

Ionfilter.

Estudio *in vitro* del efecto citotóxico y antioxidante de un agua hidrogenada sobre líneas celulares humanas.

Edifici Antoni Prevosti, planta -1

Av. Diagonal, 643

C.P.08028 Barcelona (Espanya)

Tel. 93 402 12 14 e-mail:jcdomingo@ub.edu



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Dos Campus d'Excel·lència Internacional:

B : KC

Barcelona
Knowledge
Campus



Health Universitat
de Barcelona
Campus

Objetivo:

El propósito de este estudio consiste en determinar los posibles efectos del agua electrolizada y la presencia de hidrogeno gas en ésta, sobre la viabilidad y la actividad antioxidante celular utilizando dos modelos celulares humanos.

Diseño Experimental:

Para el estudio del efecto del agua electrolizada se utiliza una línea celular sana como son las ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™, células epiteliales pigmentarias de retina humana), y una línea celular tumoral como son las células HeLa (ATCC® CCL-2™, células epiteliales de adenocarcinoma humano concretamente de cáncer de cervix).

La obtención de agua electrolizada, se realiza justo antes de su utilización, partiendo de agua purificada producida con un sistema milli-Q (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). El agua se introduce en el sistema hidrogenador compacto HYDRON (proporcionado por la empresa IONFILTER) que mediante un proceso de electrolisis enriquece el agua con hidrógeno. Se realiza un proceso de recirculación continuo durante 10 minutos obteniendo agua hidrogenada con un potencial electroquímico de -790 ± 5 mV, medido con un medidor portátil de ORP (Milwaukee Electronics Kft., Szeged, Hungary). Esta agua se esteriliza inmediatamente por filtración a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ bajo presión aplicada, para trabajar con las líneas celulares. Su dilución en PBS concentrado (10X) no varía su potencial, pero en presencia de medio de cultivo se reduce ligeramente a -650 ± 10 mV.

Procedimiento Experimental:

Cultivos celulares

Cada una de las líneas celulares utilizadas en el estudio son cultivadas y mantenidas en el medio de crecimiento adecuado. Para la línea celular ARPE-19, las células crecen y son mantenidas en DMEM-F12 (Biological Industries, Kibbutz Beik Haemek, Israel) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de glutamina 200mM, 100 UI/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin. Para la línea celular HeLa el medio utilizado es DMEM (Biological Industries, Kibbutz Beik Haemek, Israel), también suplementado con suero, glutamina y antibióticos.

Ambas líneas celulares son mantenidas en condiciones de 37°C en un incubador (NUAIRE, Fernbrook Lane N Plymouth, USA) con atmosfera humidificada con el 5% de CO₂. Las células se dejan crecer hasta el 80% de confluencia en frasco de poliestireno de 75 cm². Las células crecen de forma adherente y después de un tratamiento enzimático con tripsina se separan para poder sembrarlas a la densidad adecuada en microplacas para el estudio. Para este paso la viabilidad celular y la estimación del número de células se determinan con el test de exclusión del colorante azul de tripán por conteo de las células no teñidas en el contador automático de células Luna (Logos Biosystems, Anyang-si, Gyeonggi-do, South Korea)

Ensayo de viabilidad celular

En microplacas de 96 pocillos se siembran cada línea celular, con una densidad de células que asegure un crecimiento exponencial, sin llegar a saturación, la densidad de células ARPE-19 es 7,5·10⁴ células/cm² y para las HeLa 1,5·10⁴ células/cm². Se incuban 24 h a 37°C para permitir la adhesión a la superficie del pocillo. Por cada tiempo de estudio (0, 24, 48 y 72 h) y cada línea celular se siembran en diferentes microplacas.

Se trabaja con cuatro medios diferentes:

1. MEDIOS 0: Medios DMEM-F12 o DMEM suplementados, medios control.
2. MEDIOS 1: Medios concentrados y diluidos posteriormente: DMEM-F12 (10X) o DMEM (10X) diluidos con agua estéril apta para cultivos celulares, y neutralizados con solución de bicarbonato sódico al 7,5%, para obtener un pH neutro y posteriormente suplementados con suero, glutamina y antibióticos, medios control diluidos.
3. MEDIOS 2: Medios concentrados y diluidos posteriormente: DMEM-F12 (10X) o DMEM (10X) diluidos con agua estéril apta para cultivos celulares electrolizada al 33% del nivel máximo de H₂, y neutralizados con solución de bicarbonato sódico al 7,5%, para obtener un pH neutro y posteriormente suplementados con suero, glutamina y antibióticos, medios de ensayo.
4. MEDIOS 3: Medios concentrados y diluidos posteriormente: DMEM-F12 (10X) o DMEM (10X) diluidos con agua estéril apta para cultivos celulares electrolizada al 100% del nivel máximo de H₂, y neutralizados con solución de bicarbonato sódico al 7,5%, para obtener un pH neutro y posteriormente suplementados con suero, glutamina y antibióticos, medios de ensayo.

Se realizan dos tratamientos sobre las células agudo o crónico. El tratamiento agudo consiste en la adición de medio con agua hidrogenada para posteriormente realizar el ensayo de viabilidad celular a los tiempos indicados anteriormente. En el tratamiento crónico el medio se va cambiando diariamente hasta la realización del ensayo.

Todas las determinaciones se realizan por triplicado con 10 experimentos independientes.

Después de adicionar las células con los diferentes medios, se tratan de forma aguda o crónica, y se dejan incubando el tiempo requerido hasta proceder con el ensayo del MTT, también llamado Test de Inhibición de la Succinato Deshidrogenasa (SDI).

El ensayo del MTT es un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Está basado en la rotura del anillo de tetrazolio del MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), por diferentes deshidrogenasas mitocondriales, formándose cristales de formazán, siendo la cantidad de formazán formado proporcional al número de células proliferantes (metabólicamente activas).

Se prepara una solución de MTT 5 mg/ml en tampón fosfatos (PBS), se añade a cada pocillo 20 μ L por 180 μ L de medio fresco y se incuba durante 1 h para las células HeLa o 2 h para las ARPE-19. El medio se retira posteriormente de los pozos, se lava con 100 μ L de PBS y los cristales de formazán resultantes solubilizados en 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Las placas de cultivo se agitan suavemente durante 30 min para romper las membranas celulares y solubilizar el formazán. Finalmente se mide la densidad óptica a 550 nm con un lector de microplacas Synergy H1 Hybrid Multimode (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Los valores de absorbancia son normalizados con los controles.

Ensayo de la actividad antioxidante celular (CAA)

Las células ARPE-19 y HeLa se siembran en microplacas de 96 pocillos y se incuban durante 72 h para el tratamiento agudo. Para el tratamiento crónico las células son tratadas con los Medios 0 o con los Medios 3 durante 72 h, con un cambio diario del medio.

Al cabo de tres días, se procede a retirar el medio de cultivo y a realizar un pretratamiento que consiste en la adición donde corresponda de PBS hidrogenado, Trolox (ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico, un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E) como patrón antioxidante a concentraciones entre 0-2000 μ M. Simultáneamente, se incuba la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) permeable a las

células que es retenido en el interior celular por la acción de las esterasas intracelulares. Para el desarrollo de este ensayo las células son mantenidas en PBS en las siguientes condiciones.

Tratamiento agudo:

1. PBS control.
2. PBS concentrado y dilución con agua.
3. PBS concentrado y dilución con agua electrolizada al 33% del nivel máximo de H₂.
4. PBS concentrado y dilución con agua electrolizada al 100% del nivel máximo de H₂.

Tratamiento crónico:

1. PBS control.
2. PBS concentrado y dilución con agua.
3. PBS concentrado y dilución con agua electrolizada al 100% del nivel máximo de H₂.

Este tratamiento se realiza durante 60 min a 37°C, después del cual las células se lavan y se vuelven a incubar con 200 µL del PBS correspondiente al cual se añade a continuación un generador de radicales libres, el 2,2'-azobis-2-metilaminopropano (AAPH). Inmediatamente una vez adicionado el AAPH se inicia una cinética de fluorescencia con lectura cada 2 min durante una hora manteniendo la placa a 37°C, las lecturas se realizan a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 525 nm.

La DCFH-DA se oxida rápidamente por los radicales libres a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF) altamente fluorescente. El ensayo mide la capacidad de la presencia de hidrogeno para evitar la formación de DCF por los radicales peroxilo, generados por el AAPH en células humanas normales y tumorales. La disminución de la fluorescencia celular en comparación con las células control indica la capacidad antioxidante de los compuestos (Figura 1A). Los resultados se expresan en CAA y en micromolar (µM) de equivalentes de Trolox (TE). Cada placa incluye pocillos triplicados de Trolox por cada concentración y para blancos (presencia de sonda pero no oxidante). Todas las demás determinaciones se realizan por triplicado a partir de cinco experimentos independientes. Al finalizar el tiempo de lectura, se procesa la viabilidad celular por el método del MTT.

La Actividad Antioxidante Celular se cuantifica mediante el Área de Integración bajo la Curva (AUC) normalizada respecto el número de células vivas (MTT) de cada pocillo. Finalmente para procesar los datos obtenidos a lo largo del ensayo, se interpolan los resultados de cada muestra con la curva patrón de Trolox (unidades CAA vs [Trolox, µM] para obtener los equivalentes de

Trolox, utilizando el programa informàtic GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) (Figura 1B).

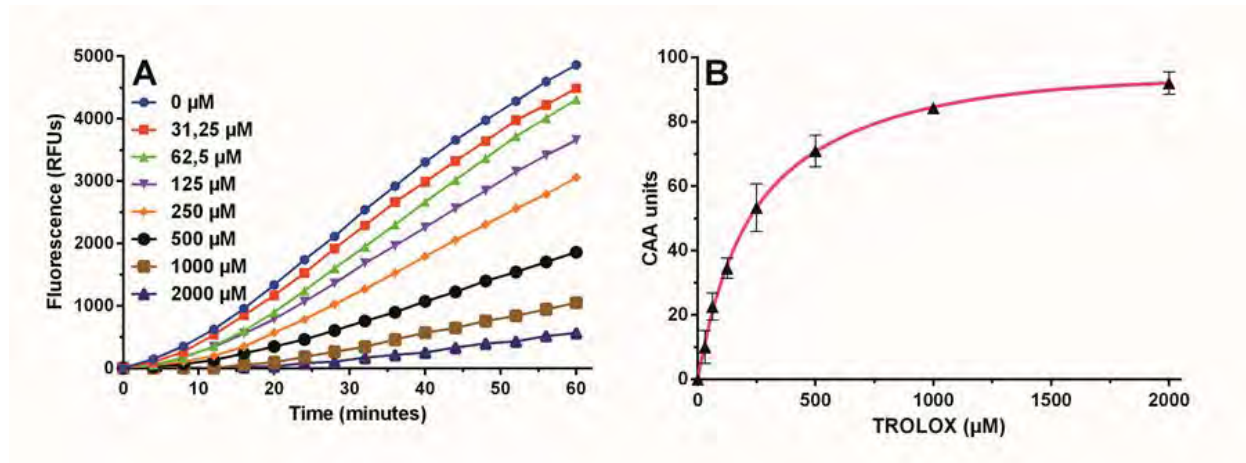


Figure 1. Plots of Trolox Kinetic Curves. (A) Representative fluorescence curves from CAA assay of varying concentrations of Trolox antioxidant standards ranging from 0 to 2000 μM . **(B) Dose-Response Curve of Trolox Standard.** The net AUC of varying concentrations of Trolox antioxidant standards ranging from 0 to 2000 μM were used to calculate CAA units that are plotted versus Trolox concentration. The subsequent calibration curve was used to interpolate the Trolox Equivalents (TE) value of the active compounds.

Resultados

Estudios de viabilidad y proliferación celular

Las células ARPE-19 y HeLa se cultivaron en condiciones óptimas y la monitorización se realizó por microscopía óptica para valorar su evolución y la idoneidad para llevar a cabo los experimentos.

Con el fin de evaluar el efecto del agua hidrogenada sobre la viabilidad celular, las células se incubaron (72 h) con H_2 en el medio de cultivo tratadas de forma aguda (un adición inicial) o de forma crónica (cambio diario del medio con H_2); y la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo del MTT. En la Figura 2A, podemos ver los resultados de la línea celular ARPE-19. Estos resultados indican un crecimiento clonal normal de las células en el medio control. La presencia de hidrogeno en el medio de cultivo adicionado de forma única (tratamiento agudo) o de forma repetitiva (tratamiento crónico) no modifica ni la viabilidad ni el crecimiento celular. Estos resultados confirman la inocuidad del agua hidrogenada sobre el crecimiento de células sanas.

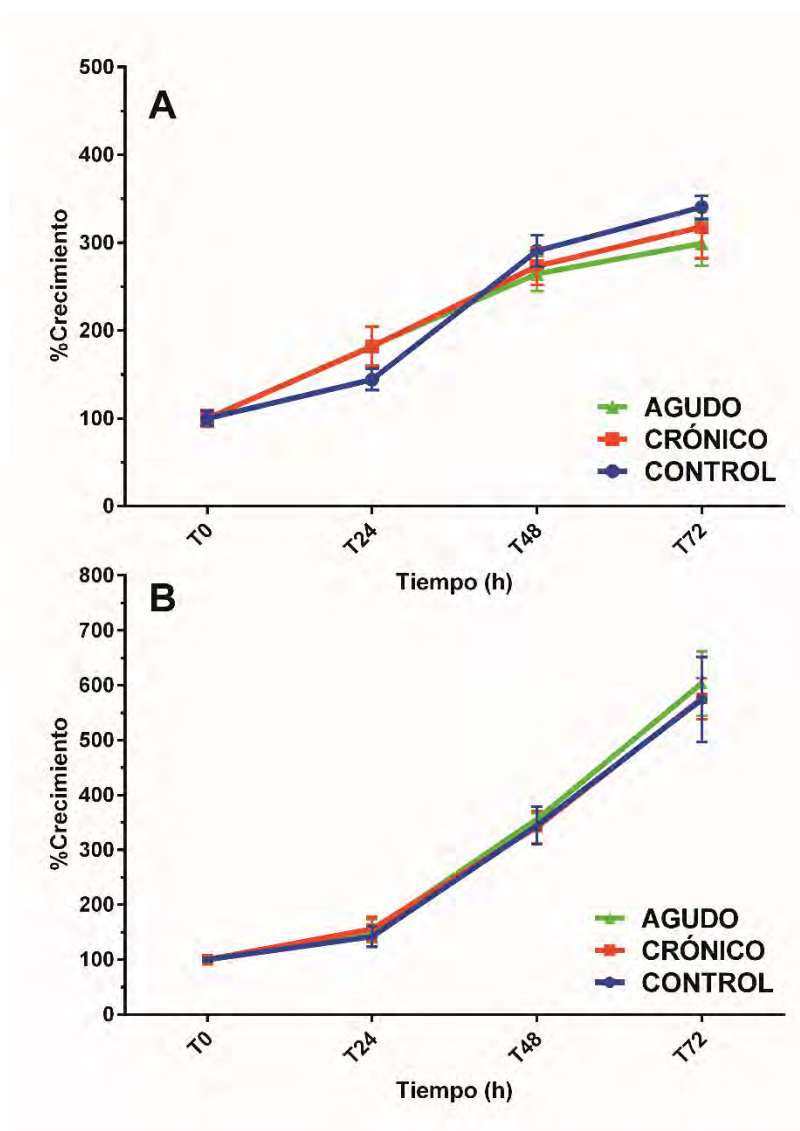


Figure 2. Time curves for electrochemically reduced water effect on the viability of the ARPE-19 (A) and HeLa cells (B). Cells were treated with cell culture medium with (Acute and Chronic treatment) or without H₂ (Control) and allowed to growth by 72 h. Chronic treatment involves change the culture medium daily. Viability was measured by the MTT assay.

Un estudio análogo se ha realizado con células tumorales HeLa (Figura 2B). En primer lugar cabe destacar, como era esperable, que las HeLa presentan un crecimiento celular incrementado respecto a las ARPE-19, fruto de su mayor crecimiento clonal. Respecto al efecto del H₂ en el medio de cultivo, al igual que en las células ARPE-19, no se observa ninguna

alteración ni de la viabilidad ni de la proliferación celular. Este resultado confirma la ausencia de citotoxicidad del agua hidrogenada independientemente del grado de proliferación clonal celular.

Actividad Antioxidante Celular (CAA)

Para determinar la producción de radicales libres intracelulares, las células se trataron con diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) apolar y no fluorescente. El compuesto se somete a desacetilación por esterasas citosólicas para formar la diclorodihidrofluoresceína polar no fluorescente (DCFH) que reaccionando con radicales libres (ROS) da lugar al derivado fluorescente diclorofluoresceína.

Las células ARPE-19 y HeLa se cultivaron en monocapa en una microplaca de 96 pocillos. Las células fueron pretratadas DCFH-DA en PBS con y sin H₂. Después de 1 hora de incubación, se retiró cuidadosamente el medio y las células se lavaron con PBS. Como referencia antioxidante se utilizó diferentes concentraciones de Trolox incubadas en PBS con DCFH-DA y sin H₂ durante el mismo tiempo. A continuación, se añadió el generador de radicales libres AAPH a las células para comenzar el ensayo y la fluorescencia se leyó cada dos minutos durante 1 h a 37°C. La cinética de fluorescencia asociada a la formación de la DCF se midió durante 1 h. La Actividad Antioxidante Celular (CAA) se define la reducción en el porcentaje de radicales libres intracelulares respecto al control sin antioxidantes y se cuantifica mediante el Área de Integración bajo la Curva (AUC) y se puede expresar también como la concentración de equivalentes de Trolox (TE) (Figura 1).

Tabla 1. Efecto de la dosis y del tratamiento en la Actividad Antioxidante Celular (CAA) del agua hidrogenada en células sanas y tumorales

	ARPE-19		HELA	
	AGUDO	CRÓNICO	AGUDO	CRÓNICO
CONTROL	6,28 ± 2,66	10,50 ± 2,30	12,73 ± 2,01	16,18 ± 2,16
TRATADO (33% H₂)	33,71 ± 6,91	N.D.	39,45 ± 8,04	N.D.
TRATADO (100% H₂)	41,84 ± 2,55	62,37 ± 6,50	52,32 ± 7,54	45,85 ± 4,28

La actividad antioxidante y el efecto protector del agua hidrogenada se confirmaron en células ARPE-19 y HeLa, expuestas al inductor de radicales peroxilo específico AAPH (Tabla 1). La CAA basal es superior en las células tumorales HeLa respecto a las ARPE-19 debido a su mayor

metabolismo basal que implica la necesidad de una mayor protección intracelular. En ambas líneas celulares, la adición aguda de H₂ en el medio incrementa la CAA de una manera dosis dependiente, observándose un mayor incremento en las células HeLa que en las ARPE. Aunque cuantitativamente las células HeLa presentan una mayor CAA, un análisis relativo respecto al basal indican un mayor incremento en las células ARPE-19 (>6,7) que en las HeLa (>4,1).

La vida media del H₂ es como mínimo de una hora ya que no se observan cambios significativos en la cinética de protección durante este tiempo. La traducción de la CAA a TE presenta el mismo comportamiento (Tabla 2). La protección antioxidante del agua hidrogenada es equivalente a la ingesta de una concentración de Trolox de 260 µM en células ARPE-19 y de 430 µM en células HeLa, respectivamente.

Tabla 2. Efecto de la dosis y del tratamiento en la Actividad Antioxidante Celular (CAA) expresada como Equivalentes de Trolox (TE) del agua hidrogenada en células sanas y tumorales

	ARPE-19		HELA	
	AGUDO	CRÓNICO	AGUDO	CRÓNICO
CONTROL	15,07 ± 4,64	35,83 ± 4,80	36,73 ± 7,98	50,48 ± 3,85
TRATADO (33% H₂)	163,98 ± 30,19	N.D.	226,92 ± 42,36	N.D.
TRATADO (100% H₂)	258,14 ± 46,80	669,12 ± 96,56	432,25 ± 61,35	317,41 ± 52,72

En un tratamiento crónico que simula la ingesta diaria de agua hidrogenada, las dos líneas celulares muestran comportamientos diferentes. A nivel basal, el cambio diario de medio de cultivo no modifica significativamente la CAA celular en ambos sistemas (Tabla 1). La presencia de H₂ en este medio provoca un mayor incremento en la CAA de las células ARPE-19 respecto al tratamiento agudo. Este comportamiento no se observa en las células HeLa donde el tratamiento crónico con un medio con H₂ no incrementa la CAA. La traducción a TE presenta el mismo comportamiento con una equivalencia de 670 µM de Trolox en células ARPE-19 y de 320 µM en células HeLa, respectivamente (Tabla 2).

Este comportamiento diferencial del tratamiento crónico respecto al agudo podría explicarse por dos motivos. El primero podría estar relacionado con el hecho de que una administración crónica de H₂ podría inducir un incremento del sistema antioxidante celular tanto a nivel de sistemas enzimáticos (SOD, GR, GPx, Cat,...) como de sistemas químicos (glutación,...). El no

incremento observado en las células tumorales se explicaría por el déficit ya demostrado de las mismas de algunos componentes básicos del sistema antioxidante celular como la GPx que evita dicha potenciación. Comportamientos similares entre células sanas y tumorales ya se han descrito para otros principios activos.

Una segunda alternativa podría estar relacionada con el hecho descrito recientemente (Hamasaki, T.; Harada, G.; Nakamichi, N.; Kabayama, S.; Teruya, K.; Fugetsu, B.; Gong, W.; Sakata, I.; Shirahata, S. *Electrochemically reduced water exerts superior reactive oxygen species scavenging activity in HT1080 cells than the equivalent level of hydrogen-dissolved water. PLoS One 2017, 12, e0171192*), en el que se indica que parte de la CAA residual del agua hidrogenada puede estar relacionada con la acumulación de nanopartículas de platino con actividad antioxidante. Aunque en el estudio se utilizan células tumorales HT1080 y nosotros no hemos visto efecto aditivo en el tratamiento crónico de las células HeLa, no se puede descartar que el incremento observado en las células ARPE-19 con el tratamiento crónico pueda estar relacionado con la acumulación de estas nanopartículas.

Barcelona, 6 de Julio de 2017



Firmado: Dr. Joan Carles Domingo