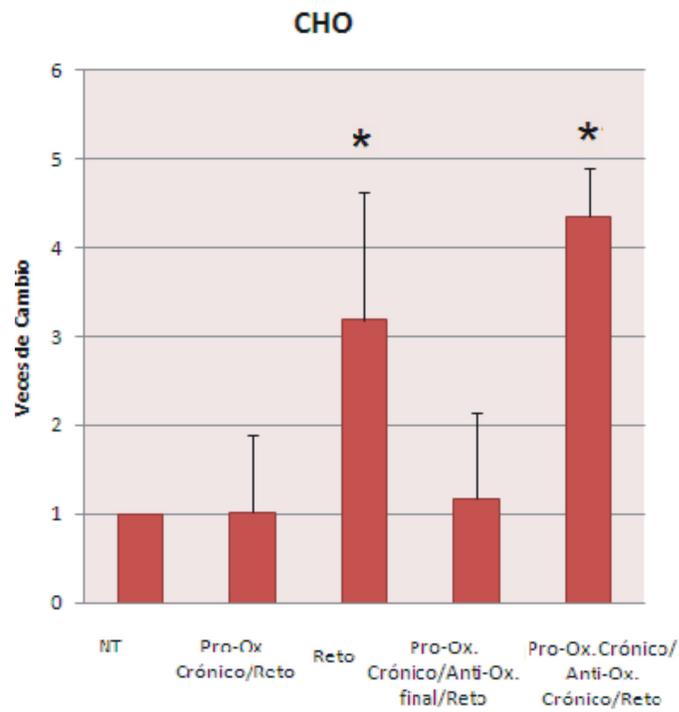
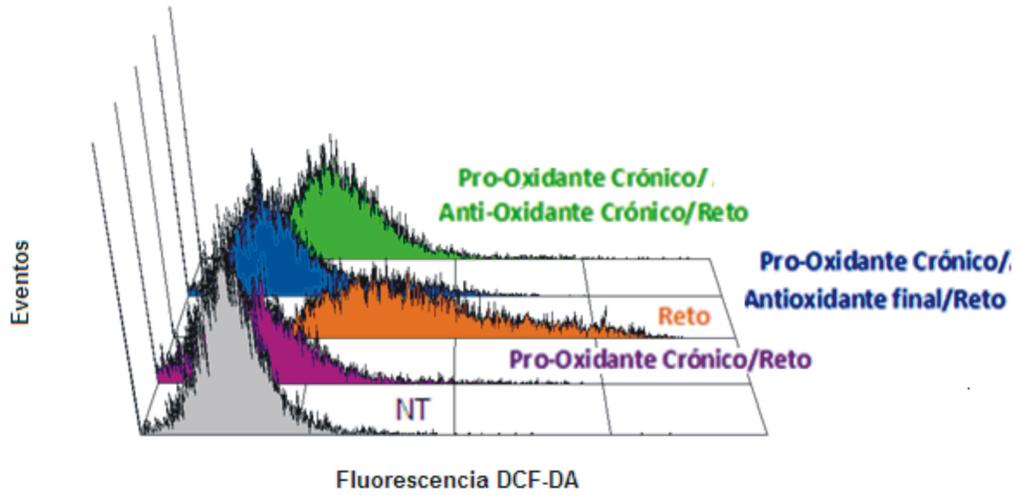


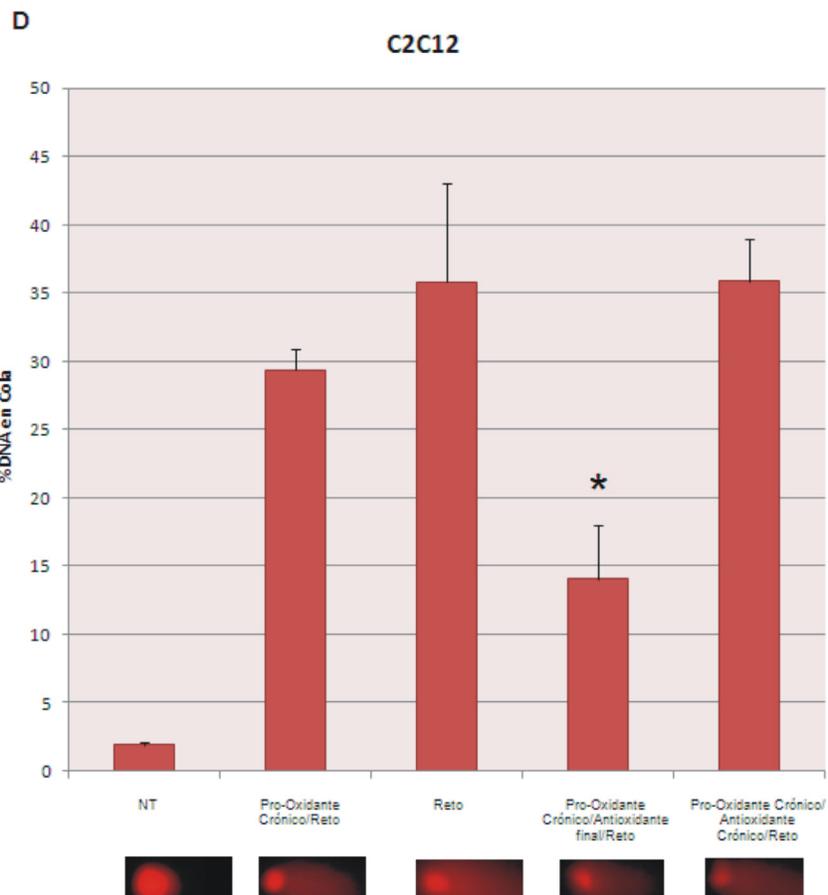
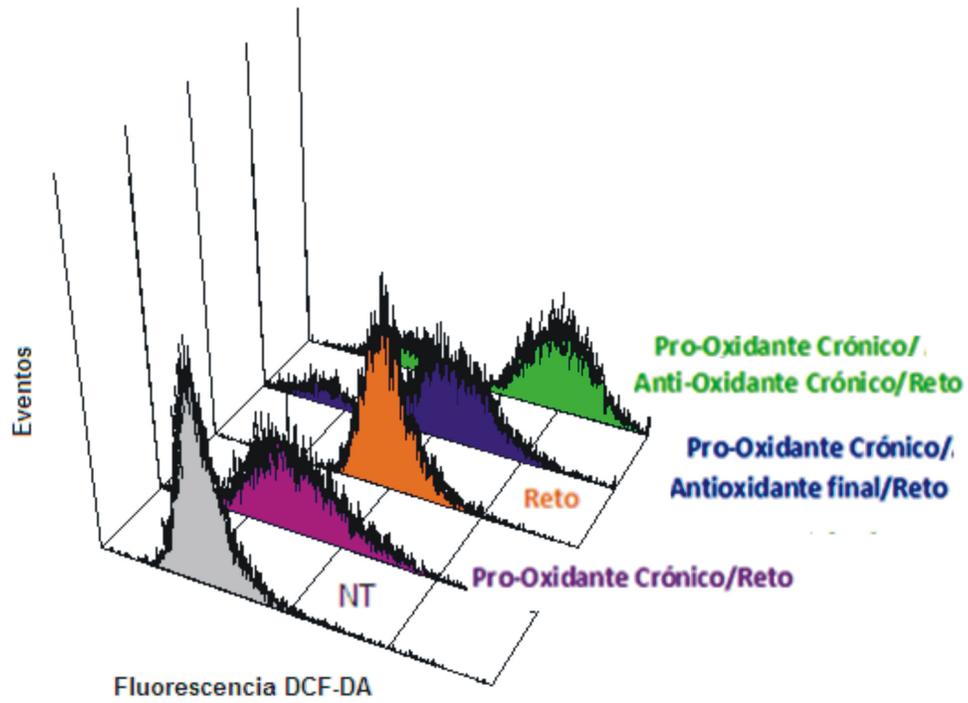
	NT	Pro-Ox. Crónico/Reto	Reto	Pro-Ox. Crónico/Anti-Ox. final/Reto	Pro-Ox. Crónico/Anti-Ox. Crónico/Reto
%Actividad Mitochondrial	100,00%	80,93%	56,14%	80,93%	58,39%

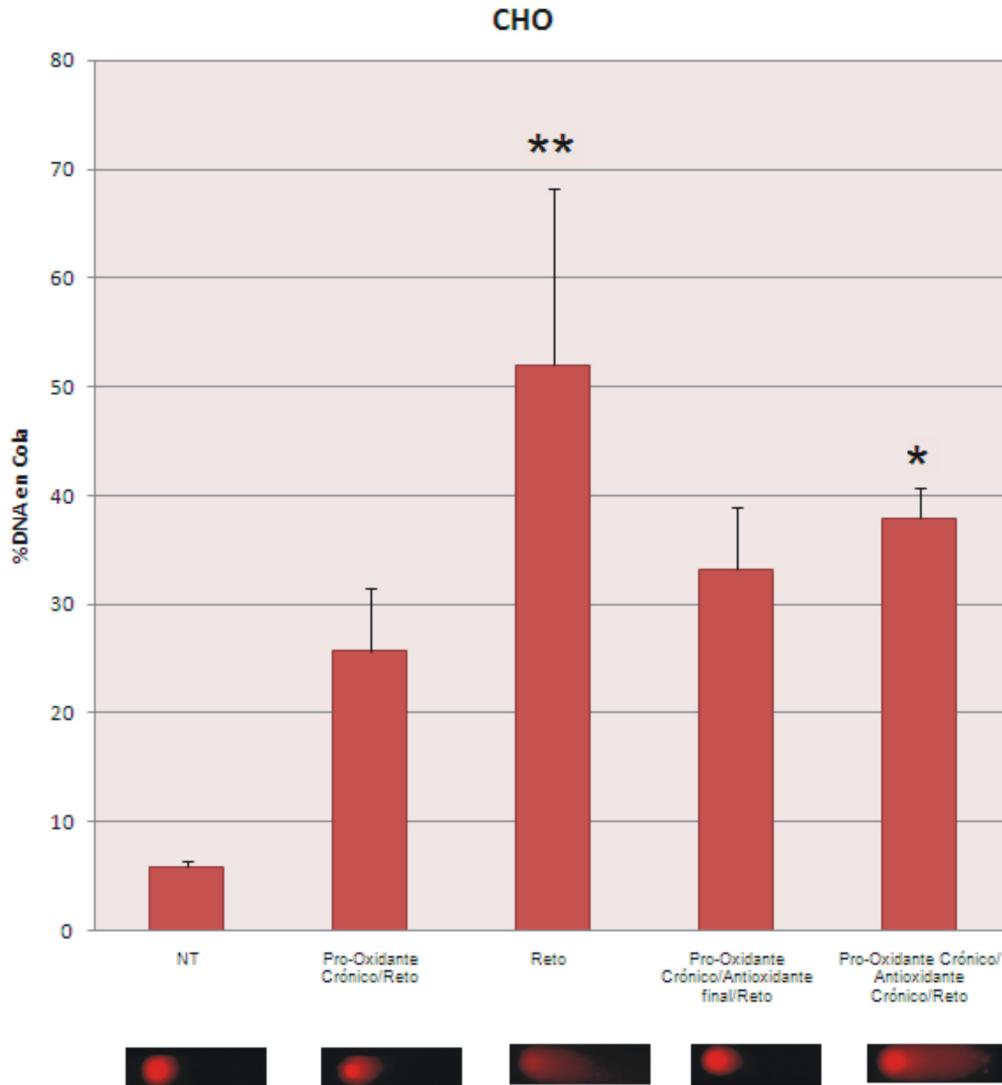
C

C2C12





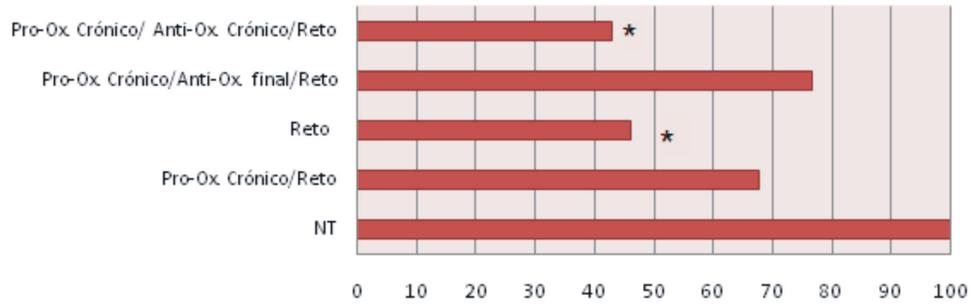




Gráfica 5. Modulación antioxidante de NAC a la respuesta adaptativa al estrés oxidativo en células C2C12 y CHO-K1. Cultivos celulares subconfluentes de C2C12 y CHO-K1 recibieron co-tratamiento crónico con NAC 0,5mM y GO 5mU/ml. 5A, Viabilidad por Azul de Tripano de células C2C12 y CHO. 5B, Metabolismo mitocondrial (MTT). 5C, Detección de ROS con DCF-DA. 5D, Identificación de daño oxidativo en el DNA a través del ensayo cometa alcalino. Los valores son expresados como media \pm SD. ** Indica diferencia significativa respecto a tratamiento pro-oxidante crónico/reto ($p < 0,01$). * Indica diferencia significativa respecto a tratamiento pro-oxidante crónico/reto ($p < 0,05$).

A

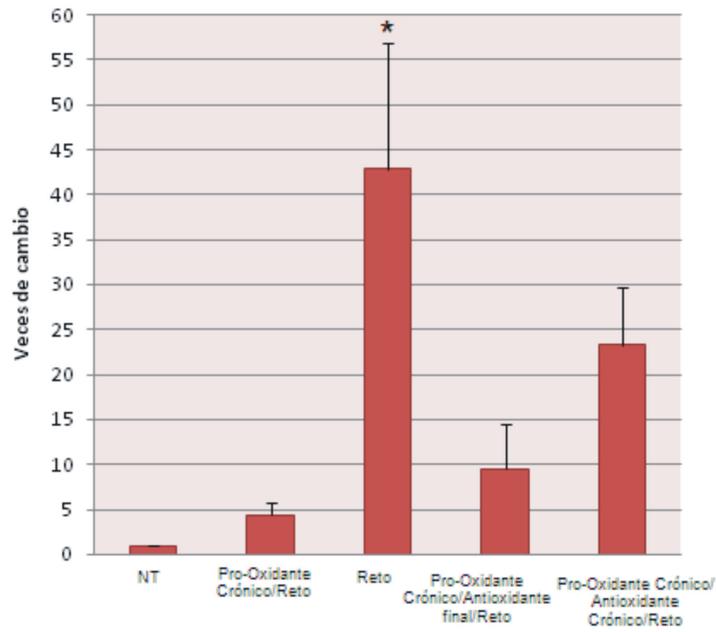
C1C12/L-CAr

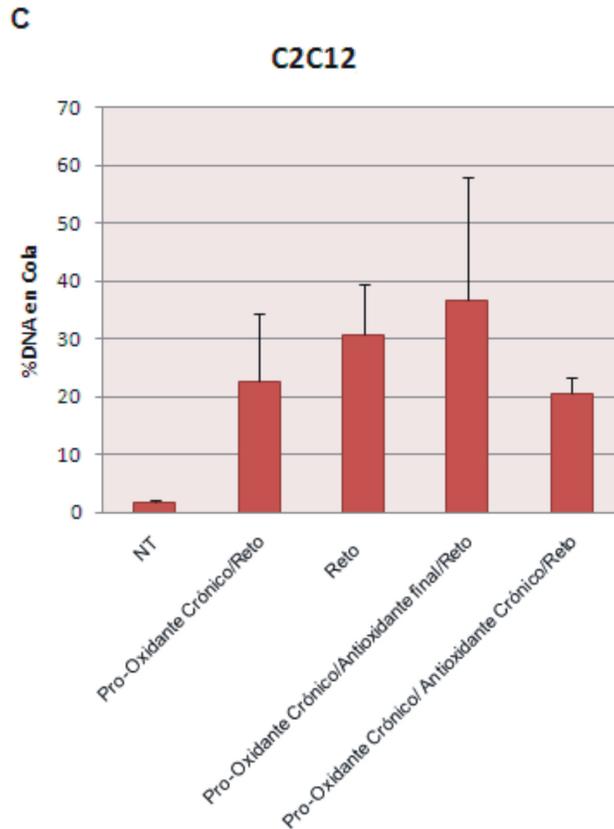
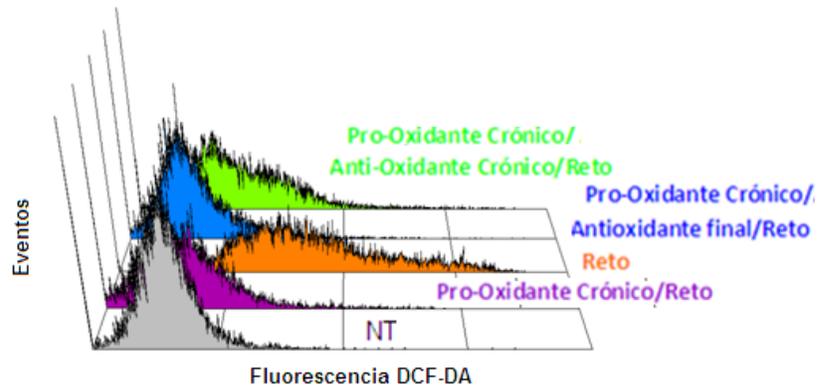


	NT	Pro-Ox. Crónico/Reto	Reto	Pro-Ox. Crónico/Anti-Ox. final/Reto	Pro-Ox. Crónico/ Anti-Ox. Crónico/Reto
%Actividad Mitocondrial	100,00	67,81	46,06	76,77	42,93

B

C2C12





Gráfica 6. Modulación antioxidante de L-Carnitina a la respuesta adaptativa al estrés oxidativo en células C2C12. Cultivos celulares subconfluentes de C2C12 recibieron co-tratamiento crónico con L-Carnitina 0,5mM y GO 5mU/ml. 6A, Metabolismo mitocondrial (MTT). 6B, Detección de ROS con DCF-DA. 6C, Identificación de daño oxidativo en el DNA a través del ensayo cometa alcalino. Los valores son expresados como media \pm SD. ** Indica diferencia significativa respecto a tratamiento pro-oxidante crónico/reto ($p < 0,1$). * Indica diferencia significativa respecto a tratamiento pro-oxidante crónico/reto ($p < 0,05$).

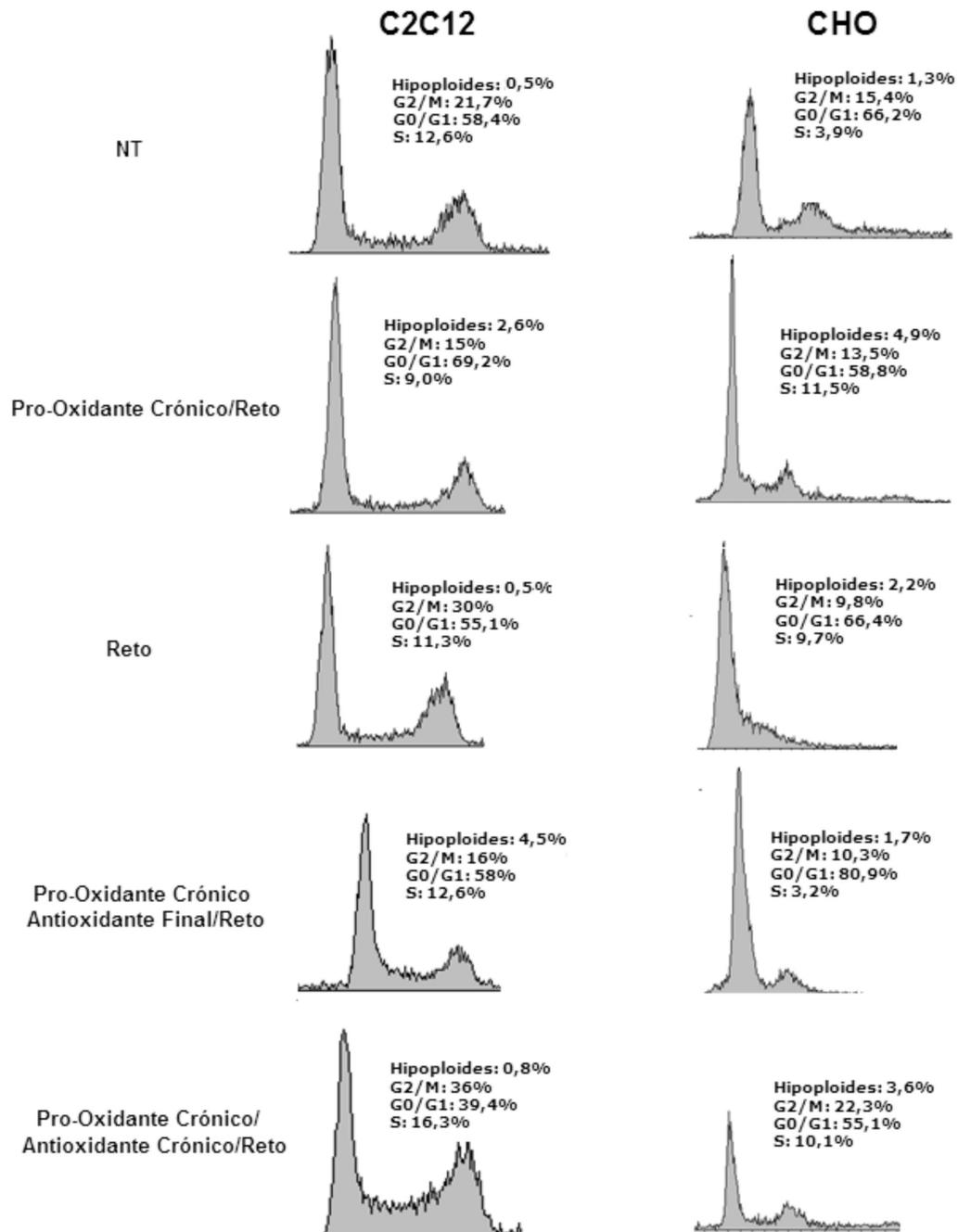
Efecto de los tratamientos Pro/Antioxidantes sobre la distribución de ciclo celular en las líneas celulares C2C12 y CHO-K1

En los resultados obtenidos para las células C2C12 y CHO-K1 (Gráfica 7) con tratamiento pro-oxidante crónico/reto y pro-oxidante crónico con dosis antioxidante solo antes del reto se observó que la distribución celular es similar al control negativo, lo cual implica que las condiciones experimentales no afectan de forma significativa la distribución de fases de ciclo celular. En C2C12, las células que fueron solo retadas exhiben un comportamiento similar al de las células con co-tratamiento pro/antioxidante crónico/reto (tanto NAC como L-Car), al presentar una ligera acumulación en la fracción G2/M.

Por otro lado, la L-carnitina y el NAC no poseen efectos evidentes sobre el ciclo celular en ninguna de las dos líneas celulares cuando las células son tratadas un solo día.

Aunque los co-tratamientos pro/antioxidantes no presentan efectos marcados en la distribución de ciclo celular, inhiben ligeramente la progresión hacia la fase S. Posiblemente en este mecanismo de retraso se encuentra involucrada la activación del punto de control G2/M de ciclo celular, siendo la proteína p38-MAPK el efector más importante; p38 al activarse por fosforilación desencadena una serie de procesos químicos que conllevan a la inhibición de la entrada de las células a la fase de división, esto como mecanismo de defensa en respuesta al daño.

Durante el análisis de las citometrías se observa también que hay diferencias notables en los patrones de intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio entre tratamientos (datos no mostrados), a pesar de que el protocolo empleado fue igual, lo que sugiere que dichos tratamientos pueden alterar la estructura de la cromatina y/o sus perfiles de expresión.



Grafica 7. Efecto de los tratamientos Pro/Antioxidantes sobre la distribución de ciclo celular en las líneas celulares C2C12 y CHO-K1. Citometría de flujo con PI en C2C12 y CHO-K1 con diferentes tratamientos Pro/Antioxidantes. Eventos/histograma: 10.000 células.

CONCLUSIONES

El énfasis inicial de este estudio fue determinar si el modelo celular tenía la habilidad para exhibir un comportamiento adaptativo en condiciones pro-oxidantes constantes y de baja cito-genotoxicidad; con los resultados obtenidos se confirma la inducción de una respuesta adaptativa, en la cual se evidencia que las células poseen un gran potencial para disminuir la acumulación de ROS y el daño oxidativo del DNA, sin interferir significativamente con el ciclo celular; además revela que la defensa celular adaptativa tiene un importante papel antioxidante. El conjunto de resultados permite concluir que el comportamiento observado se asemeja a una curva de respuesta que ajustada al modelo de hórmesis

BIBLIOGRAFÍA

1. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin M TD, Mazura M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39:44-84.
2. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology and Medicine* 2008; 44:153-9.
3. Radak Z, Naato H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahash R, Cardozo-Pelaez F, Goto S. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *European J Physiology* 2002; 445:273-278.
4. Nakamoto H, Kaneko T, Tahara S, Hayashi E, Naito Hisashi, Radak Zsolt, Goto Sataro. Regular exercise reduces 8-oxodG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats. *Experimental Gerontology* 2007; 42:287-295.
5. Salazar JJ. and Van Houten B. Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts. *DNA Repair* 1997; 385:139-149.
6. Sachdev, S.; Davies, JA. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise, *Free Radical Biology and Medicine* 2007; 44: 215–223