

Implementación del guion experimental “Evaluación de la enzima LDH como biomarcador de citotoxicidad en células tumorales”: experiencia de aprendizaje

Centeno Llanos Sandra María*, Vargas Dorantes Oscar de Jesús, Castañeda López Perla Carolina,
Hernández Luis Francisco

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Farmacia. Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, Ciudad de México, C.P. 04510. México.

*Autor para correspondencia: centenosm@quimica.unam.mx

Recibido:

18/julio/2021

Aceptado:

09/noviembre/2021

Palabras clave:

Biomarcador,
citotoxicidad,
microescala

Keywords:

Biomarker,
cytotoxicity,
microscale

RESUMEN

El desarrollo de biomarcadores es un problema prioritario para un gran número de disciplinas, particularmente para la Toxicología, cuya enseñanza teórico-práctica forma parte del Plan de estudios de la carrera de Química Farmacéutico Biológica. En el presente trabajo se describe la experiencia de aprendizaje mediante la implementación del guion experimental “Evaluación de la enzima LDH como biomarcador de citotoxicidad en células tumorales” en un grupo piloto. Se encontró que al realizar el ensayo colorido a microescala para la detección indirecta de la actividad de la enzima LDH, los estudiantes pueden relacionar el parámetro calculado con el concepto de biomarcador de efecto; además de hacer la interpretación biológica correspondiente sobre la inducción de muerte celular, asociada al tratamiento con muestras de contaminantes ambientales.

ABSTRACT

Biomarkers development is a priority in many fields, especially in Toxicology; theoretical and practical Toxicology course is included in the Pharmaceutical and Biological Chemistry career curricula. In this work, the implementation of a new experimental protocol “Evaluation of LDH enzyme as cytotoxicity biomarker in tumor cells” as a learning experience in a pilot group is described. The results showed that those students who performed the microscale-colored assay for indirect detection of LDH activity, could successfully link the calculated value with the theoretical concept “effect biomarker”. Furthermore, they could comprehend the biological significance of the resulting cell death, as well as associate these observations with the environmental pollutants’ treatment.

Introducción

Un biomarcador es un parámetro que denota o es resultante de la interacción entre un sistema biológico y un agente de cualquier naturaleza. Las distintas medidas se pueden clasificar como biomarcadores de exposición, si reflejan la presencia del agente o alguno de sus metabolitos, ya sea de manera independiente o en interacción con un componente del sistema biológico; biomarcadores de efecto, si indica la respuesta o el cambio del sistema biológico a la interacción con el agente; o biomarcadores de susceptibilidad, si se refiere a la habilidad inherente o adquirida que tenga el sistema biológico para responder al agente (WHO y IPCS, 1993; Schmidt, 2006).

El desarrollo de nuevos y mejores biomarcadores es uno de los campos de gran interés tanto a nivel de ciencia básica como aplicada, por sus posibles aplicaciones en distintas disciplinas como la Biomedicina, la Farmacología y la Toxicología (Nguyen y Caldas, 2021; Andersen et al., 2021).

En el estudio de la Toxicología, una de las áreas especializadas con mayor impacto es la ambiental, ya que muchos de los agentes con potencial toxicológico a los que los seres humanos están expuestos forman parte de la contaminación ambiental. Un ejemplo es la mezcla compleja de agentes generados durante la combustión del tabaco; se ha descrito que algunos de estos compuestos tienen asociado un efecto mutagénico y carcinogénico en exposiciones crónicas, mientras que, en exposiciones de tipo agudo, la citotoxicidad es uno de los efectos más importantes (NIEHS, 2021).

Desarrollo

Planteamiento del problema

En el contenido programático de la asignatura de Toxicología para la carrera de Química Farmacéutico Biológica (QFB) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), incluye en su primera unidad el estudio de las generalidades del tema de biomarcadores; pero hasta hace algunos años, carecía de una contraparte experimental donde se aplicarían y fortalecieran los conocimientos adquiridos en la parte teórica de la asignatura.

En consideración a lo mencionado previamente, se hizo patente la necesidad de incluir una nueva práctica acorde con las tendencias actuales del campo; lo que llevó al desarrollo e implementación de un guion experimental, donde se evaluara la citotoxicidad como un biomarcador de efecto a la exposición de contaminantes ambientales, utilizando un modelo celular *in vitro*. Dichas

actividades se realizaron en el marco del Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME).

En el presente trabajo se describe la experiencia del ambiente de aprendizaje durante la implementación del guion experimental "Evaluación de la enzima LDH como biomarcador de citotoxicidad en células tumorales" en un grupo piloto, y el seguimiento a la versión final.

Metodología

La propuesta de guion experimental "Evaluación de la enzima LDH como biomarcador de citotoxicidad en células tumorales" formó parte del Proyecto PAPIME "Implementación y renovación de guiones experimentales para la enseñanza de la toxicología en la licenciatura de Química Farmacéutico Biológica" con número de registro PE208915.

Teniendo en consideración los niveles de apertura para las actividades prácticas de laboratorio propuestos por Priestley (citado por Jiménez et al., 2006), se resolvió un enfoque nivel 3 o "cerrado", siendo que el planteamiento del problema y la planificación experimental están a cargo de los docentes; mientras que los estudiantes tienen la tarea del seguimiento de instrucciones y manejo de instrumentos y técnicas, pero además, deben comprender el contexto del ensayo y la interpretación biológica del mismo.

Para la estandarización de la práctica se contó con la participación de un estudiante de la licenciatura de Química de la Facultad de Química de la UNAM. La propuesta de guion experimental planteado para el laboratorio de Toxicología tomó en cuenta:

- El utilizar muestras ambientales con recolección y procesamiento accesibles.
- El empleo de un modelo celular *in vitro* de fácil manipulación.
- El uso de un ensayo colorido con requerimientos metodológicos básicos, disponibles en un laboratorio de docencia.
- El ajuste a microescala para disminuir el uso de reactivos y la generación de residuos.
- El desarrollo del protocolo completo dentro de una única sesión de laboratorio, incluyendo la explicación y la aplicación del examen.
- El utilizar como instrumento de evaluación un cuestionario calificado mediante rúbrica.

En cuanto a las muestras ambientales, se decidió trabajar con los extractos orgánicos obtenidos por maceración a partir de colillas de cigarro y hollín de escape automotriz.

El modelo celular elegido fue la línea celular K562, debido a que requieren condiciones de crecimiento estándar (37°C y 5% de CO₂) y por su crecimiento en suspensión (ATCC, 2021), mismo que simplifica la manipulación, ya que no se requiere de pasos adicionales para despegar y/o disgregar a las células de las diferentes superficies en las que se lleva a cabo el experimento.

El ensayo colorido se construyó con base en los protocolos reportados y validados previamente (Fotakis y Timbrell, 2006; Chan et al., 2013; Takara Bio, 2020) considerando la detección de la enzima LDH en el sobrenadante como biomarcador del efecto citotóxico de los extractos de las muestras ambientales. La reacción se basa en una determinación indirecta de la actividad de la enzima LDH (Figura 1).

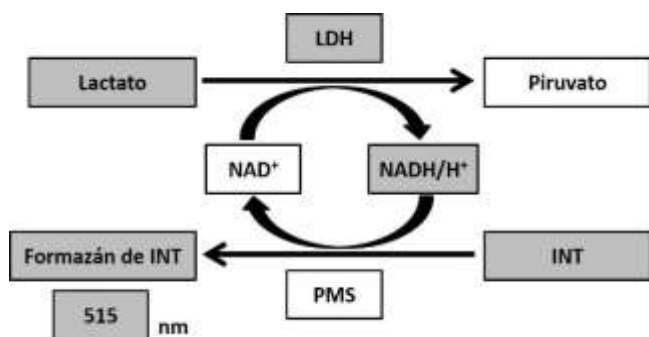


Figura 1. Reacción de detección de la actividad de la enzima LDH.

Las condiciones experimentales que se establecieron fueron:

- La evaluación de un volumen único de cada extracto orgánico obtenido de las muestras ambientales.
- La evaluación de un control de disolvente, considerando el mismo volumen de los extractos orgánicos.
- Un control sin tratamiento para evaluar la citotoxicidad inducida por la manipulación experimental.
- Un blanco analítico para la corrección de las absorbancias.

El protocolo resultante fue implementado en un grupo piloto en el semestre 2017-1. Para estimar el impacto sobre el área cognitiva y de habilidades adquiridas de realizar el guion experimental, se comparó al grupo piloto contra el resto de los grupos donde no se realizó la

práctica, utilizando como instrumento de evaluación un cuestionario calificado mediante rúbrica.

Resultados y discusión

Los cuestionarios realizados en el semestre 2017-1 incluyeron 7 preguntas (12 puntos) para evaluar el área cognitiva y 3 preguntas (7 puntos) para el área de habilidades. El análisis de los resultados obtenidos del cuestionario que se aplicó en el grupo piloto permitió establecer que el 72% de los estudiantes alcanzaron un puntaje aprobatorio (más de 12 puntos), mientras que en los grupos donde no se implementó el guion experimental, ninguno de los estudiantes obtuvo un puntaje aprobatorio, y la mayoría (98.2%) obtuvo menos de 6 puntos. Lo anterior sugiere que aquellos estudiantes que tuvieron la oportunidad de realizar el protocolo, además de identificar exitosamente los conceptos de biomarcador y citotoxicidad en los puntos críticos del ensayo, lograron adquirir la habilidad del manejo de los datos resultantes, para el cálculo de un parámetro que puede ser relacionado con el fenómeno biológico que observaron. En lo que respecta al área cognitiva, los estudiantes del grupo piloto refirieron que lograron comprender de mejor manera el marco teórico del guion con la explicación dada por el profesor y, además, el desarrollo experimental les permitió integrar los conocimientos adquiridos en la clase de teoría de la asignatura.

De los puntos obtenidos por los estudiantes de los grupos donde no se implementó el protocolo experimental, la mayoría correspondieron al área cognitiva; con excepción de algunos casos, donde pudieron contestar correctamente a una pregunta del área de habilidades: "Mencione al menos 3 cuidados que se deben tener al trabajar cultivos celulares". Esta pregunta podría ser contestada sin realizar el protocolo experimental, ya que algunos de los estudiantes han tenido la posibilidad de adquirir experiencia previa con cultivos celulares, a través de su participación en el Programa de Estancias Cortas de Investigación (PECI), mismo que se lleva a cabo en diversos laboratorios de investigación en la propia Facultad o bien, en otras dependencias de la UNAM.

Con las modificaciones derivadas a partir de las observaciones de los estudiantes del grupo piloto en el semestre 2017-1, y de nuestro grupo de trabajo de profesores de la asignatura de Toxicología; en 2019 se incluyó la versión final del guion experimental "Manual de guiones experimentales para la enseñanza y aprendizaje del laboratorio de Toxicología (clave 1614)", mismo que fue revisado por el Comité Editorial de la Facultad de Química y aprobado para su comercialización en la tercera edición del Manual disponible a partir de febrero de 2021 (Flores-Torres et al., 2021).

La versión final del guion experimental se diseñó para desarrollarse en una sesión de laboratorio de 4 horas, misma que inicia con una evaluación teórica del tema a tratar, seguida de una explicación donde los profesores revisan de manera breve los antecedentes y puntos más importantes a tener en cuenta durante el desarrollo experimental, todo esto partiendo de la base que los estudiantes realizaron un trabajo previo (diagrama de flujo y cuestionario de conocimientos previos) y con ello conocen la totalidad del guion. Posteriormente se inicia la actividad experimental, haciendo un desfase entre los equipos, para evitar que los estudiantes se aglomeren en el área en donde se encuentra el equipo para realizar la lectura del punto final de su reacción.

Una de las principales desventajas que presenta este guion experimental es que, si bien los estudiantes tienen una aproximación a las generalidades del trabajo con líneas celulares, la manipulación que realizan es limitada; ya que, en nuestro laboratorio, por cuestiones del tiempo y seguridad, son los profesores quienes tenemos la responsabilidad de preparar todos los reactivos, soluciones y biológicos que se emplean en los guiones experimentales. Sin embargo, el manejo de la suspensión celular de trabajo durante el ensayo, no requiere que se practique dentro de una campana de flujo laminar, lo que maximiza el número de estudiantes que pueden llevar a cabo el procedimiento experimental al mismo tiempo, disminuyendo los tiempos muertos durante el desarrollo del guion.

Considerando que el tiempo que se requiere para completar el ensayo es breve, se programó una sección de análisis y discusión de resultados al final de la sesión, misma que enriqueció el trabajo colaborativo y favoreció la integración de los conceptos teóricos, y la interpretación biológica de los resultados. Esto adquiere relevancia cuando se tiene en cuenta que el guion experimental planteado, no contempla un control de máxima liberación de LDH, por lo que el parámetro calculado no es el "Porcentaje de citotoxicidad" al que hacen referencia los protocolos reportados previamente (Fotakis y Timbrell, 2006; Chan et al., 2013; Takara Bio, 2020), sino un "Índice de citotoxicidad".

El "Índice de citotoxicidad" surge de la normalización de las absorbancias corregidas, asignando el valor de 1 al control sin tratamiento, para posteriormente ajustar los valores obtenidos en el control de disolvente y las muestras ambientales. De esta manera, cualquier valor por arriba de la unidad, se interpreta como que la condición experimental indujo muerte celular superior a la asociada a la manipulación de las células y/o la muerte celular en condiciones basales de la línea celular.

Por otro lado, en la versión final del guion experimental se logró ajustar el modelo a microescala, siendo que, en un ensayo completo para un equipo, se utiliza un volumen final de 2.6 mL, considerando todos los reactivos y biológicos de las condiciones experimentales evaluadas (**Tablas 1 y 2**). Esto tiene un impacto directo tanto en el costo de la práctica por alumno, y más importante, en la reducción de los residuos generados.

Tabla 1. Tratamiento previo al ensayo de detección de la enzima LDH (Flores-Torres et al., 2021).

Tratamiento (μL)	A	B	C	D*	
	Blanco	Control sin tratamiento	Control de disolvente	Colillas de cigarro	Hollín de escape
SSI	500	400	395	395	395
Suspensión celular	-	100	100	100	100
DMSO	-	-	5	-	-
Muestra ambiental	-	-	-	5	5
Total	500	500	500	500	500
Los equipos A trabajan con el extracto de colillas de cigarro y los equipos B con el extracto de hollín de escape.					

Tabla 2. Tratamiento para el ensayo de detección de la enzima LDH. (Flores-Torres et al., 2021).

Tratamiento (μL)	A	B	C	D*	
	Blanco	Control sin tratamiento	Control de disolvente	Colillas de cigarro	Hollín de escape
Sobrenadante	50	50	50	50	50
Amortiguador para LDH	50	50	50	50	50
Agitar dando golpes leves con la palma de la mano en un extremo de la caja durante 30 segundos. Cubrir la caja con papel aluminio e incubar 20 minutos a temperatura ambiente.					
HCl 1 N	50	50	50	50	50
Total	150	150	150	150	150
Agitar dando golpes leves con la palma de la mano en un extremo de la caja durante 30 segundos.					

Finalmente, es importante mencionar que, de manera paralela al desarrollo e implementación de guion experimental, se generó un documento denominado "Guía LDH"; se trata de una descripción detallada del guion experimental a modo de bitácora, dirigida a los profesores de laboratorio de Toxicología de la Facultad de Química de la UNAM. Este documento tiene como objetivo, armonizar los protocolos para la manipulación de la línea celular, el procedimiento para realizar el conteo de las células, así como la preparación de la suspensión celular y de los amortiguadores que se emplean en el ensayo.

Conclusiones

Se estandarizó el guion experimental "Evaluación de la enzima LDH como biomarcador de citotoxicidad en células tumorales" y con su implementación se logró un ambiente de aprendizaje, en el cual los estudiantes aplicaron y profundizaron el concepto de biomarcador utilizando un ensayo colorido a microescala; además de adquirir la habilidad para el manejo de datos y su interpretación biológica.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó con recursos del Proyecto PAPIME "Implementación y renovación de guiones experimentales para la enseñanza de la toxicología en la licenciatura de Química Farmacéutico Biológica" con número de registro PE208915.

Referencias

Andersen M. E., Mallick P., Clewell H. J., 3rd, Yoon, M., Olsen G. W., Longnecker, M. P. (2021). Using quantitative modeling tools to assess pharmacokinetic bias in epidemiological studies showing associations between biomarkers and health outcomes at low exposures. *Environmental research.*, 197, 111183.

American Type Culture Collection (ATCC). (2021). K-562 (ATCC CCL-243). Recuperado el 13 de julio del 2021, de <https://www.atcc.org/products/ccl-243>

Chan F. K., Moriwaki K., De Rosa M. J. (2013) Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in molecular biology.*, 979, 65-70.

Flores-Torres M., Centeno-Llanos S.M., Olguín-Reyes S.R., Del Valle-Pérez P., Hernández-Luis F., Castañeda-López P.C., Rivera-Chávez J.A., Pérez-Muñoz C., Madariaga-Mazón A., Kuri-Pineda A.E., Castrejón-Carrillo S. (2021). Manual de guiones experimentales para la enseñanza y aprendizaje del laboratorio de Toxicología (clave 1614). 3era Ed. Comité Editorial de la Facultad de Química, UNAM, p.33-45.

Fotakis G., Timbrell J. A. (2006) *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters.*, 160, 171-177.

Jiménez-Valverde G., Llobera-Jiménez R., Llitjós-Viza A. (2006). La atención a la diversidad en las prácticas de laboratorio de química: los niveles de apertura. *Enseñanza de las ciencias: revista de investigación y experiencias didáctica* [en línea], 24:1 pp. 59-70. Recuperado el 2 de noviembre del 2021, de <https://raco.cat/index.php/Ensenanza/article/view/73532>

National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). (2021). Air Pollution and Your Health. Recuperado el 13 de julio del 2021, de <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/air-pollution/index.cfm>

Nguyen L. V., Caldas C. (2021). Functional genomics approaches to improve pre-clinical drug screening and biomarker discovery. *EMBO molecular medicine.*, e13189.

Schmidt C. W. (2006). Signs of the times: biomarkers in perspective. *Environmental health perspectives.*, 114(12), A700-A705.

Takara Bio. (2020) LDH Cytotoxicity Detection Kit. Product Manual. Recuperado el 13 de julio del 2021, de <https://www.takarabiomed.com.cn/Download/MK401.pdf>

World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (WHO, IPCS). (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles / published under the joint sponsorship of the United Nations environment Programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization. WorldHealthOrganization. pp. 11-13. Recuperado el 13 de julio del 2021, de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39037>